

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**AR HOLĪNA LIĀZI SAISTĪTO BAKTERIĀLO MIKROKOMPARTMENTU
RAKSTUROJUMS**

BAKALaura DARBS

Autors: Eva Emīlija Česle

Stud. apl. Nr. ec15009

Darba vadītājs: *MSc. biol.* Gints Kalniņš

Recenzents: *MSc. biol.* Egija Zole

RĪGA 2018

SATURS

SATURS.....	2
SAĪSINĀJUMI.....	4
KOPSAVILKUMS.....	5
SUMMARY	6
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	8
1.1. Bakteriālo mikrokompartmentu uzbūve	8
1.2. BMC funkcionālais iedalījums	10
1.3. Ar glicil-radikāļa enzīmiem saistītie mikrokompartmenti (GRM).....	12
1.4. Holīna liāze (CutC) un ar to saistītie mikrokompartmenti	14
1.5. BMC čaulu veidojošie proteīni	16
1.6. BMC izveidošanās mehānismi.....	19
2. MATERIĀLI UN METODEDES	22
2.1. Materiāli.....	22
2.1.1. Vielas.....	22
2.1.2. Šķīdumi un geli	23
2.1.3. Izmantotie <i>E. coli</i> celmi	24
2.1.4. Plazmīdas un vektori	24
2.1.5. <i>E. coli</i> barotnes	24
2.1.6. Enzīmi un to buferšķīdumi.....	24
2.1.7. Oligonukleotīdi PCR reakcijām	24
2.1.8. Citi reaģenti un komplekti.....	25
2.1.9. Aparatūra un iekārtas	25
2.1.10. Citi materiāli.....	26
2.2. Metodes.....	27
2.2.1. Mutāciju ieviešana, izmantojot PCR.....	27
2.2.2. DNS elektroforēze agarozes gelā	28
2.2.3. DNS izdalīšana no agarozes gēla pēc GeneJET™ Gel Extraction Kit protokola ...	28
2.2.4. DNS šķelšana, izmantojot restriktāzes	29
2.2.5. DNS ligēšana.....	30
2.2.6. Plazmīdu transformēšana <i>E. coli</i> šūnās	30

2.2.7. <i>E. coli</i> šūnu pavairošana plazmīdu analīzei un nepieciešamo klonu atlasei	31
2.2.8. Plazmīdu izdalīšana no <i>E. coli</i> šūnām pēc GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit protokola.....	31
2.2.9. Pozitīvo DNS klonu atlase, izmantojot restriktāzes	31
2.2.10. DNS sekvenēšana	32
2.2.11. Proteīna producēšana <i>E. coli</i> BL21-DE3 ekspresijas sistēmā.....	33
2.2.12. <i>E. coli</i> šūnu lizēšana	34
2.2.13. Proteīnu attīrīšana ar metālafinitātes hromatogrāfijas kolonnu.....	34
2.2.14. Denaturējošā poliakrilamīda gela elektroforēze.....	34
2.2.15. Proteīnu attīrīšana ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju.....	35
2.2.16. PEG kompetento šūnu sagatavošana.....	35
2.2.17. Agarizētu LB barotņu pagatavošana	36
2.2.18. Bakteriālo mikrokompartmentu attīrīšana.....	36
2.2.19. Proteīnu analīze ar masspektrometrijas metodi.....	37
2.2.20. Akrilamīda gela proteīna zonu šķelšana ar tripsīnu	37
2.2.21. Elektronmikroskopijas paraugu sagatavošana	38
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	39
3.1. Bakteriālo mikrokompartmentu iegūšana	39
3.2. Priekšnoteikumi bakteriālo mikrokompartmentu izveidei.....	43
3.3. Bakteriālo mikrokompartmentu čaulas proteīnu un enzīmu koekspresijas	46
3.4. BMC proteīna piesaistīšanās Hsp70	53
3.5. BMC producēšana ar koekspresētiem kodola enzīmiem	55
SECINĀJUMI	59
PATEICĪBAS	60
IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS	61
PIELIKUMI.....	66

SAĪSINĀJUMI

Å – angstrēms

AlcDH- alkohola dehidrogenāze

AldDH- aldehīda dehidrogenāze

BMC- bakterālais mikrokompartments

BMC-H- heksamērais bakteriālo mikrokompartmentu proteīns

BMC-P- pentamērais bakteriālo mikrokompartmentu proteīns

BMC-T- pseidoheksamērus veidojošais trimērais bakteriālo mikrokompartmentu proteīns

bp – bāzu pāris

CutC- holīna trimetlamīna liāze

DHAP – 2,5-dihidroksiacetofenons (*2,5-dihydroxyacetophenone*)

DTT- ditiotreitols

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

IPTG - izopropil-β-D-tio-galaktozīds

kDa - kilodaltons

OD - optiskais blīvums (*optical density*)

PEG – polietilēnglikols

PTAC- fosfotransacetilāze (*phosphotransacetylase*)

SDS – nātrija dodecilsulfāts (*sodium dodecyl sulfate*)

TCA – trihloretiķskābe (*trichloroacetic acid*)

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamīds

TMA- trimetilamīns

Tris – tris(hidroksimetil)aminometāns

KOPSAVILKUMS

Darba mērķis bija producēt un analizēt ar CutC holīna trimetilamīna liāzi saistītos bakteriālos mikrokompartmentus, pētīt to veidojošo proteīnu savstarpējo mijiedarbību un aktivitāti ar nolūku izprast BMC veidošanās mehānismus, kā arī pētīt kompartmentu veidojošo proteīnu mijiedarbību ar kodola enzīmiem un enzīmu iepakoties mehānismu.

Bakalaura darbā *E. coli* ekspresijas sistēmā tika iegūti šķīstoši bakteriālo mikrokompartmentu proteīni, kā arī attīrītas un raksturotas bakteriālo mikrokompartmentu daļiņas. Tika pārbaudīta arī bakteriālo mikrokompartmentu proteīnu mijiedarbība ar nozīmīgākajiem bakteriālo kompartmentu enzīmiem. Vairākiem natīvajiem bakteriālo mikrokompartmentu enzīmiem tika pētīta spēja iepakoties daļiņās, no kuriem CutC holīna liāzei vienīgajai tika novērota šāda īpašība.

Bakalaura darbs izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, proteīnu kristalogrāfijas laboratorijā *MSc.biol.* Ginta Kalniņa vadībā.

Atslēgvārdi: bakteriālie mikrokompartmenti, glicil-radikāļa enzīms, CutC, baktēriju metabolisms.

SUMMARY

The main aim of this work was to produce and analyze choline trimethylamine lyase associated bacterial microcompartments, to study the interaction and activity of the proteins that form bacterial microcompartment with the goal to gain insight of the BMC formation and characteristics as well BMC shell protein and core enzyme interaction and enzyme recruiting and encapsulation mechanism.

During this study a production of soluble bacterial microcompartment proteins in *E. coli* expression system was achieved and BMC particles were purified and characterized. The interaction between bacterial microcompartment proteins and the most significant BMC enzymes was also tested. The ability to be enclosed in compartments was tested for some of the native BMC enzymes with CutC choline lyase being the only enzyme with such potential.

This study was performed in Latvian Biomedical Research and Study Centre, the laboratory of protein crystallography under supervision of *MSc.biol.* Gints Kalniņš.

Keywords: bacterial microcompartments, glycyl-radical enzyme, CutC, bacterial metabolism.

IEVADS

Bakteriālie mikrokompartimenti (BMC) iesaistīti daudzu baktērijām nozīmīgu metabolisko reakciju norisē un pēc tiem raksturīgajām reakcijām ir iedalāmi vismaz septiņās grupās. BMC iesaistīti gan CO₂ fiksēšanā cianobaktērijās, gan etanolamīna, propāndiola un citu specifisku substrātu metabolismā citās baktērijās, un bieži nodrošina baktēriju spēju sekmīgi eksistēt specifiskos apstākļos.

Viena no visplašāk pārstāvētajām bakteriālo mikrokompartimentu grupām ir ar glicīna radikāļa enzīmu saistītie bakteriālie mikrokompartimenti jeb GRM, taču tā kā tie atklāti salīdzinoši nesen, šo kompartmentu uzbūve un darbība ir maz pētīta. Ar holīna liāzi saistītie bakteriālie mikrokompartimenti ir GRM grupas pārstāvji, un ir nozīmīgi holīna trimetilamīna liāzes (CutC) katalizētajā holīna šķelšanā par trimetilamīnu. Šo bakteriālo mikrokompartmentu un to veidojošo proteīnu strukturālie pētījumi ļautu veidot pilnīgāku priekšstatu par GRM darbību un uzbūvi.

Darba mērķis: Producēt un raksturot ar holīna liāzi saistītos bakteriālos mikrokompartmentus un tos veidojošos proteīnus.

Darba uzdevumi:

- Producēt un raksturot bakteriālos mikrokompartmentus veidojošos proteīnus;
- Pārbaudīt BMC proteīnu savstarpējo mijiedarbību un saistīšanās spēju ar BMC raksturīgajiem enzīmiem;
- Testēt BMC enzīmu spēju iepakoties BMC daļiņās.

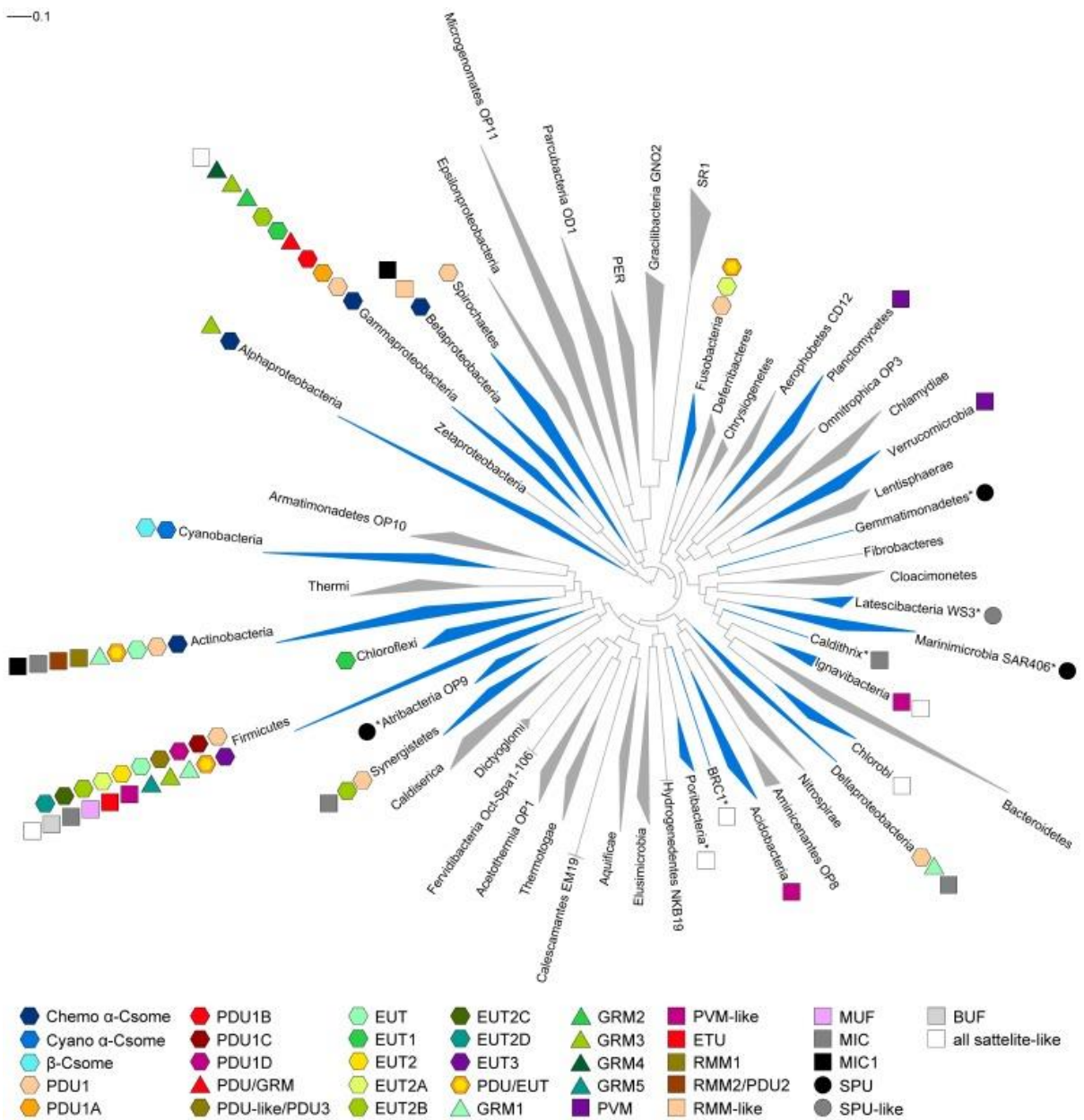
1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Bakteriālo mikrokompartmentu uzbūve

Bakteriālie mikrokompartimenti (BMC, arī MCP) ir no proteīnu molekulām veidotas organellas ar puscaurlaidīgām membrānām līdzīgu struktūru un īpašībām. Tās funkcionē līdzīgi kā eikariotu organellas un ir sastopamas lielā daļā baktēriju sugu, veidojot apvalku ap dažādiem baktēriju metaboliskajos ceļos iesaistītajiem enzīmiem. Bakteriālie mikrokompartimenti ir funkcionāli daudzveidīgi un iesaistīti gan anaboliskos, gan kataboliskos procesos. BMC iekšienē līdzšinējos pētījumos ir konstatēti gan enzīmi, kas iesaistīti oglekļa fiksācijā karboksisomās, gan aerobus un anaerobus katabolisma procesus mediējoši enzīmi metabolosomās, piešķirot mikroorganismiem īpašības metabolizēt substrātus, kuru izmantošana ļauj baktērijām eksistēt specifiskos apstākļos. BMC ir plaši sastopami salīdzinoši daudzveidīgos mikroorganismos - līdz 2013. gadam BMC domēnu kodējošās sekvenču tikušas konstatētas 265 no 1568 tobrīd pieejamajiem pilnajiem baktēriju genomiem (Julien Jorda et al., 2013), un tiek prognozēts, ka tie kopumā varētu būt sastopami 23 baktēriju tipos (1. attēls) (Cheryl A. Kerfeld and Onur Erbilgin, 2015).

Bakteriālie mikrokompartimenti pirmo reizi tika aprakstīti 1956. gadā - tie tika atklāti cianobaktērijās, tās pētīt ar elektronmikroskopijas palīdzību. Iegūtais organellas attēls liecināja par augstu ģeometrisku organizāciju, tādēļ sākotnējos pētījumos tās tika uzskatītas par šūnu inficējušiem bakteriofāgiem. Pirmie izolētie BMC bija karboksisomas, kas satur ribulozes 1,5-bifosfāta karboksilāzi/oksigenāzi (RuBisCO) un iesaistītas CO₂ fiksācijā. Šis arī ir visvairāk pētītais BMC veids, un tās ir sastopamas cianobaktērijās un daudzās hemoautotrofās baktērijās (Gordon C. Cannon et al., 2001).

Visiem līdz šim pētītajiem bakteriālajiem mikrokompartimentiem raksturīga līdzīga struktūra, kur funkcionālus kompartimentus veido trīs galvenie elementi: čaulas proteīni, raksturenzīms un papildus enzīmi. Čaulas proteīni veido BMC apvalku, kas ieskauj enzīmus, raksturenzīms veic katram mikrokompartimentu veidam raksturīgo reakciju, un papildus enzīmi uztur vienmērīgu metabolītu koncentrāciju šūnā, kas nepieciešama veiksmīgai reakcijas norisei. Pētījumos pierādīts, ka bakteriālie mikrokompartimenti spēj uzlabot enzīmu efektivitāti, kas pārbaudīts arī metaboliskās inženierijas pētījumos, iekļaujot BMC čaulā enzīmus, kas dabiski neveic reakcijas kompartimentos (Lee, M. J. et al., 2016).

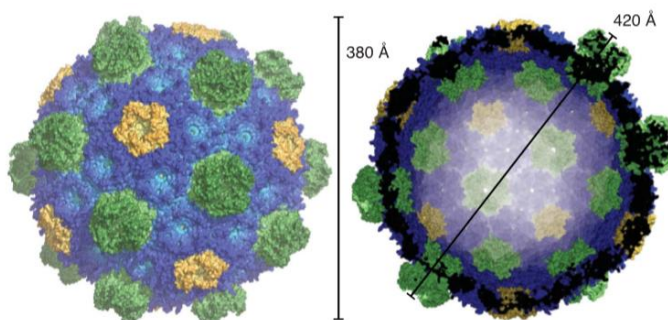


1. attēls. BMC lokusu izplatība starp baktēriju tipiem. Zilā krāsā atzīmēti tipi, kuros sastopami līdz šim klasificētie BMC lokusi. Ar dažādas krāsas ģeometriskām formām atzīmēti katrā tipā sastopamie BMC lokusi. Apzīmējumi- PDU - propandiol utilizing loci, EUT- ethanolamine utilizing loci, GRM- glycy radical enzyme-containing microcompartment loci, PVM- Planctomyces and Verrucomicrobia-type loci, ETU- ethanol utilizing loci, RMM, MUF, MIC, BUF- metabolosomes of unknown function (Seth D. Axen et al., 2014).

Figure 1. Bacterial phyla tree with distribution of BMC locus types. The classified BMC locus types denoted as colored shapes are adjacent to the phyla in which they appear. Abbreviations: PDU- propandiol utilizing loci, EUT- ethanolamine utilizing loci, GRM- glycy radical enzyme-containing microcompartment loci, PVM- Planctomyces and Verrucomicrobia-type loci, ETU- ethanol utilizing loci, RMM, MUF, MIC, BUF- metabolosomes of unknown function. (Seth D. Axen et al., 2014).

Visi bakteriāli mikrokompartimenti pēc formas veido daudzskaldņus ar diametru 100-150 nm. Elektronmikroskopijas rezultāti liecina, ka karboksisomas veidotas kā diezgan precīzi ikosaedri, bet metaboliskajiem BMC un jo īpaši enterobaktēriju mikrokompartimentiem ir mazāk izteikta regulāra ģeometriskā struktūra (2. attēls), un tie veido vairāk apaļas formas (Todd O. Yeates et al., 2010). BMC parasti veido 10-20 dažādu polipeptīdu, kuru kopējais

skaitis kompartmentā var sasniegt pat 20000 vienības. Līdz šim mikrokompartmenu uzbūvē nav konstatētas lipīdu sastāvdaļas - tos veido tikai proteīnu subvienības (Chiranjit Chowdhury et al., 2014).



2. attēls. Jaunākā iegūtā bakteriālā mikrokompartenta kristāla struktūra. BMC daļiņas producētas, ekspresējot miksobaktērijas *Haliangium ochraceum* BMC apvalka proteīnus. Zilā krāsā- heksamērie, zaļā- pseidoheksamērie, bet dzeltenā- pentamērie apvalka proteīni. Apvalks ir 20-30 Å biezs ar kopējo čaulas diametru vidēji 40 nm (Markus Sutter et al., 2017).

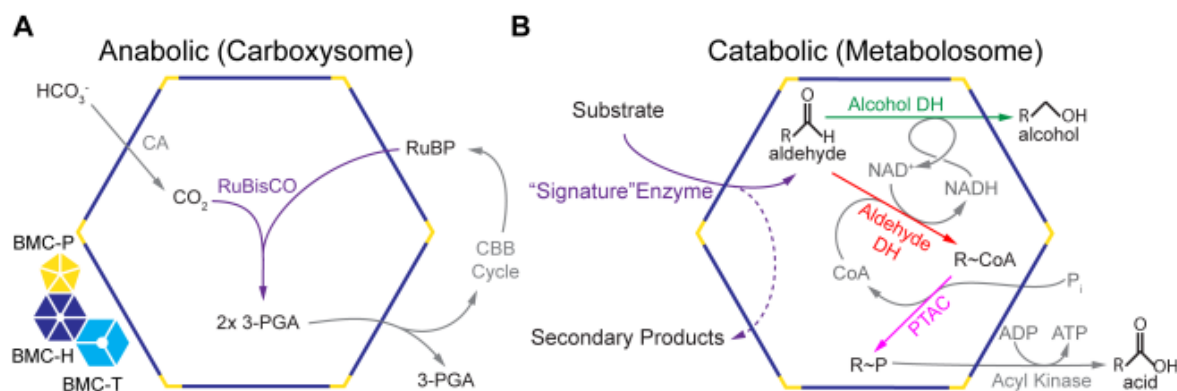
Figure 2. The latest crystal structure of an intact bacterial microcompartment. The BMC's were produced by expressing BMC shell proteins from myxobacterium *Haliangium ochraceum*. In blue- hexameric shell proteins, in green- pseudohexameric, in yellow- pentameric shell proteins. The shell is 20-30 Å thick with the overall diameter of the shell being around 40 nm (Markus Sutter et al., 2017).

1.2. BMC funkcionālais iedalījums

Visas bakteriālajos mikrokompartmentos notiekošās reakcijas raksturo līdzīga darbības shēma - reakcijā kā starpsavienojumi iesaistīti mazi, gaistoši vai citotoksiski metabolīti, kuriem BMC nodrošina optimālus reakcijas apstākļus, vienlaikus aizsargājot pašu šūnu. Ja šīs reakcijas notiktu citosolā, toksiskie starpsavienojumi vai nu uzkrātos šūnā, vai arī difundētu ārējā vidē, šūnai zaudējot vērtīgu oglekļa avotu (Todd O. Yeates et al., 2010). Papildus vienkāršākajam iedalījumam anaboliskajos (karboksisomas) un kataboliskajos kompartmentos jeb metabolosomās (visi pārējie BMC), bakteriālo mikrokompartmentu iedalījumu parasti veic, balstoties uz to iekšienē notiekošajām reakcijām - šobrīd tiek uzskatīts, ka BMC varētu būt iesaistīti vismaz septiņu metabolisko procesu nodrošināšanā (Julien Jorda et al., 2013). Kopumā eksperimentāli aprakstīti seši ar BMC saistīti metaboliski procesi - CO₂ fiksēšana karboksisomās (anaboliska reakcija), 1,2-propāndiola utilizācija Pdu BMC, etanolamīna utilizācija Eut BMC, etanola utilizācija Eut BMC un divi specifiski BMC veidi, kas degradē fukozi. Detalizētāk izpētīti pirmie trīs BMC veidi - karboksisomas, Pdu un Eut mikrokompartimenti, jo Eut un fukozes degradēšanā iesaistītie BMC atklāti salīdzinoši nesēn.

Karboksisomas no visiem BMC veidiem pētītas visvairāk, jo tās tika atklātas pirmās un ļoti ilgi tika uzskatītas par vienīgo sastopamo bakteriālo mikrokompartmentu. Tikai 38 gadus (1994. gadā) pēc pirmajiem karboksisomu atklājumiem tika atklāti Pdu metabolismu kodējošie

gēni, kas aizsāka Pdu BMC pētījumus (Ping Chen et al., 1994). Karboksisomas pilda nozīmīgu lomu cianobaktēriju spējā fiksēt CO₂. Tās iedala divos tipos (α un β), kas savstarpēji atšķiras ar sastāvā esošajiem proteīniem un tos kodējošo gēnu organizāciju genomā. Karboksisomu kodola nozīmīgākās sastāvdaļas ir RuBisCO un ogļskābes anhidrāzes (3. attēls A), kas nodrošina cianobaktēriju spēju saistīt neorganisko oglekli (Todd O. Yeates et al., 2008).



3. attēls. Shematisks eksperimentāli pētīto mikrokompartmentu bioķīmisko procesu attēlojums. A) Karboksisoma un tajā notiekošais CO₂ asimilācijas process. B) Metabolosoma. Attēlots process, kurā no substrāta etanolamīna raksturenzīms producē acetaldehīdu. Apzīmējumi - CA- carbonic anhydrase, 3- PGA- 3-phosphoglycerate, RuBP- ribulose 1,5-bisphosphate (Seth D. Axen et al., 2014).

Figure 3. Schematic overview of the biochemical processes of characterized bacterial microcompartments. (A) Carboxysome and the process of CO₂ assimilation happening inside. (B) Metabolosome. An example substrate is ethanolamine and the signature enzyme produces acetaldehyde. Abbreviations- CA- carbonic anhydrase, 3- PGA- 3-phosphoglycerate, RuBP- ribulose 1,5-bisphosphate (Seth D. Axen et al., 2014).

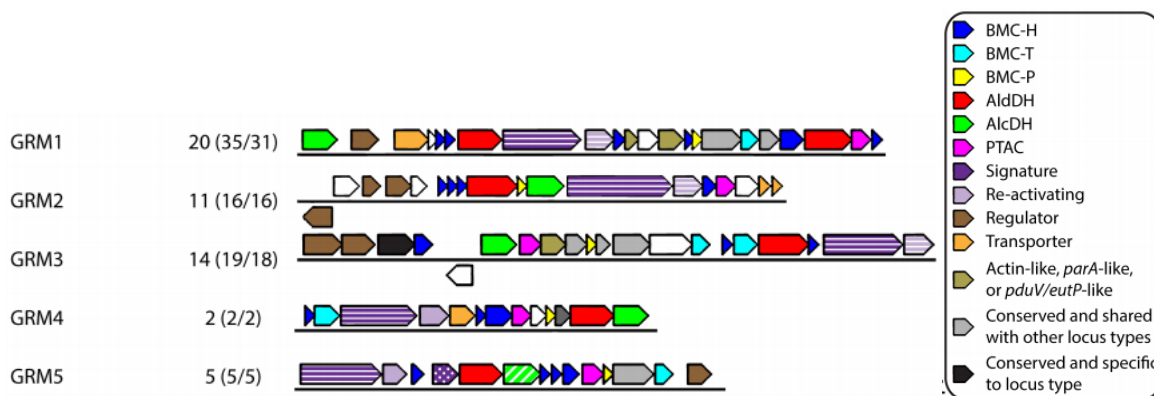
Pdu un Eut bakteriālie mikrokompartimenti pieder pie metabolosomām un abi darbojas pēc līdzīga principa - substrāts kompartmentā tiek noārdīts līdz aldehīdam, no kura tālāk veidojas centrālie metabolīti. Tie spēj difundēt ārpus BMC un iesaistīties tālākos organisma metabolisma ceļos (3. attēls B). Pdu BMC, noārdot 1,2-propāndiolu, veidojas propionaldehīds, kuru tālāk sadalot tiek iegūts propionilkoenzīms A un propanols-1. Eut BMC reakcijā tiek deaminēts etanolamīns, no kā tiek iegūts acetaldehīds, un tas tālāk tiek konvertēts par acetylCoA. Abu BMC bioķīmiskajām norisēm raksturīgi trīs enzīmi - koenzīma A (CoA) atkarīgā aldehīda dehidrogenāze (AldDH), alkohola dehidrogenāze (AlcDH) un fosfotransacilāze (PTAC). Visi trīs enzīmi nepieciešami, lai šūnā uzturētu vienmērīgu metabolītu koncentrāciju. AldDH reducē aldehīdu, veidojoties NADH un acilCoA. Šai reakcijai kā kofaktori nepieciešami NAD⁺ un CoA, un tā kā BMC vide ir norobežota no pārējās šūnas un plūsma caur proteīnu čaulu ir ierobežota, kofaktoru atjaunošanai jānotiek paša BMC iekšienē. Šo funkciju veic AlcDH un PTAC - AlcDH reducē vēl vienu aldehīda molekulu, producējot spirtu un reģenerējot NAD⁺ (Shouqiang Cheng et al., 2012), bet PTAC aizvieto acilkoenzīma A CoA grupu ar fosfātu, reciklējot CoA (Huseby DL, Roth JR., 2013). AlcDH trūkuma vai neefektīvas darbības rezultātā metabolosomu augšana ievērojami palēninās un var pat pilnībā

apstāties, kas liecina par obligātu AlcDH klātbūtni funkcionālas metabolosomas eksistencē. Baktērijas iegūst enerģiju, katram BMC raksturīgajai kināzei iepriekš PTAC reakcijā izveidotajam acetilfosfātam atšķeļot fosfātgrupu, rezultātā iegūstot ATP un acetātu (Chiranjit Chowdhury et al., 2014).

Galvenā atšķirība starp bakteriālajiem mikrokompartimentiem ir raksturenzīms (signature enzyme), kas substrātu noārda līdz aldehīdam (Todd O. Yeates et al., 2010). Tiek pieņemts, ka pēc līdzīga principa vajadzētu funkcionēt arī pārējām metabolosomām, substrātu mikrokompartimenta iekšienē noārdot par aldehīdu un tālāk no tā producējot nepieciešamos savienojumus.

1.3. Ar glicil-radikāļa enzīmiem saistītie mikrokompartimenti (GRM)

Baktēriju genoma pētījumos 2014. gadā tika identificēts un klasificēts liels skaits iepriekš nezināmu dažādu bakteriālo mikrokompartimentu. Pētījums tika balstīts uz baktēriju genoma un genoma lokusu uzbūves analīzi, zināmajos baktēriju genomos meklējot pēc sekvenču un uzbūves līdzīgus genoma reģionus iepriekš izveidotam BMC lokusa modelim. Kopumā tika klasificēti 30 veidu BMC kodējoši lokusi, kuri pēc savas līdzības sadalīti 10 pēc lokusu skaita diezgan atšķirīgās grupās (Seth D. Axen et al., 2014). Kā viena no visplašāk pārstāvētajām grupām tika identificēta glicil-radikāļu enzīmus saturošo bakteriālo mikrokompartimentu jeb GRM grupa. Pētījumā tika identificēti piecu dažādu tipu GRM lokusi – kā visas metabolosomas, tie satur kodola pamata enzīmu komplekta (AldDH, AlcDH un PTAC) kodējošas sekvenču un glicil-radikāļu enzīmu (GRE) gēnus, kas kopā ar aktivējošo enzīmu (AE) ir šīs grupas *signature enzyme* jeb raksturenzīms (4. attēls). Pieci izšķirtie lokusi (GRM1-GRM5) ir izplatīti *Actinobacteria*, *Proteobacteria* un *Firmicutes* baktēriju tipos, un to nozīmīgākā savstarpējā atšķirība ir BMC čaulu veidojošo proteīnu komplektācijā un dažādos papildus gēnos. Veicot plašāku GRM lokusu strukturālu un filoģenētisku salīdzināšanu, secināts, ka GRM tipa lokuss ir ne tikai izplatītākais BMC baktēriju vidū, bet kodē arī funkcionāli daudzveidīgāko metabolosomu grupu (Jan Zarzycki et al., 2015).

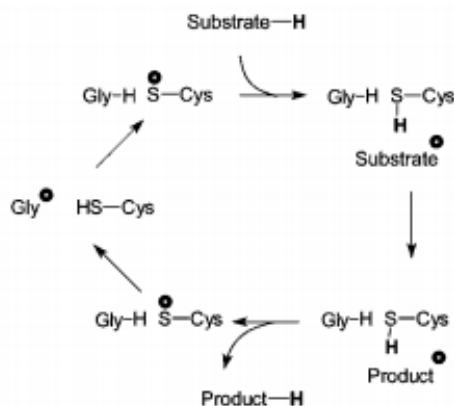


4. attēls. BMC lokusu attēlojums. Shematiski attēloti konservatīvākie reprezentatīvo lokusu reģioni (Seth D. Axen, Onur Erbilgin, Cheryl A. Kerfeld, 2014).

Figure 4. Representation of BMC loci. Cartoon representation of the most highly conserved contiguous region (Seth D. Axen, Onur Erbilgin, Cheryl A. Kerfeld, 2014).

Glicil-radikāļa enzīmi (GRE) ir spējīgi katalizēt ļoti atšķirīgas reakcijas, taču visiem ir novērojama augsta sekvenču un struktūras homoloģija - visbiežāk ir homodimēri ar 80-100 kDa lielām subvienībām, taču tiem var būt arī dažas mazas papildus subvienības. Tie tiek sintezēti kā katalītiski neaktīvi prekursorie proteīni, kam nepieciešama pēctranslācijas aktivācija. Šo funkciju veic specifiski Fe-S klasteru proteīni, ko sauc par aktivējošajiem enzīmiem (AE), un kas arī tiek kodēti bakteriālo mikrokompartmentu lokusā. GRE aktivējošie enzīmi pieder pie S-adenozilmetionīna (SAM) radikāļu enzīmu grupas, un reakciju katalīzei spēj veidot spēcīgus radikāļus. Paši aktivējošie enzīmi nav plaši analizēti, lielākoties to zemās stabilitātes dēļ. Galvenie aktivējošo enzīmu pētījumi veikti ar piruvāta formiāta liāzes aktivējošo enzīmu (PFL-AE), kas ļāvis skaidrāk izprast SAM tipa aktivējošo enzīmu darbības procesu (Krista A. Shisler and Joan B. Broderick, 2014). GRE aktivācija notiek, stereospecifiski atšķēlot C-2 *pro-S* ūdeņradi no konservatīva glicīna atlikuma, radot anoksiskos apstākļos stabili, ar proteīnu saistītu glicil-radikāli (Frey M. et al., 1994). Glicil-radikālis ir ļoti jutīgs pret skābekli - tā klātbūtnē radikālis kļūst ļoti nestabils un tiek neatgriezeniski inaktivēts polipeptīdu galvenās ķēdes pārrāvuma dēļ. Šis arī ir galvenais iemesls, kāpēc reakcijas ar glicil-radikāļa enzīmiem var notikt tikai anaerobā vidē.

Visu zināmo GRE reakcijas cikls, domājams, tiek iniciēts, pārnesot radikāli no glicīna uz konservatīva cisteīna tiolgrupu. Šī aminoskābe atrodas tās pašas subvienības polipeptīdu ķēdes vidū un terciārajā struktūrā glicīna radikālim novietota pietiekami tuvu, lai varētu notikt H atoma pārnese (shēma 5. attēlā). Rezultātā tiek iegūts ļoti reaģētspējīgs tilil-radikālis, kas tālāk iniciē enzīmspecifisku radikāļa reakciju ar substrātu (Thorsten Selmer et al., 2005).



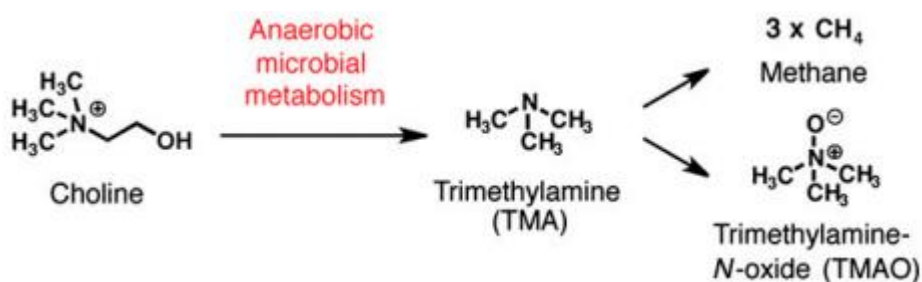
5. attēls. GRE cikla darbības shēma. Tiek uzskatīts, ka GRE substrātam atņem ūdeņraža atomu, lai veiktu katalīzi. Stabils glicil-radikālis reaģē ar terciārajā struktūrā tuvu novietota konservatīva cisteīna tiolgrupu. Rezultātā radies tiol-radikālis atšķēļ ūdeņraža atomu substrātam, producējot enzīmam piesaistītu substrāta radikāli, kas veic reakciju, lai producētu starpprodukta radikāli. Kā pēdējais, produkta radikālis atgūst ūdeņraža atomu, to atņemot to enzīma tiolgrupai, tādējādi atkal aktivējot enzīmu (Thorsten Selmer et al., 2005).

Figure 5. General scheme of the GRE mechanistic cycle. GRE's are thought to abstract a hydrogen atom from the substrates to promote catalysis. The stable glycyl radical initially reacts with the thiol group of a conserved cysteine that is located very close to the glycyl radical site in the tertiary structure. The thiyl radical generated then abstracts a hydrogen atom from the substrate, yielding an enzyme-bound substrate radical, which undergoes the reaction to yield an intermediate product radical. Finally, the product radical re-abstracts the hydrogen atom from the thiol group of the enzyme, which is then back in the active, radical-containing state (Thorsten Selmer et al., 2005).

1.4. Holīna liāze (CutC) un ar to saistītie mikrokompartmenti

Holīna trimetilamīna liāze (CutC) ir salīdzinoši nesen identificēts GRE grupas enzīms. Ar holīna degradēšanu saistītie mikrokompartmentu lokusi atbilst GRM1 un GRM2 grupām - to tuvā filoģenētiskā radniecība liecina arī par līdzīgām funkcijām. CutC pirmo reizi tika raksturots GRM1 tipa lokusam *Desulfovibrio desulfuricans* baktērijās, apstiprinot šī enzīma spēju sašķelt holīnu (Smaranda Craciun and Emily P. Balskus, 2012). Vēlāk eksperimentāli pierādīts, ka arī GRM2 enzīmi funkcionē tāpat kā GRM1 enzīmi (Gints Kalnins et al., 2015). GRM1 lokuss lielākoties sastopams *Firmicutes* tipa baktēriju genomā, taču konstatēts arī vienai *Actinobacteria* un dažām *Deltaproteobacteria* baktērijām (Seth D. Axen et al., 2014). Šajā lokusā atrodas divas AldDH kodējošas sekvences, taču visos detektētajos GRM1 vienai no tām konstatēta mutācija, kur katalītiskais cisteīns nomainīts ar serīnu vai prolīnu. Tas nozīmē, ka enzīms nespēj efektīvi katalizēt dehidrogenizācijas reakciju un, visticamāk, ir neaktīvs. Par neaktīvo AldDH enzīmu ir tikušas izvirzītas teorijas, ka tam ir strukturāla loma BMC iekšējās organizācijas nodrošināšanā līdzīgi kā CcmM loma β -karboksisomās (Jeffrey C. Cameron et al., 2013), taču tas līdz šim nav eksperimentāli pārbaudīts. GRM1 lokusus kodētajiem BMC čaulas heksamēriem raksturīga specifiska polaritāte - uz citosolu vērstās poras ir negatīvi lādētas, kamēr uz kompartmenta iekšpusi vērstā puse ir relatīvi neitrāla. Šāds elektropotenciāla izvietojums varētu būt skaidrojams ar holīna ķīmiskajām īpašībām - tas ir pozitīvi lādēts savienojums, un specifiskā poru polaritāte, iespējams, atvieglo tā pārnešanu caur proteīnu čaulu.

GRM2 lokuss atrasts tikai *Gammaproteobacteria* baktērijām un lielākoties konstatēts tikai patogēniem. Šajā lokusā nav konstatēti BMC-T proteīnus kodējoši gēni, kas atrodami gandrīz visos pārējos GRM lokusos. Tas varētu liecināt, ka GRM2 tipa BMC ir no citiem lokusiem atšķirīga metabolītu plūsmas regulācija, jo BMC-T proteīnu aizvērties spējīgās poras šajā procesā netiek izmantotas (Jan Zarzycki et al., 2015).



6. attēls. Holīna šķelšanas reakcija un reakcijas produkta trimetilamīna (TMA) tālākā izmantošana citos organismos. No holīna ar CutC palīdzību tiek iegūts TMA un acetaldehīds. TMA tālāk citā organismā var oksidēties par trimetilamīna-N-oksīdu (TMAO) un veidot metānu (Smaranda Craciun and Emily P. Balskus, 2012).

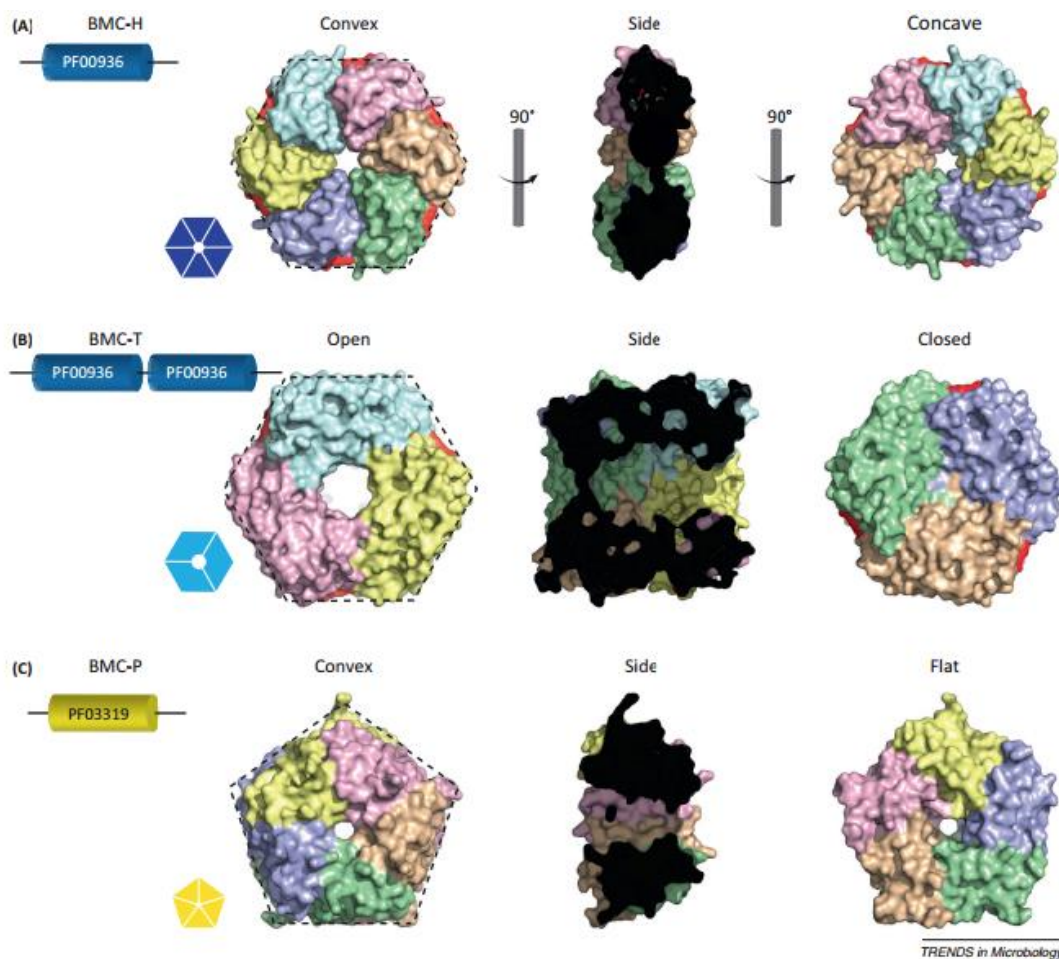
Figure 6. Generation of trimethylamine (TMA) from choline and its subsequent processing by other organisms. TMA and acetaldehyde are generated from choline. TMA later can be oxidized to TMAO or to make methane in higher organisms (Smaranda Craciun and Emily P. Balskus, 2012).

Ar holīna liāzi saistīto BMC raksturenzīms holīna trimetilamīna liāze jeb CutC katalizē holīna sašķelšanu par trimetilamīnu (TMA) un acetaldehīdu. Holīns ir nozīmīgs savienojums augstāko organismu funkcionēšanā - tas ir iesaistīts daudzu vitāli nozīmīgu funkciju nodrošināšanā gan kā šūnu membrānu sastāvdaļa, gan neurotransmitera acetilholīna sintēzē, gan arī nepieciešams sekmīgai grūtniecības un laktācijas perioda organisma procesu norisei (Steven H. Zeisel and Kerry-Ann da Costa, 2009). TMA spēj ražot tikai baktērijas, un tā oksidētās formas trimetilamīna oksīda (TMAO) augstas koncentrācijas zīdītāju organismā ir saistītas ar dažādām saslimšanām, piemēram, hroniskām nieru slimībām (W.H. Wilson Tang, M.D. et al., 2014) un kardiovaskulārām saslimšanām (W.H. Wilson Tang, M.D. et al., 2013). Holīna šķelšanas enzimatiskais process (6. attēls) ir līdzīgs daudz vairāk pētītajiem etanolamīna (Eut) mikrokompartimentu enzīmu metaboliskajam procesam, kurā arī kā viens no galaproduktiem veidojas acetaldehīds (Smaranda Craciun and Emily P. Balskus, 2012). Holīna liāzes funkcionalitātei vitāli nozīmīgs ir aktivējošais enzīms CutD, kas ģenerē CutC enzīma glicilradikāļa formu (Smaranda Craciun et al., 2014). Ierosinātā enzīma radikāļa forma tālāk var inducēt H atoma pārnesi no substrāta uz enzīmu, veidojot tilil-radikāli, kas tālāk mijiedarbojas ar holīnu un atšķēļ trimetilamīna grupu, veidojot trimetilamīnu un acetaldehīdu. Tālāk enzīma reciklēšana notiek tāpat kā pārējiem GRE enzīmiem - tiek reģenerēts

tilil-radikālis un iegūtais produkts (trimetilamīns) transportēts prom no reakcijas vietas (Christopher J. Thibodeaux and Wilfred A. van der Donk, 2012).

1.5. BMC čaulu veidojošie proteīni

Bakteriālo mikrokompartmentu nozīmīgākā sastāvdaļa ir tos veidojošie čaulas proteīni - tie veido BMC apvalku, kas pēc savām funkcijām ir analogs fosfolipīdu membrānai eikariotu organelās. Proteīnu čaula norobežo enzīmus no šūnas citosola un piedalās arī to organizācijā.



7. attēls. Mikrokompartmentu čaulu veidojošie enzīmi. Visiem proteīniem atsevišķās polipeptīdu ķēdes iekrāsotas dažādās krāsās. a) BMC-H heksamēra PduA (Protein Data Bank ID: 3NGK) attēlojums, b) BMC-T pseidoheksamēra CsoS1D (Protein Data Bank ID: 3F56) attēlojums; redzams arī potenciālais plūsmas regulācijas mehānisms ar abiem poras stāvokļiem (atvērta un aizvērta), c) Pentamēra CcmL (Protein Data Bank ID: 2QW7) attēlojums. Saīsinājumi: BMC-H- proteīnu heksamērs ar vienu PF00936 domēnu; BMC-T-proteīnu trimērs ar diviem PF00936 domēniem; BMC-P- pentamērs ar vienu PF03319 domēnu (Cheryl A. Kerfeld and Onur Erbilgin, 2015).

Figure 7. Known building blocks of bacterial microcompartment (BMC) shells. For all proteins, individual polypeptide chains are colored differently. a) Views of PduA (Protein Data Bank ID: 3NGK) BMC-H protein; b) Views of CsoS1D (Protein Data Bank ID: 3F56) BMC-T protein. View also shows the potential gating mechanism; c) Views of CcmL (Protein Data Bank ID: 2QW7) BMC-P protein. Abbreviations: BMC-H, a hexamer of proteins containing a single PF00936 domain; BMC-T, a trimer of proteins containing two PF00936 domains; BMC-P, a pentamer formed by proteins containing one PF03319 domain (Cheryl A. Kerfeld and Onur Erbilgin, 2015).

Visu bakteriālo mikrokompartmentu čaulas neatkarīgi no to iekšienē notiekošajām reakcijām veido savstarpēji homologi proteīni. Diviem no BMC veidojošajiem proteīniem raksturīgs Pfam00936 domēns - aptuveni 80 aminoskābju atlikumu gara sekvence, kas tiek saukta arī par bakteriālo mikrokompartmentu domēnu (*BMC domain*). Šo domēnu kodējošie gēni BMC gēnu klāstros atrodami vairākās kopijās (Cheryl A. Kerfeld et al., 2010). Līdz šim konstatēti trīs veida proteīni, kas iesaistīti mikrokompartmenta veidošanā - proteīni ar vienu Pfam00936 domēnu veido heksamērus (BMC-H), proteīni ar diviem savienotiem Pfam00936 domēniem veido pseidoheksamēriskus trimērus (BMC-T), un trešās grupas proteīni veido pentamērus (BMC-P) un satur Pfam03319 domēnu, kas sastopams visiem mikrokompartmentu uzbūvē iesaistītajiem pentamēriem (7. attēls).

Visu trīs veidu mikrokompartmentus veidojošo proteīnu pirmās struktūras tika iegūtas, analizējot karboksisomas veidojošos proteīnus. Kā pirmā tika noteikta BMC-H proteīnu struktūra, analizējot cianobaktēriju *Synechocystis* sp. PCC 6803 mikrokompartmentu veidošanā iesaistītos CcmK2 un CcmK4 proteīnus (7. attēls A). Visās trijās pētījumā vizualizētajās struktūrās tika konstatēts, ka proteīnu subvienības veido simetriskus, plakanus heksamērus un tās novietojušās cieši blakus viena otrai, atstājot tikai mazu atvērumu heksamēra centrā (konkrētajā pētījumā poru diametrs 7 Å CcmK2 un 4 Å CcmK4 heksamēriem). Struktūras analīze atklājusi arī to, ka ap centrālo poru koncentrēts liels pozitīvs elektrostatisks potenciāls - katrai no subvienībām uz poras pusi vērsts pozitīvs konservatīvs aminoskābes atlikums, kas, visticamāk, iesaistīts metabolītu plūsmas regulācijā caur proteīnu čaulu (Cheryl A. Kerfeld et al., 2005). Pētījumos ar PDU-BMC kompartmentu BMC-H proteīniem konstatēts, ka heksamērisko proteīnu poras ir pasīvas un vieglāk laiž cauri hidrofilākus savienojumus. Tā kā PDU-BMC substrāts 1,2-propāndiols ir hidrofilis, tas spēj viegli iekļūt kompartmentā, ļaujot veiksmīgi norisināties reakcijai. Propāndiola šķelšanas produkts propionaldehīds ir daudz hidrofobāks, tādēļ nespēj izkļūt cauri BMC-H porām un paliek kompartmentu iekšienē (Chiranjit Chowdhury et al., 2015). Līdz šim aprakstītie BMC-H heksamērus veidojošo proteīni ir vidēji 90-120 aminoskābju gari.

Pirmajos BMC-P pentamērisko proteīnu strukturālajos pētījumos tika izmantoti hemoautotrofo baktēriju *Halothiobacillus neapolitanus* proteīns orfA un cianobaktērijās *Synechocystis* sp. PCC 6808 atrodamais homologais proteīns CcmL. Iegūtajās kristālu struktūrās abi proteīni veidoja pentamērus ar mazu poru struktūras centrā - tās diametrs ~3,5 Å OrfA un ~5 Å CcmL proteīnu veidotajiem pentamēriem (7. attēls C). Pentamēriem ir nozīmīga loma BMC regulārās formas veidošanā - tie veido ikosaedriskā kompartmenta virsotnes, savienojot no heksamēriem un pseidoheksamēriem veidotās plaknes (Shiho Tanaka et al., 2008).

Pseidoheksamērisko BMC-T proteīnu pirmajos strukturālajos pētījumos tika izmantoti okeānos izplatītāko fotosintezējošo organismu, *Prochlorococcus* ģints cianobaktēriju, genomā esošais un α -karboksomas veidojošais proteīns CsoS1D. Kristalizēto proteīnu struktūras pētījumi atklāja, ka proteīni satur divus sapludinātus BMC domēnus (saukti par N-BMC un C-BMC), un tie ir garāki par BMC-H sastāvā esošajiem proteīniem – šī tipa proteīnus veido vairāk kā 200 aminoskābju atlikumi (7. attēls B). Tā kā CsoS1D (un arī citu pseidoheksamērus veidojošo proteīnu) sekvencē ir divi BMC domēni, proteīnam ir 3 subvienības, kas veido pseidoheksamērisku formu. Šie pseidoheksamēri saistās pāros ar plaknēm vienam pret otru, veidojot ortorombisku struktūru (Michael G. Klein et al., 2009). Pseidoheksamēriskās formas BMC proteīni spēj pakoties kopā ar heksamēriskajiem proteīniem, un kopā ar tiem veido mikrokompartmenta plaknes.

Nozīmīga loma BMC čaulas funkciju uzturēšanā un metabolītu plūsmā caur čaulu ir pseidoheksamērisko trimēru (BMC-T) veidotajām porām. Analizējot CsoS1D BMC-T kristāliskās struktūras, tika atklāts, ka atkarībā no kristāla formas, pseidoheksamērisko trimēru veidotās poras ievērojami atšķiras. Analizējot vienu kristāla formu, tika konstatētas poras atvērtā formā, kur starp trimēriem izveidojies atvērums ~ 14 Å diametrā, taču otrā formā poras bija aizvērtas, kur izveidojies sāls tiltnis starp konservatīviem poras malā esošiem aminoskābju atlikumiem efektīvi likvidēja atvērumu. Detalizētāk izpētot abu veidu BMC-T veidojošos proteīnus, tika konstatēts, ka tiem ir ievērojamas poru sānu ķēžu konformācijas atšķirības (Michael G. Klein et al., 2009). Analizējot citu BMC-T proteīnu- CcmP, kas ir viena β -karboksomas čaulas sastāvdaļām-, tika novērotas poras, kuras atrodas pusatvērtā stāvoklī. Šādā stāvoklī viena no dimēru formas proteīnu porām ir atvērta, bet otra aizvērtā (Fei Cai et al., 2013).

Pseidoheksamērisko BMC-T īpašība mainīt poru diametru liecina par šo proteīnu spēju daudz efektīvāk par BMC-H regulēt metabolītu plūsmu caur mikrokompartmenta čaulu. Pētījumos ar etanolu utilizējošo kompartmentu BMC-T proteīniem atklāts, ka cinka piesaiastīšanās pie proteīna izraisa ievērojamas konformācijas izmaiņas, kas noved pie poras atvēršanās. Proteīniem bez cinka klātbūtnes bija novērojamas trīs mazas poras, kas simetriski novietojušās katrā subvienībā un, visticamāk paredzētas mazu, pozitīvi lādētu molekulu nokļūšanai kompartmentā (Martin Sagermann et al., 2009). Piesaistoties cinkam, konformācijas maiņas dēļ izveidojās viena centrālā pora ar diametru $\sim 8,6$ Å, kurai ir spēcīgs pozitīvs elektrostatiskais lādiņš. Spēcīgais pozitīvais potenciāls poras iekšienē var liecināt, ka poras ne tikai filtrē specifiska izmēra un lādiņa molekulas, bet arī var palīdzēt poras tuvumā akumulēt un uzkrāt specifiskas molekulas, kas sekmē pasīvo transportu caur kompartmenta čaulu (Mihoko Takenoya et al., 2010).

1.6. BMC izveidošanās mehānismi

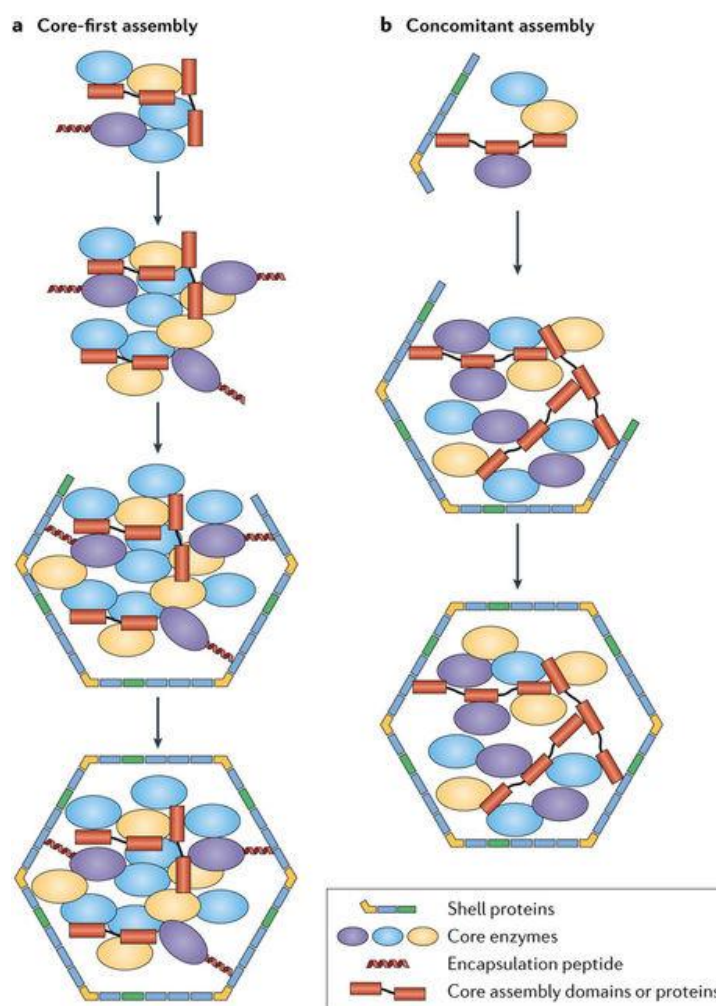
Proteīnu čaulas veidošanās bakteriālo mikrokompartmentu eksistencē ir kritiski nozīmīga - bez čaulas kompartments nav funkcionāls, kompartmentu enzīmu reakciju ātrums ievērojami samazinās, vienlaikus ar toksiskajiem un gaistošajiem starpproduktiem kaitējot pašam organismam. Visu bakteriālo mikrokompartmentu čaulas enzīmi ir visai konservatīvi, taču to enkapsulēto enzīmu ir ļoti daudz un tie savstarpēji ir ļoti daudzveidīgi. Plašais ar BMC saistīto enzīmu klāsts ir novedis pie jautājuma, vai eksistē viens universāls mehānisms, saskaņā ar kuru izveidojas visi bakteriālie mikrokompartmenti. BMC savākšanās principi līdz šim tikuši visvairāk pētīti, izmantojot α -karboksissomas un β -karboksissomas. No līdzšinējiem pētījumiem ir saprotams, ka abu veidu karboksissomu izveidošanās notiek atšķirīgi - β -karboksissomām pirmais izveidojas enzīmu kodols, ko pēc tam ietver proteīnu čaula, bet α -karboksissomu veidošanās procesā kodols un apvalks savācas vienlaikus (Cheryl A. Kerfeld et al., 2018).

Papildus tam, pētījumos arī atklāts, ka BMC veidošanos inducē kompartmenta raksturenzīma (signature enzyme) N vai C galā esoša īsa sekvenca, ko sauc par enkapsulācijas peptīdu. Sākotnēji tika noskaidrots, ka Pdu BMC veidošanos nodrošina šiem kompartmentiem raksturīgā enzīma propionaldehīda dehidrogenāzes (PduP) N-terminālajā galā esoša 10-14 aminoskābju gara sekvenca. Šīs sekvences delēcija izraisīja strauju kompartmentu daudzuma samazināšanos paraugos (salīdzinājumā ar natīvās sekvences ekspresiju), taču neietekmēja paša enzīma efektivitāti (Chenguang Fan et al., 2010). Vadoties pēc šī un vēl vairāku pētījumu rezultātiem, ir izvirzīta teorija, ka sastopamās terminālās sekvences funkcija ir ne tikai nodrošināt kompartmentu veidošanos, bet arī novirzīt pašus enzīmus uz kompartmentiem.

β -karboksissomām raksturīgais BMC izveidošanās mehānisms tika pētīts, analizējot divu specifisku, konservatīvu un β -karboksissomām raksturīgu proteīnu domēnus, par modeļorganismu izmantojot cianobaktēriju *Synechococcus elongatus*. Šie proteīni - CcmM un CcmN - abi atrodas *ccm* operonā, savā starpā mijiedarbojas un ir obligāti nepieciešami karboksissomas izveidē - ekspresējot karboksissomu proteīnus no celma ar deletētiem šo proteīnu domēniem, bakteriālie mikrokompartmenti nav novērojami, bet tā vietā izveidojas tikai viens liels proteīnu agregāts (Jeffrey C. Cameron et al., 2013). Šādām baktērijām bez karboksissomām nepieciešams augstāks CO₂ līmenis, kas arī parasti tiek izmatots kā pazīme karboksissomu zudumam vai skaita samazinājumam (Cheryl A. Kerfeld et al., 2018).

Bakteriālo mikrokompartmentu veidošanās mehānisma izpētē tika izmantota iespēja fluorescenti iezīmēt BMC iekšienē esošās molekulas bez traucējumiem kompartmentu darbībā, ar fluorescento SNAP polipeptīda tagu iezīmējot β -karboksissomālo RuBisCO. Tas ļāva vizualizēt karboksissomu izveidošanās mehānismu - jaunas karboksissomas kolokalizējas blakus

jau funkcionāliem kompartmentiem, sākotnēji izveidojoties RuBisCO un pārējo kodola enzīmu agregātam, ko pēc tam strauji apņem apvalka proteīni (8. attēls A). Rezultātā izveidojas funkcionāla β -karboksisoma, kurai drīz blakus sāk veidoties atkal jaunas karboksisomas (Anna H. Chen et al., 2013). Šāda stratēģija, iespējams, šūnās tiek īstenota enerģijas taupīšanas nolūkos - kopējais karboksisomu pavadītais laiks nepilnīgā stāvoklī ir īsāks un BMC var ātrāk sākt iesaistīties šūnas enerģijas apritē.



8. attēls. Bakteriālo mikrokompartментu izveidošanās ceļu shēmas. A) BMC izveidošanās ceļš ar sākotnēju kodola agregāciju- kodola proteīni ar proteīnu domēnu mijiedarbību palīdzību izveido agregātus, un enkapsulācijas peptīdi pēc tam piesaista kodola proteīnus, izveidojoties apvalkam. B) BMC izveidošanās, kodolam un apvalkam veidojoties vienlaicīgi- kodola un apvalka proteīni sapakojas kopā pateicoties kodola sapakošanās proteīniem (Cheryl A. Kerfeld et al., 2018).

Figure 8. Schematics of bacterial microcompartment assembly pathways. A) Core -first assembly: core proteins unite together through protein domain interactions or aggregation of encapsulation peptides. Afterwards encapsulation peptides interact with shell proteins, which then form the shell around the core. B) Concomitant assembly: core and shell proteins assemble together with the help of core assembly proteins (Cheryl A. Kerfeld et al., 2018).

Atšķirīgs izveidošanās process novērojams α -karboksisomām. Ar elektronu kriotomogrāfijas (ECT) palīdzību pētot *Halothiobacillus neapolitanus*, kā arī vairākos citos hemolitotrofos organismos sastopamās α -karboksisomas, tika iegūta informācija par šī veida bakteriālo mikrokompartmentu izveidi funkcionējošās šūnās. ECT attēlos tika novērotas daļēji izveidojušās karboksisomas, kur pie čaulas proteīniem bija piesaistījušās arī RuBisCO molekulas (Cristina V. Iancu et al., 2010). Šis novērojums ļāva secināt, ka α -karboksisomu veidošanās procesā kodols un apvalks veidojas vienlaikus (8. attēls B). Šī tipa karboksisomu uzbūvē nozīmīga loma ir čaulas proteīnam CsoS2, kura trīs domēni - N-terminālais, vidus un C-terminālais domēns- katrs pilda nozīmīgu funkciju α -karboksisomas izveidē. N-terminālais reģions rekrutē galveno čaulas proteīnu, palielinot tā koncentrāciju tik daudz, līdz tā pārsniedz sliekšni, kad sākas kompartmenta veidošanās process. Vienlaikus vidējais reģions saistās ar RuBisCO un C-terminālais reģions piesaista kodola proteīnus čaulai (Fei Cai et al., 2015).

Analizējot karboksisomu izveidošanās procesu *in silico*, galvenās atšķirības abos modeļos radīja mijiedarbību stiprums starp kodola subvienībām. Ja savstarpējās kodola subvienību mijiedarbības ir vājas, novērojams α -karboksisomām raksturīgais kompartmentu veidošanās process, bet ja mijiedarbības ir stiprākas, process vairāk līdzinās β -karboksisomām (Jason D. Perlmutter et al., 2016). Metabolosomu izveidošanās process eksperimentāli vēl nav aplūkots, taču BMC-P proteīnu filoģenētiskā analīze un kodolā sastopamo molekulu salīdzinājums liecina, ka metabolosomu izveidošanās process varētu būt līdzīgāks β -karboksisomu izveidošanās mehānismam. Daudziem metabolosomu enzīmiem konstatēti enkapsulācijas peptīdi, kas aktīvi darbojas kompartmentu veidošanās procesā, iespējams, nodrošinot gan mijiedarbības starp kodola enzīmiem, gan arī piesaistot kodolam čaulas proteīnus (Cheryl A. Kerfeld et al., 2018).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1. Vielas

Agarozes -Top Vision™ (Thermo Fisher Scientific, ASV);
Akrilamīds (Sigma, ASV);
Amonija sulfāts (Sigma-Aldrich, Vācija);
Ampicilīns (Medochemie Ltd, Kipra);
Arabinoze (Sigma, ASV);
Bromfenolzilais (Merck, Vācija);
Coomasie brijantzilais G-250 (AppliChem, Vācija);
DMSO (AppliChem, Vācija);
EDTA (etilēndiaminotetraacetāts) (Sigma, ASV);
Etiķskābe (Sigma-Aldrich, Vācija);
Etanols, 96 % (Jaunpagasts Plus, Latvija);
Etīdija bromīds (AppliChem, Vācija);
Glicerīns, >99% (AppliChem, Vācija);
Glicīns (Sigma, ASV);
HiDi™ formamīds (Applied Biosystems, ASV);
Imidazols (Sigma, ASV);
IPTG (Thermo Fisher Scientific, ASV);
Kanamicīns (Medochemie Ltd, Kipra);
Lizocīms, liofilizēts (Biolar, Latvija);
β-merkaptotetanols (Prolabo, Beļģija);
N,N-metilēnbisakrilamīds (Sigma, ASV);
Nātrija dodecilsulfāts (SDS) (Sigma, ASV);
Nātrija hidroksīds (AppliChem, Vācija);
Nātrija hlorīds, kristālisks (Chempur, Polija);
Rauga ekstrakts (Difco, ASV)
TEMED (Sigma, ASV);
Tris (trīs(hidroksimetil)aminometāns) (Prolabo, Beļģija);
Tritons X-100 (tert-oktilfenol(etilēnoksis) x) (Serva, Vācija);
Uranilacetāts.

2.1.2. Šķīdumi un geli

1 M IPTG šķīdums ūdenī;

1 M Tris-HCl, pH 8,0;

10 % amonija persulfāta šķīdums ūdenī;

5 M NaCl šķīdums ūdenī;

10 mM dNTP;

5 M imidazols;

5 mg/mL Etīdija bromīds;

70%, 20% Etanols;

piesātināts amonija sulfāts;

10x PBS;

10x GST;

50x TAE.

Līdzsvarošanas šķīdums metālu afinitātes hromatogrāfijai:

300 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Skalošanas šķīdums metālu afinitātes hromatogrāfijai:

20 mM imidiazols, 300 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Eluēšanas šķīdums metālu afinitātes hromatogrāfijai:

300 mM imidazols, 300 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0;

Lizēšanas buferšķīdums:

40 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 20 mM MgSO₄, 1% Tritons-X, 1mM DTT, 1 mM PMSF.

Šķīdumi poliakrilamīda gela elektroforēzei:

Poliakrilamīda gela elektroforēzes 10x buferšķīdums: 144,1 g glicīns, 30,2 g Tris, 10 g Nātrija dodecilsulfāts, destilēts H₂O līdz kopējam tilpumam 1 L. Lietošanai elektroforēzē buferšķīdumu 10x atšķaida ar destilētu H₂O.

30 % Poliakrilamīda pamatšķīdums: 0,8 g bis-akrilamīds, 30 g akrilamīds, destilēts H₂O līdz tilpumam 100 mL.

Akrilamīda sakoncentrējošais šķīdums 2 geliem (4 %): 60,08 ml destilēts H₂O, 25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 13,3 ml 30% pamatšķīdums, 1 mL 10% SDS, pirms lietošanas 3 mL šķīdumam pievieno 2,5 µL TEMED un 15 µL 10% amonija persulfāta.

Akrilamīda sadalošais šķīdums 2 geliem (15 %): 6 ml 30 % akrilamīda pamatšķīdums, 2,8 mL H₂O, 120 µL 10 % SDS, 3 mL 1,5 M Tris – HCl pH 8,8, 8 µL TEMED un 60 µL 10% amonija persulfāta.

Laemli paraugu uznešanas buferšķīdums poliakrilamīda gela elektroforēzei:

1 % SDS, 40 mM Tris – HCl pH 8,0, 0,05 % bromfenolzilais, 2 % β-merkaptotetanolis;

Poliakrilamīda gela fiksācijas šķīdums: 600 mL destilēts H₂O, 300 mL etanols, 100 ml etiķskābe.

Šķīdums poliakrilamīda gelu krāsošanai: 8 mL 50% trihloretikskābe, 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G250, 12 mL 96% etanols, H₂O līdz 200 mL.

Šķīdumi agarozes gela elektroforēzei:

50xTAE buferšķīdums: 2 M Tris, acetāts pH 8,3, 50 mM EDTA un dH₂O līdz kopējam tilpumam 1 L, lietošanai agarozes gela elektroforēzē atšķaita 50x ar dH₂O.

1 % agarozes gels ar pievienotu etīdija bromīdu: 2g agarozes pulvera, 1x TAE buferšķīdums līdz 200 mL, 5 µL etīdija bromīds (1mg/mL).

2.1.3. Izmantotie *E. coli* celmi

XL1 – Blue;

BL21 (DE3)

2.1.4. Plazmīdas un vektori

pRSF-TEV Duet (Novagen, DĀR);

pETDuet-1 (Novagen, DĀR)

2.1.5. *E. coli* barotnes

2x TY šķidrā barotne: 16 g/L triptons, 10 g/L rauga ekstrakts, 5 g/L NaCl, antibiotika 50 mg/L;

LB šķidrā barotne: 10 g/L triptons, 5 g/L rauga ekstrakts, 10 g/L NaCl, antibiotika 50 mg/L;

1,5 % agarizētā LB barotne.

2.1.6. Enzīmi un to buferšķīdumi

Restriktāzes *Nco* I, *Hind* III, *Nde* I, *Xho* I (visas FastDigest), 10x FD buferšķīdums, 10x FD Green buferšķīdums (Thermo Fisher Scientific, Lietuva).

T4 DNS ligāze, 10x DNS ligāzes buferšķīdums (ThermoFisher, Lietuva)

2.1.7. Oligonukleotīdi PCR reakcijām

BMC1_Fw- ATATCCATGGGTGATGCATTGGGGC

BMC1_Rv- ATATAAGCTTTTAGGCCTTGTGTTAATGACGATTTTG

BMC2_Fw- ATATCCATGGGTGATGCATTAGGTCTGATTG

BMC2_Rv- ATATAAGCTTTTAGTCCGCAATCTTGTAATGCG

BMC3_Fw- ATATCCATGGCCAAAGAAGCGCTTGGTCTTATCGAAAC

BMC3_Rv- ATATAAGCTTTTATGCTTTGTGCTGCGCCG

BMC4_Fw- ATATCCATGGCCAAAAGTTTAGGCGTAATTGAAACGC

BMC4_Rv- ATATAAGCTTTTATGACTTCTTCCCTTTCTTCAGCGCCGG

Eutn_Fw- ATATCCATGGTGCTCGCAAAGGTAACCGGCC
Eutn_Rv- ATATAAGCTTTTACTCCTGTTTCGGTGTCCCGAAAC
3xBMC_Fw- ATATCCATGGGTGATGCATTGGGGCTTATCGAAACCAAAG
3xBMC_Rv- ATATAAGCTTTTATGCTTTGTGCTGCGCCGCGATTTTTTCG
AldDH_Fw- ATATCCATGGTTGAACTGGATAACGATTTGCAGTCC
AldDH_Rv- ATATAAGCTTTTACTTAGCAAGGCGCTCCAGC
AlcDH_Fw- ATATAGATCTATGAGTGAATTTTTACTGAAACCGCG
AlcDH_Rv- ATATAAGCTTTTACCCGTAGGCCCGCGC

2.1.8. Citi reaģenti un komplekti

DNS uznešanas buferšķīdums analīzēm agarozes gēlos:

6x Mass Loading Dye Solution (Thermo Fisher Scientific, ASV).

Terminatoru maisījums DNS sekvenēšanai:

BigDye v 3.1. (MCLAB, Vācija).

Molekulmasas marķieri elektroforēzei:

DNS elektroforēzei: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ASV).

Proteīnu elektroforēzei poliakrilamīda gēlā: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, ASV).

Komplekti DNS izdalīšanai:

GeneJET Pasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, ASV).

GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, ASV).

Matrikss masspektrometrijai:

DHAP (Sigma, ASV).

Precipitantu komplekti proteīnu kristalizācijai:

JCSG-plus™ HT-96, Structure Screen 1&2 HT-96, PACT premier™ HT-96, ProPlex HT-96 (Molecular Dimensions, ASV).

2.1.9. Aparatūra un iekārtas

Agarozes gēla UV vizualizācijas iekārta C-80 Epi Illumination UV Darkroom (UVP Cambridge, Anglija).

Automātiskās pipetes Eppendorf 2,5 µL, 10 µL, 100 µL, 1000 µL, 10 mL (regulējamās) (Eppendorf AG, Vācija).

Augstas izšķirtspējas proteīnu šķīduma hromatogrāfijas sistēma ÄKTAprime Plus (Amersham Biosciences, Zviedrija).

Centrifūgas:

Centrifuge 5418R (Eppendorf AG, Vācija);

Centrifuge 5424 (Eppendorf AG, Vācija);

Centrifuge 5804 R (Eppendorf AG, Vācija);

Mini Spin AG 22331 (Eppendorf AG, Vācija);

K 26 D (Krievija);

Optima L-100XP ultracentrifuge, Sw 32Ti rotor (Beckman Coulter, ASV).

Elektroforēzes iekārtas:

GH – 100 (Biophile, Zviedrija);

OmniPAGE mini (Clever Scientific Ltd, Lielbritānija).

Barošanas bloks LKB (Pharmacia, Zviedrija).

Elektroniskie svāri KERN EG420-3NM, Kern & Sign GmbH (Kern, Vācija).

Elektronmikroskops JEM-1230 (Jeol, Japāna).

Gēlfiltrācijas kolonnas:

Superose 6 10/600 GL (GE Healthcare, Zviedrija);

Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Zviedrija).

Kratītājs Multitron Standart (Infors HT, Šveice).

Ledusskapis (Snaige, Lietuva).

Metālu afinitātes hromatogrāfijas kolonna HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare, Zviedrija).

Orbitālais maisītājs PSU-10i (Biosan, Latvija).

PCR iekārta Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, ASV).

pH-metrs AM1605 (Adrona, Latvija).

Spektrofotometri:

Cφ-26X J42 (Krievija);

NanoDrop ND-1000 (Thermo scientific, ASV).

Termobloks Thermo block TDB-120 (BIOSAN, Latvija).

Ultraskaņas dezintegrators UP 200S Ultrasonic Processor (Hielscher Ultrasonics, Vācija).

Vorteksēšanas iekārta VortexGenie 2T (Scientific Industries, ASV).

2.1.10. Citi materiāli

Elektronmikroskopijas sietiņi parauga adsorbcijai, *mesh* 200 vai 300.

Nitrila cimdi, (Klinion, Nīderlande).

Proteīna koncentrēšanas stobriņi 10 kDa cutoff Amicon concentrator (Merck, Vācija).

Pipešu uzgaļi 0.1-10 µl, 100 µl, 1000 µl, 10 ml (Sarstedt, Vācija).

Skalpeļi (Feather, Japāna).

Šļirces 2 mL un 5 mL (Chirana, Slovākija).

Stikla pipetes 0,5 mL, 1 mL, 5 mL, 10 mL.

Stobriņi 0,5 mL, 1,5 mL, 5 mL, *falcon* tipa 15 mL un 50 mL (Sarstedt, Vācija).

2.2. Metodes

2.2.1. Mutāciju ieviešana, izmantojot PCR

PCR izmanto, lai izraisītu specifiskas mutācijas divpavedienu DNS sekvencē. Šim nolūkam izmanto praimerus - mutagēnus oligonukleotīdus, kas spēj piesaistīties pie DNS un izraisīt vēlamo gēnu sekvences izmaiņu.

- 100 µL mikromēģenē tiek sagatavots reakcijas masījums:
 - 40 µL H₂O;
 - 5 µL 10x Pfu bufera + 20 mM MgSO₄;
 - 1 µL tiešā mutagēnā praimera, 100 µM;
 - 1 µL reversā mutagēnā praimera, 100 µM;
 - 1 µL plazmīdas ar konkrētā bakteriālo mikrokompartmentu proteīna sekvences insertu;
 - 1 µL 10 mM dNTP maisījums;
 - 1 µL Pfu polimerāze 2,5 U/µL.
- Pfu polimerāzi nepieciešams pievienot pēdējo tās eksonukleāzes īpašību dēļ, lai maksimāli tiktu novērsta nevajadzīga DNS depolimerizācija.
- Uztāda PCR automātiskā termostata režīmu pēc sekojošas shēmas.

PCR uzstādījumu shēma mutāciju ieviešanai.

1. tabula

Table 1

Scheme of PCR settings for mutagenesis.

Temperatūra, °C	Ilgums, s	Ciklu skaits
96	180	1
96	30	35
55	30	
72	120	
72	600	1
4	līdz parauga izņemšanai	

- Vajadzības gadījumā mikromēģenes pēc izņemšanas uzglabā -20 °C temperatūrā.

2.2.2. DNS elektroforēze agarozes gelā

Agarozes gela elektroforēzi izmanto nukleīnskābju (DNS un RNS) analīzei. Tā ir efektīvākā metode dažāda garuma nukleīnskābju sekvenču atdalīšanai. Nukleīnskābju sastāvā esošās fosfātgrupas neitrālā vai sārmainā vidē ir lādētas negatīvi, tādēļ elektriskajā laukā kustas pozitīvā anoda virzienā. Molekulu pārvietošanās ātrumu elektriskajā laukā ietekmē gan tās lādiņš, gan izmērs, jo gela poras veido pretestību lielāka izmēra nukleīnskābēm, kā rezultātā tās pārvietojas lēnāk. Lādiņa un izmēra ietekmē nukleīnskābju molekulas veic dažādu attālumu anoda virzienā, kā rezultātā paraugā esošās nukleīnskābes viena no otras atdalās un gelā veido zonas. Mainot agarozes koncentrāciju gelā, iespējams izmainīt poru izmērus.

- Pagatavo gelu ar 1% agarozes koncentrāciju, šķīdinot 1 g agarozes 99 mL 1x TAE bufera. Maisījumu mikroviļņu krāsnī uzkaršē līdz viršanas temperatūrai, agarozī izšķīdinot buferī. Nedaudz atdzēsētā agarozes gelam pievieno 2 µL etīdija bromīda. Šķīdumu ielej gela pagatavošanai paredzētā rezervuārā aptuveni 4-7 mm biezumā.
- Pēc gela atdzišanas un sacietēšanas to pārnes elektroforēzes iekārtā un iekārtu piepilda ar 1x TAE buferi, lai tas pārklātu gela virsmu.
- Gela bedrītēs uznes analizējamus paraugus. Paraugiem pirms tam jāpievieno uznešanas krāsa 6x Loading Dye vai glicerīns.
- Elektroforēzes iekārtai uzliek vāku, pieslēdz strāvas avotu un ieslēdz strāvu. Strāvas stiprumam vajadzētu būt 90-120 mA robežās. Paaugstinot strāvas stiprumu, gels var izkust.
- Pēc krāsas kustības gelā nosaka elektroforēzes procesa beigas. Procesā ilgumam vajadzētu būt aptuveni 30-40 minūtes.
- Agarozes gelu apskata UV apgaismojumā, lai ieraudzītu nukleīnskābes. Šis process notiek pateicoties etīdija bromīdam, kas piesaistās pie divpavedienu nukleīnskābēm un UV gaismā fluorescē. Ja nepieciešam atdalītās nukleīnskābes no gela izdalīt tālākai izmantošanai, to izdara pēc iespējas ātrāk, lai samazinātu nevēlamu mutāciju veidošanās risku UV starojuma dēļ.
- Strādājot ar etīdija bromīdu, jālieto cimdi, tāpat jāievēro drošības noteikumi darbā ar elektroiekārtām un izmantojot UV starojuma lampu.

2.2.3. DNS izdalīšana no agarozes gela pēc GeneJET™ Gel Extraction Kit protokola

- No agarozes gela pēc elektroforēzes izgriež nepieciešamo zonu, ievieto mikromēģenē un nosver.
- Pievieno saistīšanas buferšķīdumu (Binding buffer) attiecībā 1:1 ar izgrieztās gela zonas masu (zonas svārs mg:bufera tilpums mL). Buferis satur satur haotropisko aģentu, kas

izšķīdina agarozes gelu, denaturē proteīnus un veicina DNS saistīšanos pie kolonnas membrānas.

- Mikromēģeni ievieto termoblokā, inkubē 50 °C temperatūrā 10 minūtes, līdz viss gels izšķīdis buferšķīdumā. Mēģeni ik pēc 1-2 minūtēm vēlams sakratīt, lai paātrinātu gela šķīšanas procesu.
- Šķīdumu pārnes uz GeneJET™ kolonnu, centrifugē 1 min ar ātrumu 13 400 apgriezieni minūtē (apgr./min). Nolej kolonnas caurplūdi.
- Lai samazinātu parauga piesārņojumu, izmanto mazgāšanas buferšķīdumu (Wash buffer). Kolonnai pievieno 700 µL mazgāšanas šķīduma un centrifugē 1 minūti ar 13 400 apgr./min, nolej caurplūdi.
- Tukšu kolonnu ar piesaistītu DNS centrifugē 1 min ar 13 400 apgr./min. Tas nepieciešams, lai atbrīvotos no palikušā mazgāšanas šķīduma uz SiO₂ membrānas, jo tajā esošais etanols var inhibēt enzīmu darbību.
- Kolonnu ievieto jaunā 1,5 mL mikromēģenē. Eluēšanas buferšķīdumu (Elution buffer) mikroviļņu krāsnī uzkarš līdz 60-70°C temperatūrai un 50 µL uzpilina uz kolonnas, maksimāli membrānas centrā.
- Centrifugē 1 min ar 13 400 apgr./min. Savāc eluēto DNS, to glabā -20°C temperatūrā.

2.2.4. DNS šķelšana, izmantojot restriktāzes

Ar restriktāzēm šķeļot vektora DNS, tā galus var padarīt komplementārus gēnu sekvencai, ko nepieciešams ievietot vektorā. Rezultātā vektors tiek sagatavots gēnu klonēšanai vai ligēšanai tajā.

- Sagatavo reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 100 µL:
 - 10 µL FD (*Fast Digest*) buferšķīduma,
 - 2 µL katras nepieciešamās restriktāzes,
 - 45 µL DNS šķīduma,
 - 41 µL dH₂O.
- Inkubē 37°C temperatūrā 30-60 min. Inkubācijas laiks var mainīties atkarībā no izmantoto restriktāžu īpašībām un parauga koncentrācijas. Ja inkubācijas perioda ilgums tiek ievērojami pārsniegts, var notikt kļūdaina sašķelšana.
- Paraugam pievieno 10 µL 6x DNS uznešanas krāsu 6x Loading Dye un analizē paraugu agarozes gela elektroforēzē. Ja restriktācijas maisījumā tiek izmantots FD *Green* buferšķīdums, tad papildus uznešanas krāsas pievienošana nav nepieciešama.
- Nepieciešamo zonu no agarozes gela izgriež un izdala DNS pēc GeneJET™ Gel Extraction Kit protokola.

2.2.5. DNS ligēšana

Metodi izmanto divu lineāru DNS sekvenču kovalentai galu savienošanai. Ar šīs metodes palīdzību iespējams ieklonēt gēnu saturošu sekvenci vektorā.

- Pagatavo ligēšanas maisījumu:
 - 6 μL dH_2O ;
 - 5 μL sašķeltā vektora (20-100 $\text{ng}/\mu\text{L}$);
 - 5 μL sašķeltā fragmenta (20-100 $\text{ng}/\mu\text{L}$);
 - 2 μL 10x T4 ligāzes buferšķīduma;
 - 1 μL 100 mM ATP;
 - 1 μL T4 ligāzes (jāpievieno pēdējā).
- Maisījumu sajauc, izmantojot pipeti, un inkubē istabas temperatūrā 1-2 stundas.
- Iegūto ligēšanas maisījumu tālāk transformē *E. coli* šūnās vai uzglabā -20°C temperatūrā.

2.2.6. Plazmīdu transformēšana *E. coli* šūnās

Metodi izmanto, lai ievietotu ekspresējamo plazmīdu *E. coli* šūnās. Plazmīdu ievietošana šūnā tai piešķir papildu īpašības, piemēram, rezistenci pret konkrētām antibiotikām, kas vēlāk palīdz atlasīt pozitīvos klonus.

- 1,5 mL mikromēģenē ienes 1-5 μL ligēšanas maisījuma, kas satur vektoru ar tajā ieklonēto DNS fragmentu, novieto to ledus vannā.
- Ligēšanas maisījumam pievieno 50-100 μL *E. coli* šūnu suspensijas, kas glabātas -78°C temperatūrā un pirms pievienošanas atkausētas ledus ūdenī. Inkubē 11 min, mikromēģeni turot ledus vannā.
- Veic siltuma šoku, ievietojot 42°C siltā ūdens vannā. PEG šūnas inkubē 120 s, N_2 šūnas- 35 s.
- Pēc siltuma šoka mikromēģenes ievieto atpakaļ ledus vannā, inkubē 2 min.
- Mikromēģenē pievieno 0,9 mL LB barotni un inkubē 37°C temperatūrā 1 stundu, mēģeni ievietojot kolbā un to liekot uz kratītāja ar ātrumu aptuveni 60 apgr./min.
- 100-200 μL šūnu suspensijas izsēj uz agarizētas LB barotnes, kurai pievienota atbilstošā antibiotika (kanamicīns vai ampicilīns). Nepieciešamības gadījumā var izsēt arī šūnu suspensijas koncentrātu.
- Plates inkubē 37°C temperatūrā 16-24 stundas. Pēc tam tās var uzglabāt 4°C temperatūrā.

2.2.7. *E. coli* šūnu pavairošana plazmīdu analīzei un nepieciešamo klonu atlasei

- Ar sterilu, liesmā apdedzinātu kociņu paņēmu vienu koloniju un kociņu iemet mēģenē, kur atrodas 3 mL LB barotnes ar atbilstošu antibiotiku. Tādā veidā no plates paņēmu vairākas kolonijas (katru savā mēģenē).
- Mēģenes ievieto statīvā un iestiprina kratītājā. Inkubē 37°C temperatūrā 16-24 stundas ar kratītāja ātrumu 150-200 apgr./min.

2.2.8. Plazmīdu izdalīšana no *E. coli* šūnām pēc GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit protokola

- Pusi no pavairoto *E. coli* šūnu suspensijas pārnes 1,5 mL mikromēģenē un centrifugē 3 min ar ātrumu 13 400 apgr./min. Nolej supernatantu un atkārti centrifugāciju, stobriņā pārnesot atlikušo šūnu suspensiju. Arī pēc otrās reizes nolej supernatantu, iegūstot tikai plazmīdas saturošās *E. coli* šūnas, kas nosēdušās centrifugācijas laikā.
- Nogulsnēm pievieno 250 µL resuspendēšanas buferšķīduma (Resuspension Solution) un vorteksē, līdz iegūts homogēns šķīdums.
- Pievieno 250 µL lizēšanas šķīduma (Lysis Solution) un apvērš stobriņu 4-6 reizes. Inkubē istabas temperatūrā 2-5 min.
- Pievieno 350 µL neitralizācijas šķīduma (Neutralization Solution) un nekavējoties samaisa šķīdumu, mikromēģeni apvēršot 4-6 reizes.
- Centrifugē 10 min ar 13 400 apgr./min, lai atbrīvotos no nogulsnēm.
- Supernatantu ar pipeti pārnes GeneJET™ kolonnā un centrifugē 1 min ar 13 400 apgr./min, pēc tam nolej caurplūdi.
- Pievieno 500 µL mazgāšanas šķīduma (Wash Solution) un centrifugē 1 min ar 13 400 apgr./min, nolej caurplūdi. Šo soli atkārti divas reizes.
- Centrifugē tukšo kolonu ar piesaistītu DNS 1 minūti ar 13 400 apgr./min, lai atbrīvotos no liekā mazgāšanas šķīduma.
- Kolonu ievieto jaunā 1,5 mL mikromēģenē, pievieno līdz 50 µL eluēšanas buferšķīduma (Elution Buffer), kas iepriekš uzkarsēts līdz ~70°C, inkubē 2 min.
- Centrifugē 2 min ar 13 400 apgr./min. Savāc mikromēģeni ar izdalīto plazmīdu šķīdumu.

2.2.9. Pozitīvo DNS klonu atlase, izmantojot restriktāzes

Metodi izmanto, lai pārlicinātos, ka DNS klonēšana notikusi veiksmīgi. Ja klonēšana notikusi pareizi, izšķēlto gēna fragmentu var vizualizēt agarozes gelā.

- Pagatavo šķelšanas maisījumu:
 - 8 μL plazmīdu DNS,
 - 2 μL FD 10x bufera (lai kopējā tilpumā tas būtu 1x),
 - 1 μL katras nepieciešamās restriktāzes,
 - 8 μL dH_2O .
- Inkubē 15 min 37°C temperatūrā.
- Pievieno atbilstošo tilpumu DNS uznešanas krāsas (6x Loading Dye), ja nepieciešams, un paraugus analizē agarozes gela elektroforēzē.

2.2.10. DNS sekvenēšana

Sekvenēšanu izmanto, lai noteiktu pilno DNS parauga sekvenci un identificētu veiksmīgos klonus.

- 0,2 mL mikromēģenēs pagatavo sekvenēšanas PCR maisījumu:
 - 3 μL analizējamā DNS (0,1-0,2 mg/mL);
 - 3 μL sekvenēšanas buferšķīduma;
 - 1 μL oligonukleotīdu šķīduma tiešajai polimerāzes reakcijai;
 - 12 μL dH_2O ;
 - 0,75 μL BigDye v 3.1. terminatoru maisījuma (pievieno pēdējo).
- Maisījumu samaisa, to vorteksējot.
- Veic PCR pēc sekojošas programmas:

2. tabula

PCR uzstādījumi DNS sekvenēšanai.

Table 2

PCR settings for DNA sequencing.

t, $^\circ\text{C}$	laiks, s	ciklu skaits
95	180	1
95	10	30
50	5	
60	240	
72	300	1
4	līdz paraugu izņemšanai	

Ar tālākajiem soļiem sagatavo DNS paraugus kapilārajai elektroforēzei:

- PCR produktu pārnes 1,5 mL mikromēģenē. Pievieno 16 μL dH_2O un 64 μL 96% etanola. Šķīdumu uzmaisa ar pipeti un vorteksē.

- Centrifugē 15 minūtes 4°C temperatūrā ar ātrumu 13 400 apgr./min, ar pipeti nosūc supernatantu.
- Nogulsnēm pievieno 100 μL 70% etanola DNS atsāļošanai. Šķīdumu uzmaisa un vēlreiz centrifugē 15 minūtes 4°C temperatūrā ar 13 400 apgr./min, nosūc supernatantu.
- Paraugu izžāvē termoblokā 50°C temperatūrā 10 min.
- Izžāvētam paraugam pievieno 11 μL HiDi, vorteksē un īsi nocentrifugē, lai apvienotu pilienus.
- Paraugu karsē 5 minūtes 95°C temperatūrā, pēc tam strauji atdzesē ledus vannā.
- Uzglabā -20°C temperatūrā līdz sekvenēšanai.

2.2.11. Proteīna producēšana *E. coli* BL21-DE3 ekspresijas sistēmā

Sējmateriāla pagatavošana:

- Ar sterilu, apdedzinātu kociņu no Petri plates paņem vienu koloniju. Kociņu iemet kolbā ar LB barotni, kam pievienota atbilstošā antibiotika.
- Kultūru inkubē 24 stundas 37°C temperatūrā bez kratīšanas.

Proteīna producēšana:

- 400 mL 2 TY barotnes iepilda 2 L kolbā, pievieno 400 μL nepieciešamās antibiotikas un 20-30 mL pagatavotā sējmateriāla.
- Inkubē 37°C temperatūrā 1-2 stundas uz kratītāja ar ātrumu 200 apgr./min. Ik pa laikam šūnu suspensijai ar spektrofotometru nomēra optisko blīvumu pie 540 nm viļņa garuma (OD₅₄₀).
- Šūnas inkubē līdz OD₅₄₀ vērtība 1 cm biežam suspensijas slānim sasniedz 0,4-0,5.
- Pēc nepieciešamā OD₅₄₀ sasniegšanas šūnas inducē ar IPTG vai arabinozi atkarībā no plazmīdā esošā promotera. Ar barotnes tilpumu 400 mL inducēšanai jāpievieno 400 μL 1M IPTG vai 4 mL 20% arabinozes.
- Kolbu ievieto atpakaļ termostatā 37°C un krata vēl ~4 stundas.
- Proteīnu produkcija var notikt arī 20°C temperatūrā, tad šūnu augšana notiek lēnāk un produkcijas laiks - ilgāks. Tādā gadījumā šūnu suspensija pirms inducēšanas aptuveni 40 minūtes jāadzesē, kratot termostatā ar 20°C, un tikai tad jāinducē. Pēc inducēšanas kolbu ievieto atpakaļ 20°C un atstāj kratīties uz ~16 stundām.
- Pēc audzēšanas beigām šūnu suspensiju centrifugē 15 minūtes 4°C temperatūrā ar 5000 apgr./min, nolej supernatantu. Nepieciešamības gadījumā iegūto šūnu masu uzglabā -20°C temperatūrā.

2.2.12. *E. coli* šūnu lizēšana

- Šūnu masai pievieno lizēšanas buferi 3-5 mL uz 1 g šūnu pastas. Ar stikla nūjiņu uzsuspendē šūnas un pārlej centrifugācijas stobriņā.
- Stobriņu uzliek uz ledus un pievieno dažus kristālus PMSF un DTT (ditiotreitolu) līdz 1 mM koncentrācijai.
- Lizē ar ultraskaņu, izmantojot ultraskaņas dezintegratoru ar ciklu 0,5 (0,5 s skaņošana, 0,5 s pauze) un amplitūdu 80%.
- Lizātu pēc nepieciešamības sadala vairākos stobriņos un centrifugē 40 minūtes 4°C temperatūrā ar 11 000 apgr./min.

2.2.13. Proteīnu attīrīšana ar metālafinitātes hromatogrāfijas kolonnu

Metālafinitātes hromatogrāfiju var izmantot proteīniem, kam pievienota vairāku (parasti sešu) His sekvenču, ko sauc par His-tag. Ar His-tag palīdzību proteīns piesaistās uz kolonnas esošajiem Ni joniem un tiek imobilizēti.

- Līdzsvaro HisTrap kolonnu ar 4-5 mL 40 mM Tris-HCl un 300 mM NaCl buferšķīdumu.
- Uz kolonnas ar šļirci uznes pēc centrifugētā lizāta supernatantu.
- Skalo kolonnu ar 4-5 mL tā paša buferšķīduma.
- Kolonnu skalo ar 4-5 mL 40 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl un 20 mM imidiazola buferšķīdumu, lai atbrīvotos no vājāk piesaistītiem nevajadzīgiem proteīniem un paaugstinātu eluāta tīrību.
- Proteīnu eluē ar 4-5 mL 40 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl un 300 mM imidiazola buferšķīdumu. Eluātu savāc un izmanto tālākai analīzei vai papildus tīrīšanai.

2.2.14. Denaturējošā poliakrilamīda gela elektroforēze

Šo metodi izmanto proteīnu sadalīšanai pēc to molekulmasām. Elektroforēze notiek nātrija dodecilsulfāta (SDS) klātbūtnē, kas proteīniem piešķir vienmērīgu lādiņu proporcionāli polipeptīdu izmēram. Lai noteiktu polipeptīda aptuveno garumu, elektroforēzi vienlaikus parasti veic gan ar pētāmajiem paraugiem, gan marķieri- proteīnu maisījumu ar zināmām visu komponentu molekulmasām.

- Elektroforēzei paredzētajiem proteīnu paraugiem pievieno Laemmli uznešanas buferšķīdumu attiecībā aptuveni 1:1 ar metālhromatogrāfiju eluētam proteīnam vai atkarībā no proteīna koncentrācijas, rūpīgi apmaisa pipetējot.
- Paraugus karsē 95°C temperatūrā 10 minūtes, lai tajā esošie proteīni tiktu denaturēti.

- Uz poliakrilamīda gela bedrītēs uznes 6 μL marķieri Unstained Protein Molecular Weight Marker un 5-10 μL parauga (atkarībā no proteīna koncentrācijas).
- Elektroforēzes iekārtu pieslēdz strāvai. Strāvas stiprumu noregulē uz 250 mA.
- Veic elektroforēzi 40-60 minūtes līdz krāsas fronte iziet no gela tam apkārt esošajā šķīdumā.
- Gelu izņem no stikliem un fiksē ar fiksēšanas šķīdumu uz kratītāja (~ 80 apgr./min) aptuveni 10-15 minūtes.
- Nolej fiksēšanas šķīdumu, pārlej gelu ar Coomasie zilo krāsvielu, lai tas pārklātu gela virsmu un krāso 5 minūtes.
- Krāsu nolej un gelu atkrāso, kratot ar destilētu ūdeni.

2.2.15. Proteīnu attīrīšana ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju

Metode ļauj proteīnus atdalīt pēc to izmēriem, balstoties uz to atšķirīgo kustības ātrumu sīkporainajās kolonnas matricas granulās. Atšķirībā no poliakrilamīda gela elektroforēzes, proteīni netiek denaturēti un pēc gelfiltrācijas procesa var tikt izmantoti tālāk.

- Hromatogrāfijas iekārtu, pie kuras pievienota gelfiltrācijas kolonna, izskalo ar buferšķīdumu atkarībā no attīrāmā proteīna īpašībām. Atsevišķiem proteīniem izmanto 20 mM Tris-HCl buferšķīdumu, mikrokompartimentu attīrīšanai- 20 mM Tris-HCl un 50 mM NaCl vai 20 mM Tris-HCl un 300 mM NaCl buferšķīdumu. Gelfiltrācijas kolonnu līdzsvaro ar to pašu buferšķīdumu.
- Attīrītu proteīnu šķīdumu uznes uz hromatogrāfijas iekārtas ar šļirci. Maksimālais šķīduma tilpums- 5 mL.
- Atkarībā no izmantotās gelfiltrācijas kolonnas uzstāda atbilstošo plūsmas ātrumu un frakcijas tilpumu.
- Frakcijas savāc 3 mL mēģenēs un izmanto tālākai analīzei vai uzglabā 4°C temperatūrā.

2.2.16. PEG kompetento šūnu sagatavošana

Ar šīs metodes palīdzību iespējams vienā šūnā ietransformēt vairākas plazmīdas un vienlaikus ekspresēt vairākus proteīnus.

- Pagatavo 5 mL sējmateriāla ar *E. coli* šūnām, kas satur vienu no koekspresējamo proteīnu plazmīdām.
- Pavairo šūnas 25 mL LB barotnē, kurai pievieno 250 μL 1M MgSO_4 šķīduma, 125 μL 40% glikozes un 1-2 mL iepriekš sagatavotā sējmateriāla.
- Inkubē 300 mL kolbā 37°C temperatūrā aptuveni 1,5 stundas uz kratītāja ar 200 apgr./min.

- Pēc inkubācijas atdzesē ledus vannā un šūnu suspensiju ielej jau iepriekš atdzesētā centrifugācijas stobriņā.
- Šūnas centrifugē 4°C temperatūrā 5 min ar 6000 g.
- Pēc centrifugācijas nolej šķidrumu, nosusina un novieto otrādi uz salvetes, lai maksimāli atbrīvotos no barotnes. Kad viss šķidrums likvidēts, šūnas novieto uz ledus.
- Šūnu masai pievieno 250 µL barotnes "A", 0,5 mL 80% glicerīna un 1 mL PEG. Šūnas rūpīgi resuspendē un maisījumu homogenizē, to pipetējot.
- Homogēno maisījumu ievieto iepriekš atdzesētās 1,5 mL mikromēģenēs (pa 200 µL katrā) un ievieto saldētavā -78°C temperatūrā.
- Šūnas lietojamas transformēšanai pēc 1 stundas.

2.2.17. Agarizētu LB barotņu pagatavošana

- Agarozes barotni- Pepton Mix- uzsilda ūdens peldē līdz 95°C temperatūrai, lai barotne kļūtu šķidra.
- Pārvieta kolbu 50°C siltā ūdenī un atdzesē.
- Kad barotne atdzisusi līdz 50°C temperatūrai, pievieno antibiotikas- dubultselektīvajām platēm 800 µL ampicilīna un 800 µL kanamicīna, tikai ampicilīna vai kanamicīna selektivitātes platēm 800 µL atbilstošās antibiotikas.
- Barotni samaisa ar antibiotikām un izlej Petri platēs, lai visa plates virsma būtu noklāta.
- Pēc barotņu sacietēšanas, tās apgriez otrādi un žāvē UV gaismā 20-30 minūtes.

2.2.18. Bakteriālo mikrokompartmentu attīrīšana

- Bufēršķīdumu ar 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl un 2 mg/ml lizocīmu pievieno šūnu masai aptuveni 5 mL uz 1 g šūnu.
- Šūnas resuspendē buferšķīdumā un 1 stundu lizē ar lizocīmu, +4°C maisot.
- Lizātu centrifugē 4°C temperatūrā 10 minūtes ar 5000 g.
- Supernatantu nosūc un pārlej ultracentrifugācijas stobriņā. Ja nepieciešams, pievieno papildus buferšķīdumu, lai šķidrums būtu aptuveni 1 cm no stobriņa malas.
- Šķīdums ultracentrifugēts 4°C temperatūrā 3 stundas ar 20 000 apgr./min.
- Pēc ultracentrifugācijas supernatants uzmanīgi nosūkts un nogulsnes izšķīdinātas 5 mL buferšķīdumā. Nogulsnes resuspendē pipetējot un vorteksējot.
- Iegūtais šķīdums centrifugēts 4°C temperatūrā 10 minūtes uz 12 000 g.
- Iegūto supernatantu nosūc un attīra ar gelfiltrācijas metodi, izmantojot Superose 6 10/600 gelfiltrācijas kolonnu.

2.2.19. Proteīnu analīze ar masspektrometrijas metodi

Masspektrometriju izmanto precīzas molekulasmasas noteikšanai. Masspektrometrijas darbības pamatā ir jonizētu molekulu atšķirīgais kustības ātrums elektriskajā vai elektromagnētiskajā laukā atkarībā no to masas. Tā kā process notiek vakuumā, molekulu kustības ātrumu neietekmē to forma, bet gan tikai masas un lādiņa attiecība. Uzzinot precīzu nezināmas molekulas masu, iespējams to identificēt.

- Tīra proteīna vai proteīnu šķīduma maisījumu sagatavo masspektrometrijai.
- 1,5 mL mikromēģenē 1 μL analizējamā parauga šķīduma sajauc ar 1 μL 2% TFA (trifluoretiķskābes).
- Maisījumam pievieno 1 μL matricas DHAP (dihidroksiacetofenola) šķīduma. DHAP šķīdumu pagadavo, 2 mg DHAP izšķīdinot 100 μL etanola un 33 μL amonija citrāta.
- 1 μL peptīdu standarta atsevišķā mikromēģenē sajauc ar 1 μL 2% TFA un 1 μL DHAP.
- 1,5 μL analizējamā parauga un peptīdu standarta uznes uz masspektrometrijas platītes un ļauj maisījumam nožūt.
- Plati ar paraugiem ievieto masspektrometrā, uzstāda paraugu koordinātas un atbilstošo analīzes režīmu.
- Veic mērījumus, ieslēdzot lāzera stara emisiju, un analizē iegūtos grafiskos rezultātus.

2.2.20. Akrilamīda gela proteīna zonu šķelšana ar tripsīnu

Triptiskās šķelšanas metode ļauj masspektrometriskajai analīzei sagatavot paraugus no poliakrilamīda gela zonām, tādējādi dodot iespēju analizēt interesējošo proteīnu bez piemaisījumiem.

- No poliakrilamīda gela ar skalpeli izgriež interesējošā proteīna zonu.
- Gela gabaliņiem pievieno 500 μL 0,2 M amonija hidrogēnkarbonāta (NH_4HCO_3) un 50% acetonitrila (ACN) šķīduma un inkubē 30 °C temperatūrā 1 stundu.
- Šķīdumu nosūc, un procesu atkārti vērē, pēc inkubēšanas šķīdumu vērē nosūcot.
- Gela gabaliņiem pievieno 200 μL acetonitrila un inkubē istabas temperatūrā 20 min.
- Šķīdumu nosūc, vērē atkārtotot iepriekšējo soli, un pēc inkubēšanas šķīdumu rūpīgi nosūc.
- Tripsīna šķīdumam pievieno 10 μL 0,05 M hidrogēnkarbonāta un 10% acetonitrila šķīduma. 20 μL no iegūtā maisījuma pievieno gela gabaliņiem un ļauj šķīdumam iesūkties 20 min.
- Ja pēc 20 min gela gabaliņiem apkārt vairs nav šķīduma, vēl pievieno 5-20 μL tā paša tripsīna šķīduma maisījuma un inkubē 37 °C temperatūrā 3 stundas.

- Ja masspektrometrisko analīzi paredzēts veikt nākamajā dienā, reakcijas maisījumu var iesaldēt.
- Tālāk masspektrometrijas parauga sagatavošanu veic pēc jau iepriekš aprakstītās metodes.

2.2.21. Elektronmikroskopijas paraugu sagatavošana

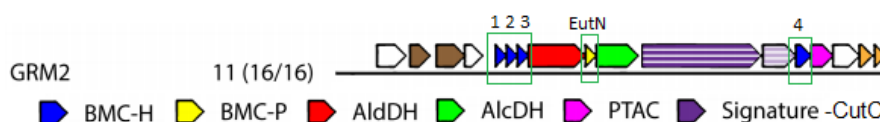
Elektronmikroskopijā attēls tiek iegūts, apstarojot paraugu ar elektronu staru, kas ļauj iegūt daudz augstākas izšķirtspējas un detalizētākus attēlus kā gaismas mikroskopā. Lai paraugus varētu apskatīt mikroskopā, tos nepieciešams atbilstoši sagatavot - paraugi tiek negatīvi krāsoti ar uranilacetātu, lai objekti būtu saskatāmi mikroskopā.

- Uz parafilma uzpilina divus 5 μ L pilienus ar paraugu.
- Uz pilieniem ar pinceti uzliek sietiņus (uz viena mesh 200, uz otra mesh 300) un 3 min ļauj proteīnam adsorbēties uz sietiņa.
- Sietiņus paņem ar pinceti, nosusina uz salvetes un paskalo 1 mM EDTA šķīdumā.
- Sietiņus vēlreiz nosusina un liek 5 μ L pilienā ar uranilacetātu (krāsviela), kas arī uzlikts uz parafilma. Ļauj paraugam krāsoties 1 min.
- Uranilacetātu nosusina saletē un sietiņus atstāj nožūt uz salvetes zem vāciņa uz 30-60 min.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Ar holīna liāzi saistīto bakteriālo mikrokompartmentu pētījumi tika veikti, pamatojoties uz *Klebsiella pneumoniae* GenBank DMC0799 contig00010 anotācijā raksturotajiem genomā kodētajiem BMC veidojošajiem proteīniem (9. attēls).

Eksperimentos tika izmantoti četri heksamēriski BMC-H proteīni, kas anotēti sekojoši GenBank ID: EPO20272.1 (apzīmēts kā 1), GenBank EPO20357.1 (2), GenBank EPO20328.1 (3) un GenBank EPO20271.1 (4). Tika izmantots viens pentamēriskis proteīns EutN, anotēts ar GenBank ID:EPO20293.1. Visi proteīni ir aptuveni 10 kDa lieli - Nr. 1- 9,43 kDa, Nr. 2- 9,62 kDa, Nr. 3- 9,42 kDa, Nr. 4- 13,71 kDa un EutN 9,95 kDa. Pētījumos tika izmantoti arī četri ar bakteriālajiem mikrokompartmentiem saistīti enzīmi - raksturenzīms holīna liāze jeb CutC (GenBank EPO20241.1, 124,08 kDa), alkohola dehidrogenāze jeb AlcDH (GenBank EPO20327.1, 43,23 kDa), aldehīda dehidrogenāze jeb AldDH (GenBank: EPO20366.1, 50,12 kDa) un fosfotransacilāze jeb PTAC (GenBank: EPO20344, apzīmēts ar PduL, 22.197 kDa).



9. attēls. BMC čaulas proteīnu un kodola enzīmu izvietojums GRM2 BMC lokusā.

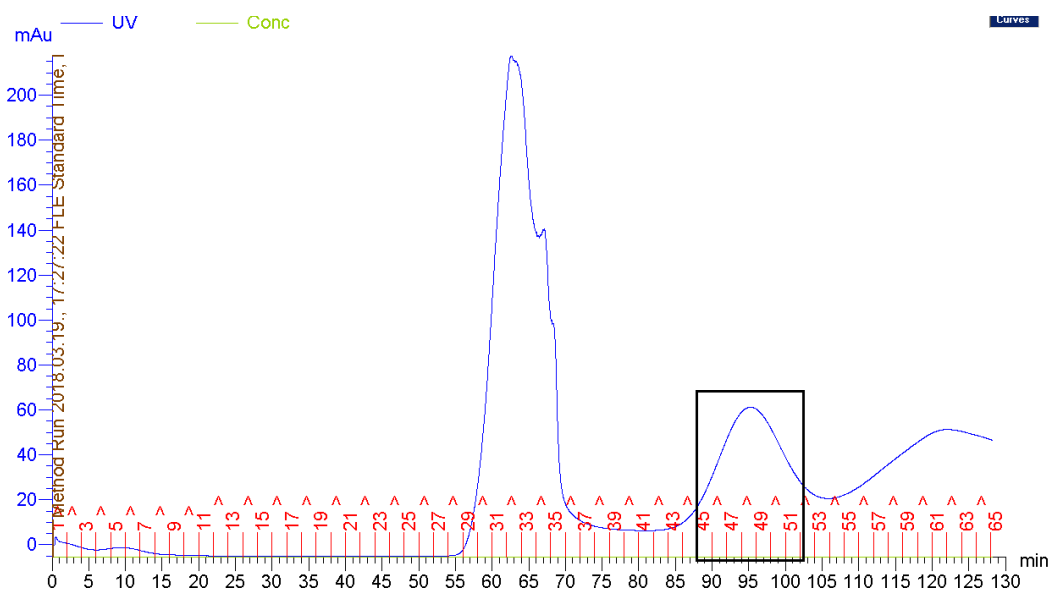
Figure 9. Representation of BMC shell protein and core enzyme placement in GRM2 BMC locus.

3.1. Bakteriālo mikrokompartmentu iegūšana

Lai iegūtu bakteriālos mikrokompartmentus, tika koekspressēti trīs no BMC-H proteīniem un EutN BMC-P proteīns. *Klebsiella pneumoniae* genomā 1., 2., un 3. BMC-H proteīnus kodējošās sekvenses atrodas viena aiz otras ar aptuveni 8-10 nukleotīdu lielām zonām starp tām. Šī iemesla dēļ tos ir iespējams pavairot un ekspresēt kopā, un, visticamāk, arī dabiski šie trīs BMC-H proteīni tiek ekspresēti kopā no policitroniskas mRNS. Sākotnēji 1-3combo klāsteris tika pavairots ar PCR palīdzību (PCR izmantotie oligonukleotīdi sadaļas “Materiāli un metodes” 2.1.7. apakšnodaļā, 24. lpp), fragmenti tika sašķelti ar HindIII un NcoI restriktāzēm un ieligēti pETDuet vektoros (skat. 2. pielikumu), kas šķelti ar tiem pašiem enzīmiem. Arī EutN gēns tika pavairots ar PCR, fragments sašķelts ar *NdeI* un *XhoI* restriktāzēm un ieligēts jau izveidotos 1-3combo-pETDuet konstruktos, kas arī šķelti ar tiem pašiem restrikcijas enzīmiem. Rezultātā EutN proteīns pETDuet plazmīdā atrodas zem otrā T7 promotera un visi bakteriālo mikrokompartmentu producēšanai nepieciešamie proteīni tiek ekspresēti no vienas plazmīdas. Izveidotais konstrukts ar visu nepieciešamo proteīnu sekvencēm ietransformēts *E. coli* BL21 (DE3) celma šūnās un proteīna ekspresijas inducēšana veikta, izmantojot 1mM IPTG.

Bakteriālo mikrokompartmentu attīrīšanas shēma balstīta uz publikāciju, kur attīrīti un analizēti PDU BMC (Gregory D. Havemann and Thomas A. Bobik, 2003). Shēmā veiktas izmaiņas, lai izveidotu efektīvāku un vienkāršāku attīrīšanas protokolu. Sākotnēji šūnu lizēšanai izmēģināta gan metode ar lizocīmu, gan ultraskaņas izmantošanu, taču kā galējā metode tika izvēlēta lizēšana ar lizocīmu. Tā kā lizēšana ar lizocīmu raksturojama kā “maigāka” metode, kompartmenti bija stabilāki un BMC proteīni agregātu pīķī tika novēroti retāk.

Šūnu lizēšanai tika izmantots 20 mM Tris-HCl (pH 8) un 50 mM NaCl buferšķīdums, kam pievienots lizocīms 2 mg/mL. Buferim pievienotais NaCl ir nozīmīgs faktors veiksmīgā bakteriālo mikrokompartmentu izveidē, jo, mēģinot BMC producēt bez sāls klātbūtnes, tie izjuka, čaulas proteīniem veidojot dažāda lieluma agregātus. Šūnas tika suspendētas šajā buferšķīdumā un lizētas 1 stundu +4 °C temperatūrā, šūnu masu nepārtraukti maisot. Iegūtais lizāts centrifugēts 15 min 5000 g, lai atbrīvotos no šūnu paliekām, un supernatants ultracentrifugēts 50000 g 3 stundas, lai bakteriālie mikrokompartmenti sedimentētos. Ultracentrifugācijas nogulsnes tika resuspendētas buferšķīdumā bez lizocīma, nocentrifugētas pie 10000g 10 min, lai atbrīvotos no lielākām daļiņām, kas arī ultracentrifugācijas procesā nogulsņējušās, un kompartmenti tālāk tika attīrīti, izmantojot Superose 6 10/600 gelfiltrācijas kolonnu (10. attēls.)

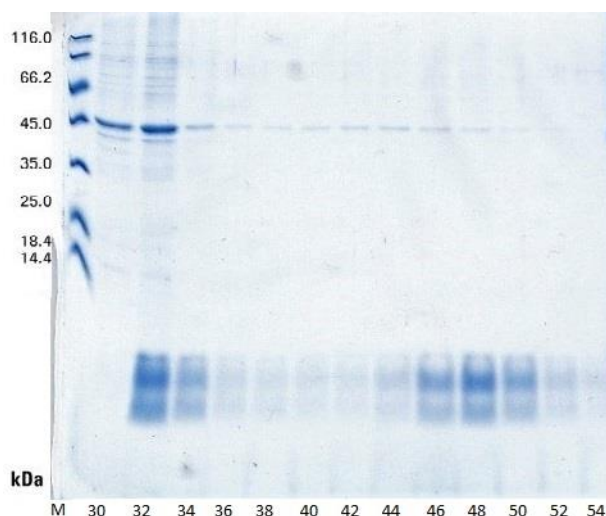


10. attēls. BMC attīrīšana, izmantojot Superose 6 10/600 gelfiltrācijas kolonnu. Atzīmētas frakcijas, kurās atrodami attīrītie BMC.

Figure 10. BMC purification, using Superose 6 10/600 gel filtration column. Marked are fractions in which BMC can be found.

Gelfiltrācijas attēlā lielākais pīķis redzams 30.-35. frakcijā, taču sākot ar 45. frakciju sākās mazāks pīķis, kur pēc lieluma varētu atrasties uniformas bakteriālo mikrokompartmentu

daļiņas. Lai noteiktu, kurā frakcijā atrodami BMC, frakcijas tika analizētas poliakrilamīda gela elektroforēzē (11. attēls).



11. attēls. BMC attīrīšana ar gēlfiltrācijas kolonnu, frakciju analīze poliakrilamīda gelā. M- marķieris, 30.-54. frakcija.

Figure 11. BMC purification using gel filtration column, fraction analysis in polyacrylamide gel. M- marker, fractions 30 to 54.

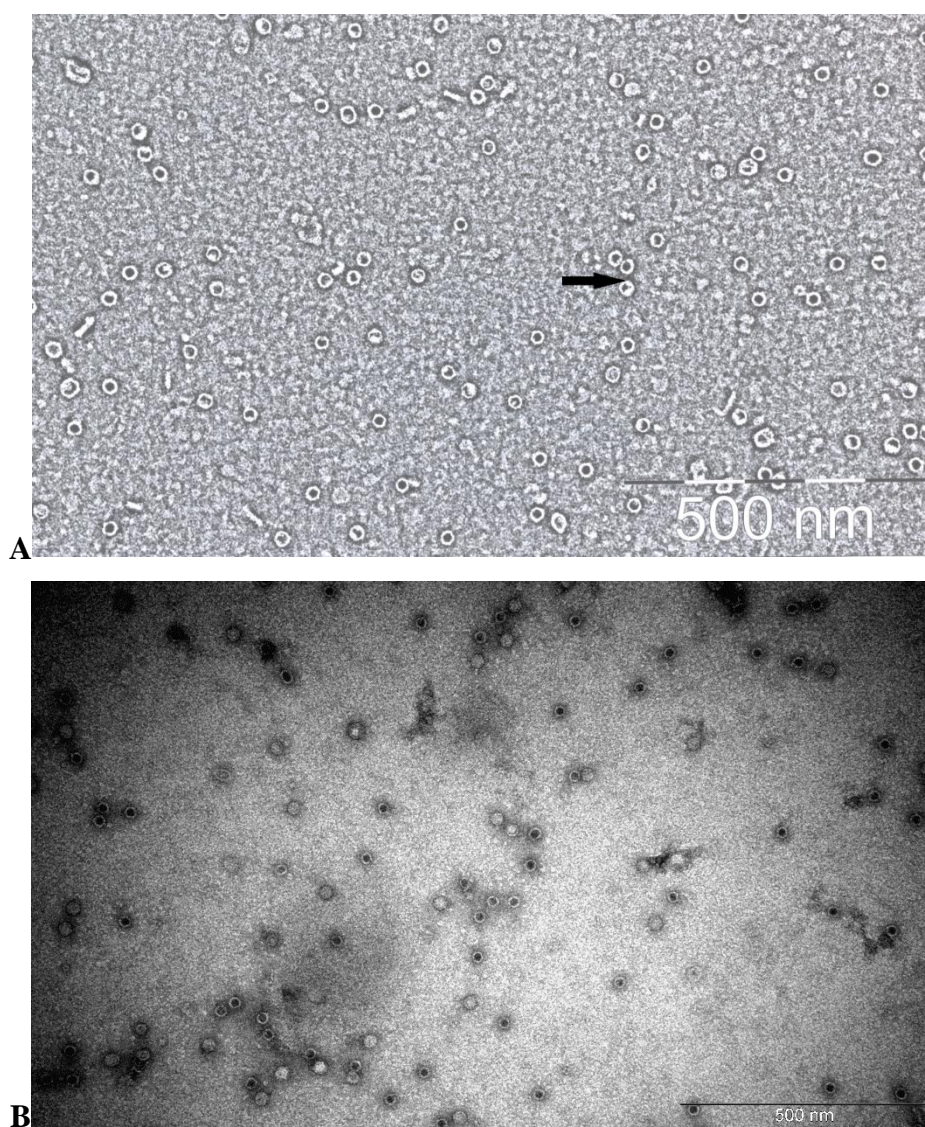
Kā redzams 11. attēlā, lai gan arī 32. frakcijā redzamas BMC proteīnu zonas, tie, visticamāk, ir lieli proteīnu agregāti un šūnu fragmenti, kuri gēlfiltrācijas procesā iznāk tūlīt pēc tukšā tilpuma. Bakteriālie mikrokompartimenti konstatējami 46-50. frakcijā.

Attīrīšanas procesā paņemti paraugi elektronmikroskopijas analīzei - pirms gēlfiltrācijas no resuspendēto ultracentrifugācijas nogulšņu šķīduma un Superose 6 gēlfiltrācijas 46.-51. apvienotajām frakcijām. Elektronmikroskopijas analīze (12. attēls) apstiprina BMC iegūšanu - attēlos redzamas relatīvi uniformas un simetriskas daļiņas ar diametru 25-30 nm.

Visu iepriekš raksturoto bakteriālo mikrokompartimentu izmēri *in vivo* šūnu elektronmikroskopijas attēlos ir aptuveni 100-200 nm, kas par 4-5 reizēm pārsniedz mūsu eksperimentā iegūto daļiņu izmēru. Līdzīga izmēra daļiņas (aptuveni 25 nm diametrā) ir iegūtas, sintētiski producējot β -karboksissomas *E. coli* šūnās (Fei Cai et al., 2016). Šajā eksperimentā karboksissomas tika producētas gan tukšas, gan ar mākslīgi piesaistītiem proteīniem, ko ieslēgt bakteriālajā mikrokompartimentā.

Iespējams, ka mazāka izmēra bakteriālie mikrokompartimenti veidojušies tādēļ, ka tie ir tukši un nav piesaistījuši ne BMC raksturīgos enzīmus, ne substrāta molekulas. Fei Cai et al. pētījumā, kur producētas karboksissomas, gan tukšo, gan pildīto BMC diametrs atšķīries minimāli - tikai par aptuveni 1 nm, taču, iespējams, šādi rezultāti iegūti, jo karboksissomās nav ieslēgti natīvie enzīmi un substrāta molekulas. Kā jau minēts literatūras apskatā, tiek uzskatīts,

ka bakteriālo mikrokompartmentu raksturenzīmiem ir nozīmīga loma BMC veidošanās procesā, un to N vai C terminālā gala sekvencei ir nozīmīga loma kompartmentu savākšanās gaitā. Lai gan koekspresējot bakteriālos mikrokompartmentus kopā ar katru no BMC enzīmiem (skat. tālāk 3.3. apakšnodaļu) nebija novērojamas nozīmīgas kompartmentu izmēra izmaiņas, iespējams, BMC izmērs palielinās, ja tajos iepakoti gan visi nepieciešamie enzīmi, gan arī substrāta molekulas. Tāpat iespējams, ka bakteriālo mikrokompartmentu izmēru ietekmējusi tālāk aprakstītā mutācija 1-3combo sekvencē, kas varētu izmainīt BMC-H proteīnu pakošanās procesu un novest pie mazāka kompartmentu izmēra.

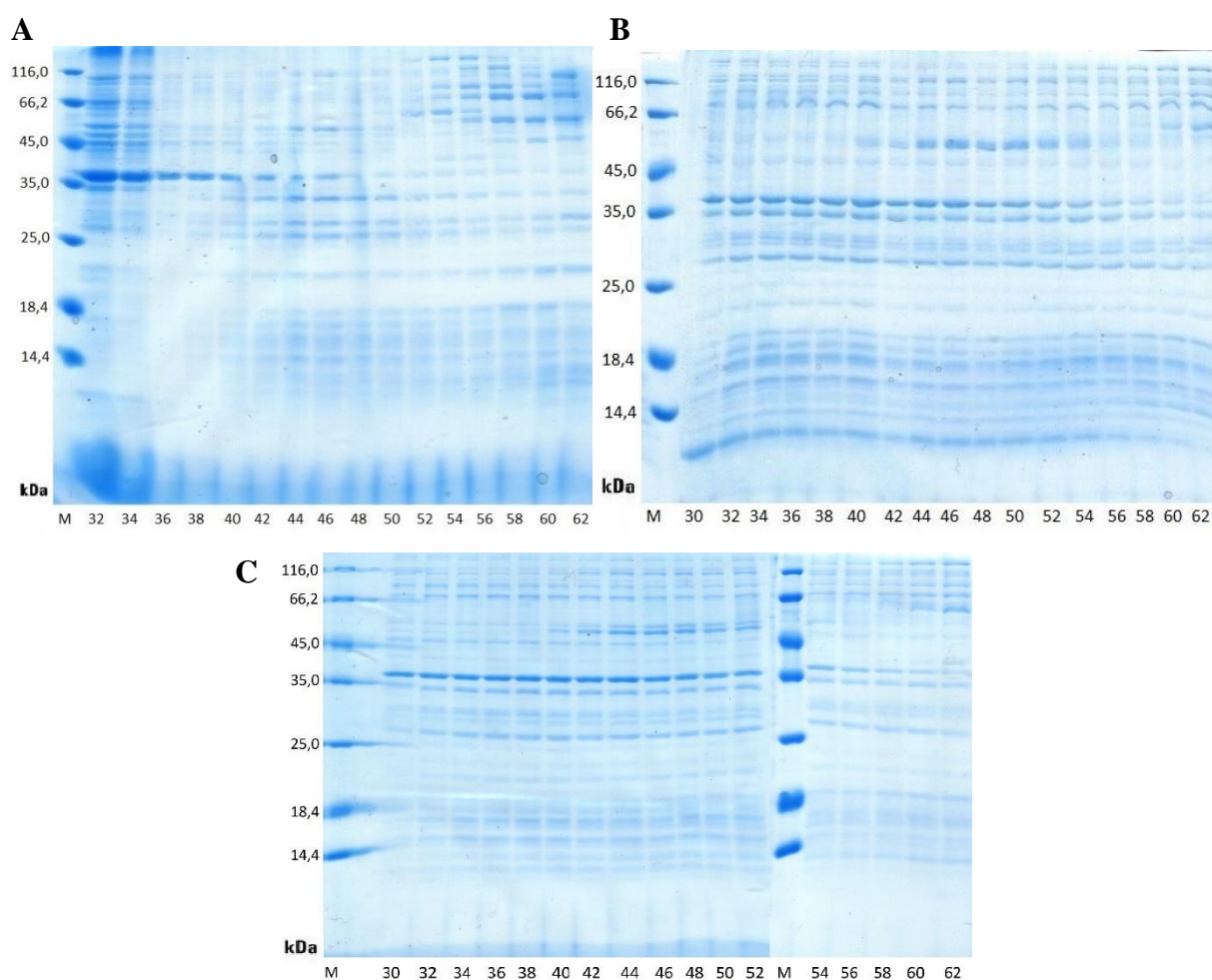


12. attēls. Elektronmikroskopijā iegūtais bakteriālo mikrokompartmentu attēls pēc ultracentrifugācijas (A) un pēc gēlfiltrācijas uz Superose 6 kolonnas (46.-51. frakcija, B). Ar bultiņu atzīmēti BMC.

Figure 12. Image of bacterial microcompartments, obtained using electron microscopy from ultracentrifugation (A) and gel filtration on Superose 6 column (fractions 46-51, B). Arrow pointed to BMC's.

3.2. Priekšnoteikumi bakteriālo mikrokompartmentu izveidei

Bakteriālo mikrokompartmentu producēšanu tika mēģināts veikt izmantojot tikai katru atsevišķo BMC-H proteīnu kopā ar EutN BMC-P proteīnu, attiecīgi 1+EutN, 2+EutN un 3+EutN ar mērķi minimizēt ekspresējamo proteīnu skaitu un noskaidrot minimālo proteīnu saturu daļiņu veidošanai. Ekspresējot BMC proteīnus visās trīs kombinācijās, bakteriālie mikrokompartmenti neveidojās, kas liecina par visu trīs BMC-H proteīnu nepieciešamību un mijiedarbību veiksmīgā mikrokompartmentu veidošanās procesā. Šī iemesla dēļ visos pārējos eksperimentos ar bakteriālajiem mikrokompartmentiem ekspresēti visi trīs BMC-H proteīni, lai nodrošinātu veiksmīgu BMC veidošanos.

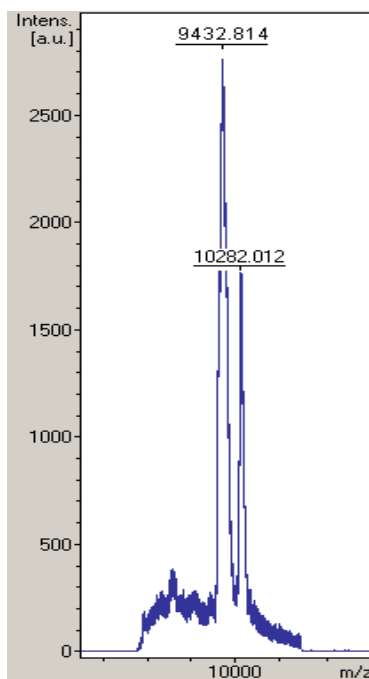


13. attēls. 1+E, 2+E un 3+E attīrīšana, izmantojot Superose 6 10/600 kolonnu. **A)** 1+E, M-marķieris, 32.-62. frakcija, **B)** 3+E, M-marķieris, 30.-62. frakcija, **C)** 2+E, M-marķieris, 30.-64. frakcija. Nevienā no geliem nav konstatējamas bakteriālajiem mikrokompartmentiem raksturīgās zonas.

Figure 13. Purification of 1+E, 2+E and 3+E, using Superose 6 10/600 gel filtration column. **A)** 1+E, M-marker, fractions 32 to 62, **B)** 3+E, M-marker, fractions 30 to 62, **C)** 2+E, M-marker, fractions 30 to 64. Bacterial microcompartment zones cannot be seen in any of the images.

Analizējot BMC ar masspektrometriju (14. attēls) tika konstatēts, ka sākotnējie BMC producēti ar mutantu 1-3combo sekvenci. Masspektrometrijas attēlā redzami divi izteikti pīķi, intensīvākais no tiem atbilst natīvam 1. BMC proteīnam, bet otrs, kā izrādījās pēc padziļinātas

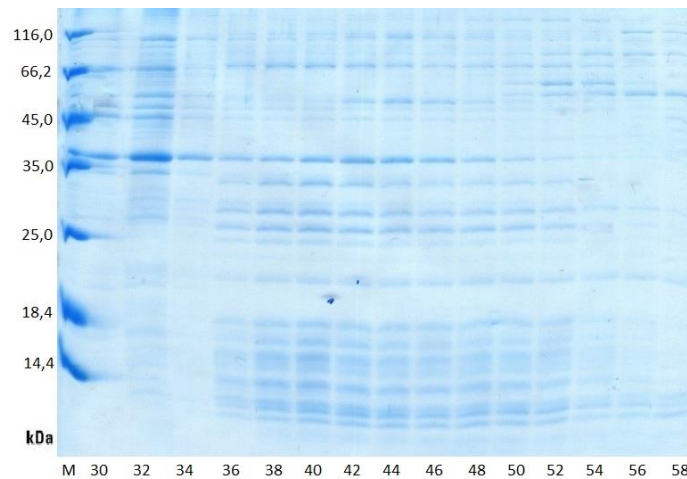
sekvences analīzes, atbilst mutantam, pagarinātam 3. BMC proteīnam. Šāda mutācija radusies kļūdaina praimera rezultātā, kur mutantā praimera sekvencē notikusi viena citozīna delēcija (skat 3. pielikumu). Pārsteidzošā kārtā, bakteriālo mikrokompartmentu producēšana, ekspresējot no jauna izveidotu 1-3combo konstruktus ar pareizu natīvo sekvenci, izrādījās neveiksmīga, jo BMC daļiņas pēc koekspresijas analogā sistēmā neveidojās (15. attēls).



14. attēls. Veselu bakteriālo mikrokompartmentu masspektrometriska analīze. Lielākais pīķis atbilst natīvam 1. BMC proteīnam, otrs izteiktais pīķis - mutantam 3. BMC proteīnam.

Figure 14. Masspectrometry analysis of intact bacterial microcompartments. The largest peak represents a native BMC protein No.1, the second peak - a mutant BMC protein No.3.

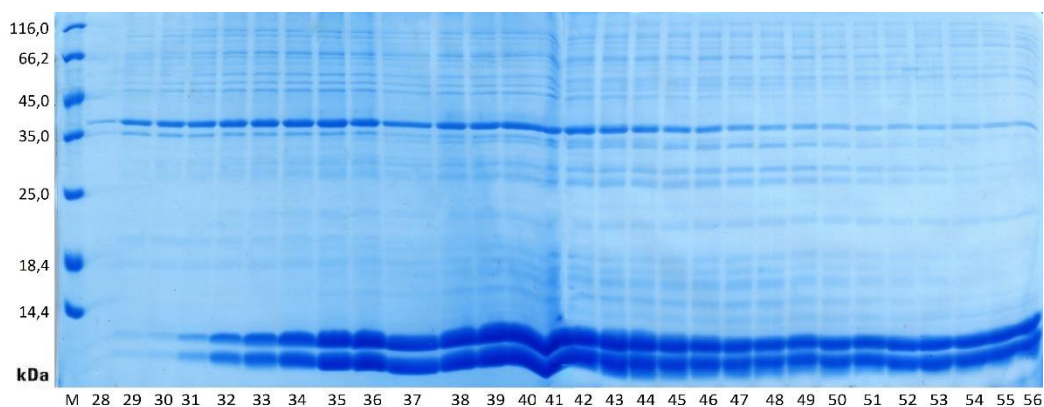
Interesanti, ka masspektrometriskajā analīzē nav konstatēti pīķi, kas norādītu uz abu pārējo proteīnu - 2. un EutN klātbūtni paraugā. Tā kā izveidojušās veselas daļiņas, EutN proteīnam tur obligāti jābūt, jo bez tā nav iespējama sekmīga kompartmentu izveide. Iespējams, ka pentamērais E proteīns kompartmentos sastopams daudz mazākā daudzumā kā BMC-H proteīni, tādēļ masspektrometrijā nav konstatējams. 2. BMC proteīna pīķa neesamību paraugā varētu ietekmēt vairāki iemesli - iespējams, ka 2. proteīns kompartmentā sastopams ļoti maz, tādēļ nav detektējams, bet varbūt tam ir samazināta ekspresija un proteīns netiek producēts pietiekamā daudzumā.



15. attēls 1-3combo+E natīvās formas attīrīšana ar Superose 6 10/600 gelfiltrācijas kolonnu. M-marķieris, 30.-58. frakcija. Nevienā no gelfiltrācijas frakcijām nav konstatējami BMC čaulas proteīni un kompartmenti acīmredzami neveidojas.

Figure 15. Purification of 1-3combo+E native form using Superose 6 10/600 gel filtration column. M- marker, fractions 30 to 58. No BMC shell proteins are present in any of the gel filtration fractions and bacterial microcompartments do not assemble.

Bakteriālo mikrokompartmentu neveidošanās, ekspresējot natīvo sekvenci, liek secināt, ka izveidojusies mutācija ir nepieciešama, lai bakteriālie mikrokompartmenti sekmīgi spētu izveidoties un visi pētījumi līdz ar to tika veikti izmantojot konstruktus ar mutanto 1-3 combo sekvenci. Citozīna delēcija 1-3combo sekvencē izraisa 3. BMC proteīna pēdējo 4 aminoskābju *missense* nomaiņu, kas likvidē oriģinālo stop kodonu. Tā rezultātā 3. proteīnam izveidojas astoņu aminoskābju pagarinājums līdz jaunam stop kodonam, pagarinātajam 3. proteīnam esot 10,293 kDa smagam. Iemesls šādai mutantu BMC daļiņu formēšanai un natīvu daļiņu neizveidošanai nav līdz galam skaidrs. Iespējams, pagarinātais C-terminālais 3. proteīna gals veido citādus un stabilākus kontaktus starp atsevišķiem pentamēru un heksamēru būvblokiem.



16. attēls. 1-3combo attīrīšana, izmantojot Superose 6 10/600 gelfiltrācijas kolonnu. M-marķieris, 28.-56. frakcija. Figure 16. Purification of 1-3combo using Superose 6 10/600 gel filtration column. M- marker, fractions 28 to 56.

Ekspresējot tikai BMC-H proteīnus saturošo 1-3combo bez pentamēriskā EutN proteīna klātbūtnes (16. attēls), gēlfiltrācijā novērojama heksamēro proteīnu “izsmērēšanās” pa visu procesu - neveidojas diskreti kompartmentu pīķi (kā 11. attēlā) un proteīni samērā vienmērīgi sadalās pa visām frakcijām. Heksamēri bez pentamēriskā proteīna klātbūtnes teorētiski spētu veidot tikai dažāda izmēra plātņveida struktūras, kas izskaidrotu gēlfiltrācijas ainu - dažāda izmēra BMC-H proteīnu plātnes atbilstoši savam izmēram būtu sastopamas visās frakcijās.

3.3. Bakteriālo mikrokompartmentu čaulas proteīnu un enzīmu koekspresijas

Bakteriālo mikrokompartmentu nozīmīga sastāvdaļa ir enzīmi, kas katalizē BMC notiekošās metabolisma reakcijas. Tiem nepieciešams saistīties ar kompartmenta čaulas proteīniem BMC veidošanās procesā, jo bez enzīmiem BMC nav pilnībā funkcionējošs, un pilnībā izveidotā un noslēgtā kompartmentā enzīmi nespēj iekļūt. Bakteriālos mikrokompartmentus veidojošo proteīnu potenciālā saistīšanās spēja ar BMC enzīmiem tika pārbaudīta, izmantojot trīs enzīmus - alkohola dehidrogenāzi (AlcDH) un aldehīda dehidrogenāzi (AldDH), kas ir sastopami visās metabolosomās, un holīna trimetilamīna liāzi (CutC), kas ir raksturenzīms tieši *Klebsiella pneumoniae* GRM2 bakteriālajiem mikrokompartmentiem. GRM2 tipa CutC enzīmam ir aptuveni 330 aminoskābju garš N-termināls pagarinājums, kura funkcija nav precīzi noskaidrota – ir izteiktas idejas, ka šis pagarinājums nodrošina CutC iepakojšanu BMC, līdzīgi kā īsas C un N-terminālas sekvences to veic AldDH gadījumā (Gints Kalnins et al., 2015, Cheryl A. Kerfeld and Onur Erbilgin, 2015). CutC N-terminālā domēna nozīme BMC čaulas proteīnu saistīšanās procesā tika analizēta, izmantojot jau iepriekš izveidotus N-terminālus heksahistidīnu tagus saturošus konstruktus - pRSF-ΔCutC, kurš nesaturēja N-terminālās 334 aminoskābes un pRSF-N-CutC, kurš saturēja tikai N-terminālās 334 aminoskābes (G. Kalniņš, npublicēts materiāls).

Lai pārbaudītu bakteriālos mikrokompartmentus veidojošo proteīnu spēju piesaistīt kompartmentu kodola enzīmus un CutC domēnu nozīmi saistīšanās procesā, BMC proteīni kopā ar enzīmiem tika koekspresēti divplazmīdu pRSF-TEVDuet un pETDuet sistēmā *E.coli* BL21-DE3 šūnās. pETDuet un pRSF-TEVDuet plazmīdas satur dažāda tipa *origin* saitus un dažādus antibiotiku rezistences gēnus (pETDuet- ampicilīna rezistences gēns, pRSF-TEVDuet-kanamicīna rezistences gēns), tās ir savietojamas un ir iespējams vienlaikus uzturēt *E.coli* šūnā un veikt ekspresiju no visiem četriem promoteriem, tiem vienam otru neietekmējot.

Koekspresijas tika veiktas, izmantojot 2 dažādus vektorus - pETDuet un pRSF-TEVDuet (3. tabulā kā pRSF) (plazmīdu ģenētiskās kartes skat. 1. un 2. pielikumā). Sākotnēji ar PCR palīdzību tika pavairotas AlcDH un AldDH sekvences (PCR oligonukleotīdi 2.1.7.,

24.lpp) un ieligētas pRSF-TEVDuet vektoros pa BamHI un HindIII saitēm (AldDH) un PagI un HindIII saitēm (AlcDH). Iegūtie konstrukti, kā arī trīs CutC konstrukti (pRSF-CutC, pRSF-ΔCutC un pRSF-N-CutC; Gints Kalnins et al., 2015) tika transformēti *E.coli* BL21 DE3 šūnās. No tām pagatavotas PEG kompetentās šūnas, kurās transformētas plazmīdas ar BMC proteīnu sekvencēm PETDuet vektoros. Kopumā tika veiktas 25 koekspressijas pēc shēmas tabulā Nr.3.

3. tabula

BMC proteīnu un CutC, CutC-Δ, CutC-N, AlcDH, AldDH koekspressijas shēma. Iekavās saīsinājumi attēlu aprakstos Nr. 17 un Nr. 19

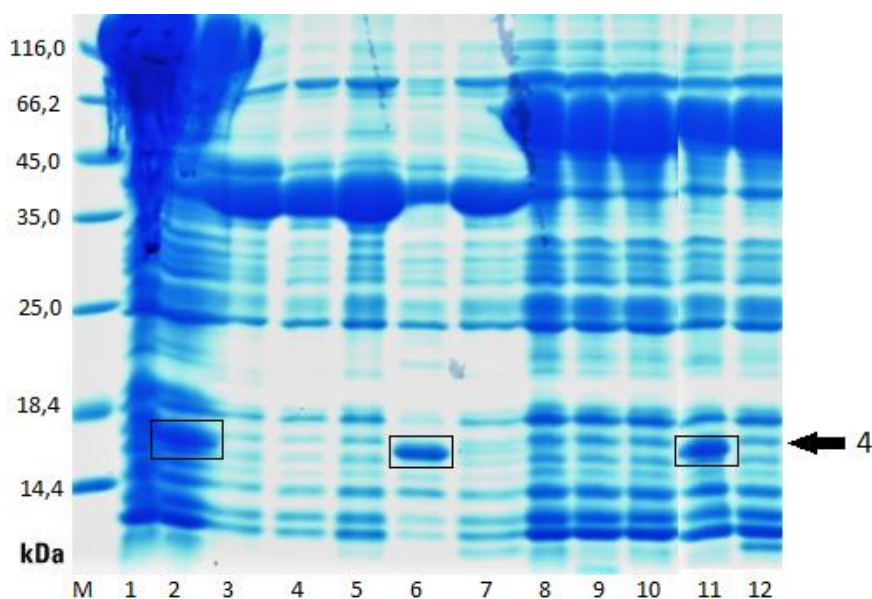
Table 3

Scheme of BMC protein and CutC, CutC-Δ, CutC-N, AlcDH, AldDH coexpression. In the brackets -abbreviations in descriptions for images No. 17 and No. 19.

pETDuet-1 ar	pRSF-AlcDH (1+AlcDH), pRSF-AldDH (1+AldDH), pRSF-CutC (1+CutC), pRSF-ΔCutC (1+ΔCutC), pRSF-N-CutC (1+N-CutC)
pETDuet-2 ar	pRSF-AlcDH (2+AlcDH), pRSF-AldDH (2+AldDH), pRSF-CutC (1+CutC), pRSF-ΔCutC (2+ΔCutC), pRSF-N-CutC (2+N-CutC)
pETDuet-3 ar	pRSF-AlcDH (3+AlcDH), pRSF-AldDH (3+AldDH), pRSF-CutC (1+CutC), pRSF-ΔCutC (3+ΔCutC), pRSF-N-CutC (3+N-CutC)
pETDuet-4 ar	pRSF-AlcDH (4+AlcDH), pRSF-AldDH (4+AldDH), pRSF-CutC (1+CutC), pRSF-ΔCutC (4+ΔCutC), pRSF-N-CutC (4+N-CutC)
pETDuet-E ar	pRSF-AlcDH (E+AlcDH), pRSF-AldDH (E+AldDH), pRSF-CutC (1+CutC), pRSF-ΔCutC (E+ΔCutC), pRSF-N-CutC (E+N-CutC)

Visiem koekspressijas eksperimentiem tika izaudzēts 50 ml biomasas, un proteīni attīrīti, izmantojot HisTrap HP 1 ml metālafinitātes hromatogrāfijas kolonnu. Metālafinitātes hromatogrāfiju koekspressēto proteīnu attīrīšanai iespējams izmantot, jo visām pRSF-TEVDuet vektoros ligētajām sekvencēm ir pievienota 6x His sekvence, kas nodrošina piesaistīšanos pie metālafinitātes kolonnas. No kolonnas iegūtie eluāti sakoncentrēti un analizēti ar poliakrilamīda gela elektroforēzi.

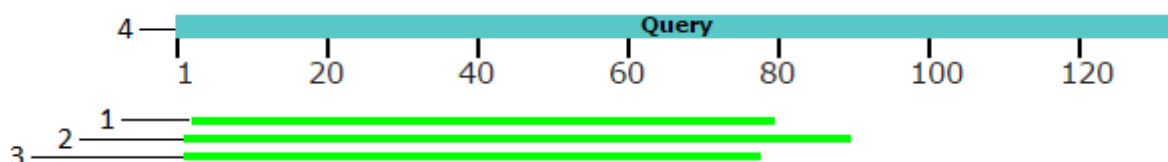
Elektroforēzes gelā (17. attēls) redzams, ka visi trīs izmantotie enzīmi ir saistījušies ar 4. BMC proteīnu - redzama biezāka zona, kas novietojusies atbilstoši 4. proteīna molekulmasai. Tas liecina par 4. proteīna iesaisti bakteriālo mikrokompartimentu enzīmu piesaistīšanas procesā. Ceturtais BMC proteīns ir arī smagākais no visiem- pārējo četru BMC proteīnu masa ir robežās no 9,42 kDa līdz 9,95 kDa (Nr. 1- 9,43 kDa, Nr. 2- 9,62 kDa, Nr. 3- 9,42 kDa un EutN 9,95 kDa), bet BMC proteīns Nr.4. ir par nepilniem 4 kDa smagāks - tā masa ir 13,71 kDa. 4. proteīnam ir pagarināts C-terminālais gals, kas ir par aptuveni 30 aminoskābju atlikumiem garāks kā pārējiem BMC proteīniem.



17. attēls. BMC proteīnu un AlcDH, AldDH un CutC koekspressijas analīze poliakrilamīda gela elektroforēzē. M- marķieris, 1- CutC, 2- CutC+4, 3- AlcDH+1, 4- AldDH+2, 5- AlcDH+3, 6- AlcDH+4, 7- AlcDH+E, 8- AldDH+1, 9- AldDH+2, 10- AldDH+3, 11- AldDH+4, 12- AldDH+E. Ar bultu atzīmēts 4. BMC proteīns.

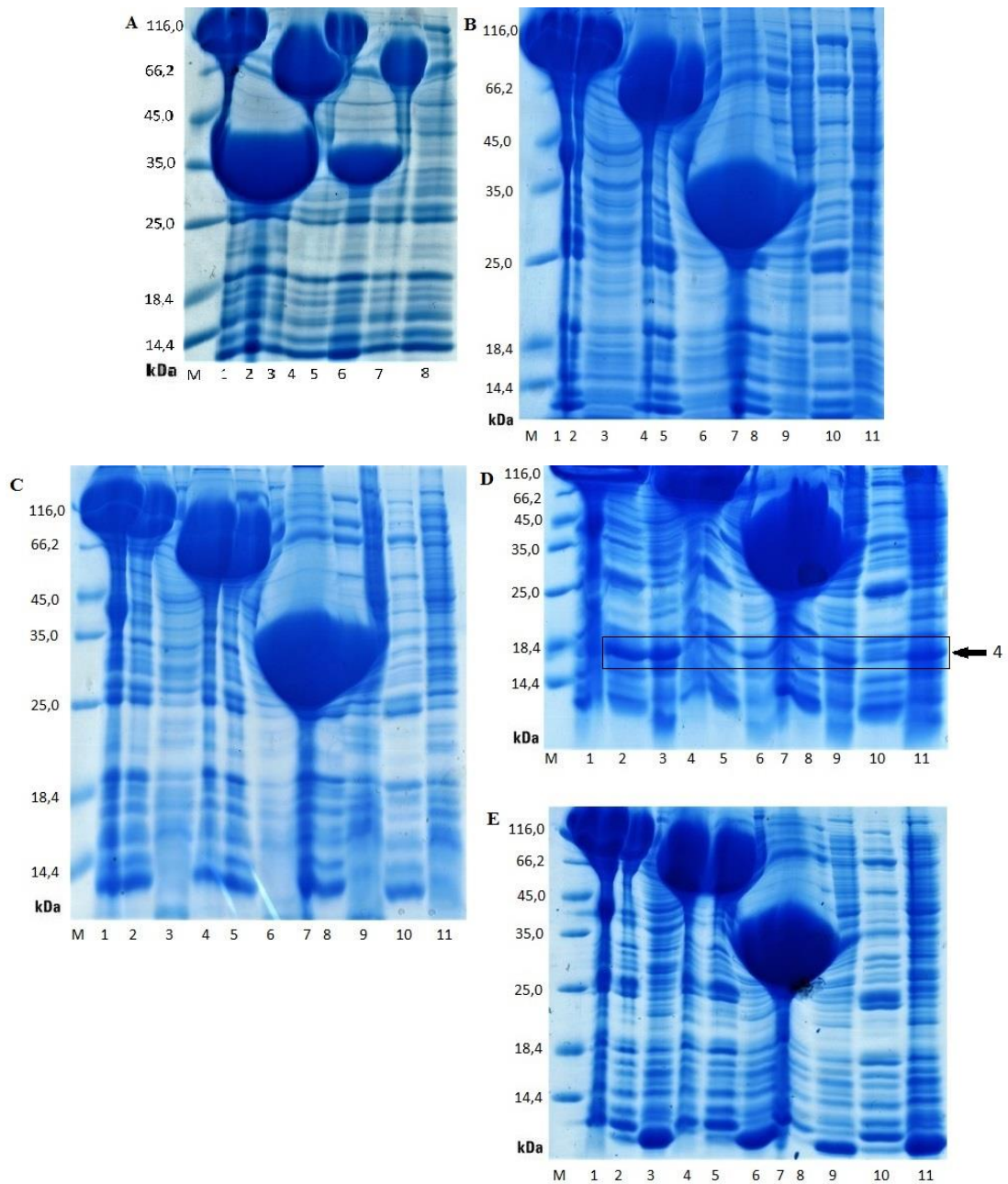
Figure 17. Coexpression analysis of BMC proteins and AlcDH, AldDH and CutC in polyacrylamide gel electrophoresis. M- marker, 1- CutC, 2- CutC+4, 3- AlcDH+1, 4- AldDH+2, 5- AlcDH+3, 6- AlcDH+4, 7- AlcDH+E, 8- AldDH+1, 9- AldDH+2, 10- AldDH+3, 11- AldDH+4, 12- AldDH+E. Marked with an arrow- 4th BMC protein.

Kā redzams BMC proteīnu sekvenču salīdzinājumā (18. attēls), 4. proteīna C-terminālais gals ir ievērojami pagarināts, taču līdz šim nav precīzi noskaidrotas tā funkcijas. Tā kā 4. proteīns ir vienīgais, kas saistās ar BMC enzīmiem, iespējams, pagarinātais C gals ir iesaistīts enzīmu piesaistē bakteriālajiem mikrokompartimentiem, jo pārējā sekvence visiem BMC-H proteīniem ir ļoti līdzīga. Lai precīzi noskaidrotu faktorus, kas 4. BMC proteīnam ļauj saistīties ar bakteriālo mikrokompartimentu enzīmiem, būtu nepieciešams veikt tālākus pētījumus, variējot 4. BMC proteīna C-terminālā gala sekvenci. Šādi būtu iespējams precīzāk noteikt konkrētā sekvences posma nozīmi proteīnu spējā savstarpēji saistīties, un iegūt pilnīgāku sapratni par enzīmu piesaistes procesu.



18.attēls. BMC proteīnu sekvenču salīdzinājums. Ar atbilstošajiem numuriem atzīmēti BMC proteīni.

Figure 18. Alignment of BMC protein sequences. BMC proteins are marked with corresponding numbers.



19. attēls. BMC proteīnu un CutC, CutC-N un Δ CutC koekspressijas analīze poliakrilamīda gela elektroforēzē. **A)** M-marķieris, 1-CutC, 2-CutC-N, 3- Δ CutC, 4- 1+CutC eluāts, 5- 1+CutC-N el., 6- 1+ Δ CutC el., 7- PETDuet-1. **B)** M- marķieris, 1-CutC, 2-2+CutC eluāts, 3- 2+CutC lizāts, 4- Δ CutC, 5- 2+ Δ CutC el., 6- 2+ Δ CutC liz., 7- CutC-N, 8-2+CutC-N eluāts, 9- 2+CutC-N liz., 10- PETDuet-2 el., 11- PETDuet-2 lizāts. **C)** M- marķieris, 1-CutC, 2- 3+CutC eluāts, 3- 3+CutC lizāts, 4- Δ CutC, 5- 3+ Δ CutC eluāts, 6- 3+ Δ CutC lizāts, 7- CutC-N, 8- 3+CutC-N el., 9- 3+CutC-N liz., 10- PETDuet-3 el., 11- PETDuet-3 liz. **D)** M-marķieris, 1-CutC, 2- 4+CutC eluāts, 3- 4+CutC lizāts, 4- Δ CutC, 5- 4+ Δ CutC el., 6- 4+ Δ CutC liz., 7- CutC-N, 8- 4+CutC-N el., 9- 4+CutC-N liz., 10- PETDuet-4 el., 11- PETDuet-4 liz. **E)** M- marķieris, 1-CutC, 2- E+CutC eluāts, 3- E+CutC lizāts, 4- Δ CutC, 5- E+ Δ CutC el., 6- E+ Δ CutC liz., 7- CutC-N, 8- E+CutC-N el., 9- E+CutC-N liz., 10- PETDuet-E el., 11- PETDuet-E liz.

Figure 19. Coexpression analysis of BMC proteins and CutC, CutC-N and Δ CutC in polyacrylamide gel electrophoresis. A) M-marker 1-CutC, 2-CutC-N, 3- Δ CutC, 4- 1+CutC eluate, 5- 1+CutC-N el., 6- 1+ Δ CutC el., 7- PETDuet-1. B) M- marker, 1-CutC, 2-2+CutC eluate 3- 2+CutC lysate 4- Δ CutC, 5- 2+ Δ CutC el., 6- 2+ Δ CutC lys., 7- CutC-N, 8-2+CutC-N eluate, 9- 2+CutC-N lys., 10- PETDuet-2 el., 11- PETDuet-2 lysate. C) M- marker, 1-CutC, 2- 3+CutC eluate, 3- 3+CutC lysate, 4- Δ CutC, 5- 3+ Δ CutC eluate, 6- 3+ Δ CutC lysate, 7- CutC-N, 8- 3+CutC-N el., 9- 3+CutC-N lys., 10- PETDuet-3 el., 11- PETDuet-3 lys. D) M-marker, 1-CutC, 2- 4+CutC eluate, 3- 4+CutC lysate, 4- Δ CutC, 5- 4+ Δ CutC el., 6- 4+ Δ CutC lys., 7- CutC-N, 8- 4+CutC-N el., 9- 4+CutC-N lys., 10- PETDuet-4 el., 11- PETDuet-4 lys. E) M- marker, 1-CutC, 2- E+CutC eluate, 3- E+CutC lysate, 4- Δ CutC, 5- E+ Δ CutC el., 6- E+ Δ CutC lys., 7- CutC-N, 8- E+CutC-N el., 9- E+CutC-N lys., 10- PETDuet-E el., 11- PETDuet-E lysate.

Poliakrilamīda gēla elektroforēzes attēlos, kur analizēta BMC čaulas proteīnu mijiedarbība ar N-terminālo domēnu saturošiem un nesaturošiem CutC konstruktiem, redzams, ka tikai 4. BMC proteīns saistās ar holīna liāzi, un visveiksmīgāk tas notiek ar pilna garuma CutC. 19. attēlā D otrajā un trešajā joslā (4+CutC eluāts un 4+CutC lizāts) redzamas izteiktas 4. proteīna zonas. Lai gan arī lizātā redzama bieža zona, tomēr skaidri redzams, ka 4. proteīns efektīvi saistās pie CutC. Ar abiem pārējiem konstruktiem- Δ CutC (19. attēlā paraugi 4.-6 D) CutC-N (19. attēlā paraugi 7-9 D) redzamas vājākas 4. proteīna zonas.

Salīdzinot ar kontroles paraugiem, kur attīrīts tikai 4. proteīns (19. attēlā paraugi 10-11 D), redzams, ka Δ CutC un CutC-N eluātu paraugos 4. proteīna zonas ir biežākas kā kontroles eluāta paraugā, kas liecina par vājāku, bet detektējamu piesaistīšanos enzīma konstruktiem, jo BMC 4. proteīnam nav pievienots 6 histidīnu tags un tas nevar tieši piesaistīties metālafinitātes kolonnai (19. attēlā D, 10. līnija). Tā kā CutC eluāta paraugā 4. proteīna zona ir visizteiktākā, var secināt, ka enzīma piesaistē bakteriālajam mikrokompartmentam iesaistīta ne tikai N terminālā gala sekvenca un efektīva piesaiste notiek tikai ar pilnās sekvences CutC enzīmu.

Pārējiem četriem BMC proteīniem nav novērojama piesaistīšanās nevienam no CutC konstruktiem - 1., 2. un 3. proteīna koekspresijas analīzē eluātu paraugos gan ir redzama zona, kas atbilst šo proteīnu masai, taču tās nav lielākas kā kontroles paraugiem, tādēļ nevar izdarīt secinājumus par piesaistīšanos pie kāda no CutC enzīma konstruktiem. EutN izteikti redzams, ka nenotiek mijiedarbība ar enzīmiem – eluācijas frakcijās papildus zonu nav. Tas norāda, ka mijiedarbība ar CutC konstruktiem nav notikusi un EutN proteīns nav piesaistījies metālafinitātes kolonnai.

Lai pārbaudītu bakteriālo mikrokompartmentu enzīmu savstarpējo spēju saistīties, tika koekspresēti četri bakteriālo mikrokompartmentu enzīmi - AlcDH, AldDH, PTAC (fosfotransacilāze), kas ir trīs obligāti nepieciešamie kompartmentu enzīmi kofaktoru atjaunošanai, un raksturenzīms CutC. Koekspresija notika pēc shēmas 4. tabulā. Enzīmu koekspresija veikta tāpat kā iepriekš, abas plazmīdas koekspresējot *E. coli* BL21 (DE3) šūnās, audzējot 50 mL tilpumā, attīrot ar metālafinitātes hromatogrāfijas kolonnu un paraugus analizējot ar poliakrilamīda gēla elektroforēzes palīdzību.

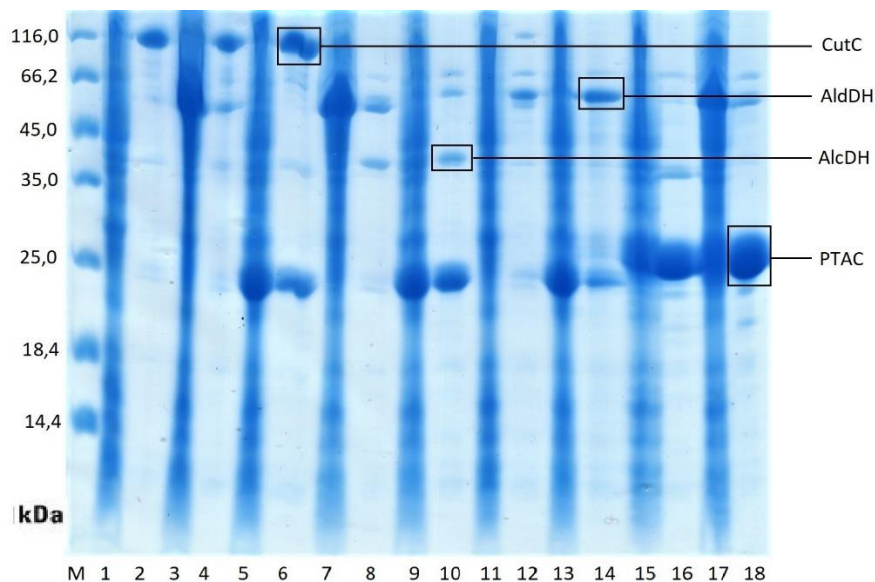
BMC kodola enzīmu koekspresijas shēma. Iekavās saīsinājumi 20. attēla aprakstā.

Table 4

Scheme of BMC core enzyme coexpression. In the brackets- abbreviations in description of figure 20.

pRSF-TEVDuet-CutC ar	pETDuet-AlcDH (CutC-AlcDH), pETDuet-AldDH (CutC-AldDH) un pETDuet-PTAC (CutC-AlcDH)
pRSF-TEVDuet-AlcDH ar	pETDuet-AldDH (AlcDH-AldDH), pETDuet-PTAC (AlcDH-PTAC)
pRSF-TEVDuet-AldDH ar	pETDuet-AlcDH (AldDH-AlcDH), pETDuet-PTAC (AldDH-PTAC)
pRSF-TEVDuet-PTAC ar	pETDuet-AlcDH (PTAC-AlcDH), pETDuet-AldDH (PTAC-AldDH)

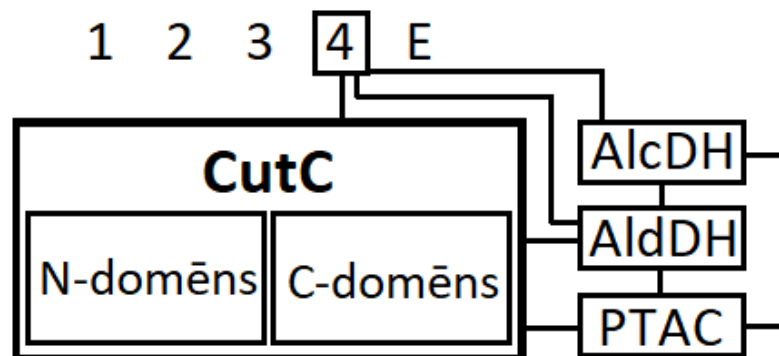
Analizējot BMC kodola enzīmu savstarpējo saistīšanos, novērojams, ka mijiedarbības starp dažādiem kodola enzīmiem ir atšķirīgas. Koekspresējot raksturenzīmu CutC ar pārējiem kodola enzīmiem, novērojams, ka mijiedarbība nenotiek ar visiem enzīmiem. Eluātos novērojamas zonas ar AldDH un PTAC, kas liecina, ka šie enzīmi ir saistījušies ar CutC un starp tiem notiek mijiedarbība. AlcDH, kam nebija novērojama mijiedarbība ar CutC, kopumā ekspresējies salīdzinoši zemā līmenī, taču novērojama mijiedarbība ar abiem pārējiem enzīmiem - gan ar AldDH (20.attēla 8. paraugs), gan ar PTAC (20. att. 10. par.). Arī AldDH saistās ar abiem pārējiem metabolosomu kodola enzīmiem- eluātos redzamas zonas gan ar AlcDH (20. att. 12. par.), gan PTAC (20. att. 14. par.). Fosfotransacilāze (PTAC) ir vienīgais kodola enzīms, kas pārliecinoši saistās ar visiem pārējiem kodola enzīmiem, un novērojamā mijiedarbība ir spēcīga, jo redzamās PTAC zonas eluātos ir salīdzinoši intensīvas. Lai pārbaudītu mijiedarbības stiprumu un raksturu ar starp raksturenzīmu CutC un AlcDH un PTAC, varētu izveidot koekspresijas sistēmu ar CutC, BMC čaulas proteīniem un kādu no abiem enzīmiem, lai mēģinātu šos kodola enzīmus ar CutC palīdzību iepakot bakteriālajos mikrokompartmentos. Ar šāda eksperimenta palīdzību salīdzinoši uzskatāmi varētu pārbaudīt enzīmu mijiedarbības stiprumu, jo CutC enzīms līdz šim izrādījies vienīgais, kas spēj veidot pietiekami spēcīgu mijiedarbību ar BMC čaulas proteīniem, lai iepakotos bakteriālajos mikrokompartmentos (aprakstīts tālāk 3.5. nodaļā).



20. attēls. BMC kodola enzīmu koekspressijas analīze poliakrilamīda gela elektroforēzē. M- marķieris, 1-CutC-AlcDH lizāts, 2- CutC-AlcDH eluāts, 3- CutC-AldDH liz., 4- CutC-AldDH el., 5- CutC-PTAC liz., 6- CutC-PTAC el., 7- AlcDH-AldDH liz., 8- AlcDH-AldDH el., 9- AlcDH-PTAC liz. 10- AlcDH-PTAC el., 11- AldDH-AlcDH liz., 12- AldDH-AlcDH el., 13- AldDH-PTAC liz., 14- AldDH-PTAC el., 15- PTAC-AlcDH liz., 16- PTAC-AlcDH el., 17- PTAC-AldDH liz., 18.- PTAC-AldDH el.

Figure 20. Coexpression analysis of BMC core enzymes in polyacrylamide gel electrophoresis. M-marker, 1-CutC-AlcDH lysate, 2- CutC-AlcDH eluate, 3- CutC-AldDH lys., 4- CutC-AldDH el., 5- CutC-PTAC lys., 6- CutC-PTAC el., 7- AlcDH-AldDH lys., 8- AlcDH-AldDH el., 9- AlcDH-PTAC lys. 10- AlcDH-PTAC el., 11- AldDH-AlcDH lys., 12- AldDH-AlcDH el., 13- AldDH-PTAC lys., 14- AldDH-PTAC el., 15- PTAC-AlcDH lys., 16- PTAC-AlcDH el., 17- PTAC-AldDH lys., 18.- PTAC-AldDH el.

Kopumā visi bakteriālo mikrokompartmentu kodola enzīmi saistās ar vismaz diviem no pārējiem kodola elementiem, kas nodrošinātu veiksmīgu iepakojanos BMC arī gadījumā, ja enzīms tieši nesaistās ar mikrokompartmenta čaulu (21. attēls). Tā kā CutC līdz šim vienīgais izrādījis spēju iepakoties BMC (aprakstīts 3.5 nodaļā), enzīmu savstarpējā saistība teorētiski varētu nodrošināt visu kodola enzīmu pastarpinātu piesaistīšanos čaulai un iepakojanos bakteriālajā mikrokompartmentā.



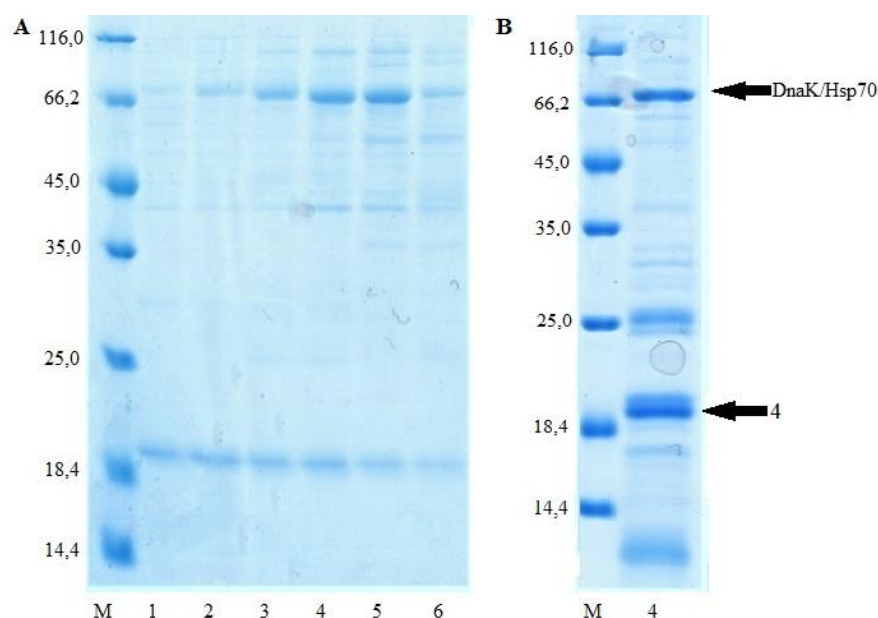
21. attēls. Bakteriālo mikrokompartmentu čaulas proteīnu un kodola enzīmu savstarpējās saistīšanās shēma.

Figure 21. Scheme of binding between bacterial microcompartment shell proteins and core enzymes.

3.4. 4. BMC proteīna piesaistīšanās Hsp70

Veicot eksperimentus ar atsevišķu bakteriālo mikrokompartmentu proteīnu attīrīšanu, bija novērojams, ka ceturtajam BMC proteīnam piesaistījies vairāk kā 65 kDa smags proteīns. Tas kopā ar 4. proteīnu redzams poliakrilamīda gela elektroforēzes attēlā arī pēc gelfiltrācijas, kad lielākā daļa piemaisījumu no BMC proteīna ir atdalīti. Piesaistītā proteīna identitāte tika noskaidrota, izmantojot MALDI-TOF masspektrometrijas metodi.

Lai identificētu piesaistīto proteīnu, 4. proteīna gēns tika ieklonēts pRSF-TEV-Duet vektorā, tādējādi pievienojot N-terminālu heksahistidīnu tagu, ekspresēts *E.coli* BL21-DE3 šūnās, attīrīts ar niķeļa metālafinitātes hromatogrāfiju un gelfiltrāciju uz Superdex 200 kolonnas. Tālāk 4. proteīnu saturošās frakcijas tika sakoncentrētas un paraugs analizēts ar poliakrilamīda gela elektroforēzi.



22. attēls. Ceturtajam BMC proteīnam piesaistītais proteīna vizualizācija SDS-PAGE gelā. **A)** Ceturtā proteīna attīrīšana ar Superdex 200 10/600 gelfiltrācijas kolonnu, M- marķieris, 1-6- gelfiltrācijas frakcijas. **B)** Sakoncentrētas 4. proteīna frakcijas no attīrīšanas ar gelfiltrāciju, M- marķieris, 4- ceturtais proteīns.

Figure 22. Visualisation of the 4th BMC protein and its attached protein in SDS-PAGE gel. **A)** Purification of the 4th protein using Superdex 10/600 gel filtration column, M- marker, 1-6- fractions from gel filtration. **B)** Concentrated fractions from 4th protein purification with gel filtration, M-marker, 4- the fourth protein.

Elektroforēzes gēla attēlos uzskatāmi redzams, ka arī salīdzinoši tīram 4. proteīnam piesaistījies cits, daudz lielāks proteīns, kura zona vairākās gelfiltrācijas frakcijās ir lielāka par paša 4. proteīna zonu (22. attēls A). Sakoncentrēto frakciju paraugā redzama salīdzinoši bieža zona mazliet virs 66,2 kDa marķiera atzīmes, kur esošais proteīns masspektrometrijā identificēts kā Hsp70. Šī zona tika izgriezta no gēla un apstrādāta ar triptiskās šķelšanas metodi. Analizējot nezināmā proteīna zonas triptiskos peptīdus ar masspektrometriju, tas tika

identificēts kā *E.coli* DnaK jeb Hsp70 proteīns. Kā redzams 23. attēlā, masspektrometrijā identificēti seši Hsp70 triptiskie peptīdi no visām sekvences daļām. Arī SDS-Page gela zonas novietojums apstiprina masspektrometrijas rezultātus - Hsp70 molekulmasa ir aptuveni 70 kDa.

```
1  AEVLKKMKKT AEDYLGEVPT EAVITVPAYF NDAQRQATKD AGRIAGLEVK
51  RIINEPTAAA LAYGLDKGTG NRTIAVYDLG GGTFDISIIE IDEVDGEKTF
101 EVLATNGDTH LGGEDFDSRL INYLVEEFKK DQGIDLRNDP LAMQRLKEAA
151 EKAKIELSSA QQTVDNLPYI TADATGPKHM NIKVTRAKLE SLVEDLVNRS
201 IEPLKVALQD AGLSVSDIDD VILVGGQTRM PMVQKKVAEF FGKEPRKDVN
251 PDEAVAIGAA VQGGVLTGDV KDVLLLDVTP LSLGIETMGG VMTTLIAKNT
301 TIPTKHSQVF STAEDNQSAV TIHVLQGERK RAADNKSLGQ FNLDGINPAP
351 RGMPQIEVTF DIDADGILHV SAKDKNSGK
```

23. attēls. MALDI-TOF masspektrometrijā konstatētie Hsp70 triptiskie peptīdi (treknrakstā).

Figure 23. Identified Hsp70 triptic peptides using MALDI-TOF mass spectrometry (in bold).

DnaK jeb Hsp 70 (heat shock protein 70 kDa), ir *E. coli* šūnās sastopams molekulārais čaperons un iesaistīts proteīnu foldinga nodrošināšanā. Izmēros mazi proteīni spēj foldēties bez ārējiem faktoriem un ar salīdzinoši lielu ātrumu (tikai dažas μs), daudzi proteīni ar garumu virs 100 aminoskābju atlikumiem bez ārējas ietekmes foldējas tikai daļēji, bieži veidojot globulāras struktūras bez vēlamajiem kontaktiem un lielām konformācijas variācijām. Lai proteīns foldētos līdz galam, jāpārvar liela enerģijas barjera. Šo procesu atvieglo čaperoni - tie samazina pilnīgam foldingam nepieciešamās enerģijas daudzumu un novērš daļēji foldēto proteīnu izjukšanu amorfos agregātos (F. Ulrich Hartl et al., 2011). Tā kā 4. proteīns ir vienīgais no BMC proteīniem, kura aminoskābju sekvence ir garāka par 100 atlikumiem, tā foldings bez čaperonu klātbūtnes, visticamāk, nenotiek pilnībā. Lai ceturtais proteīna foldings varētu notikt, tam piesaistās Hsp70 proteīns un atvieglo foldinga procesu, tādēļ arī tas konsekventi sastopams arī relatīvi tīros 4. proteīna paraugos.

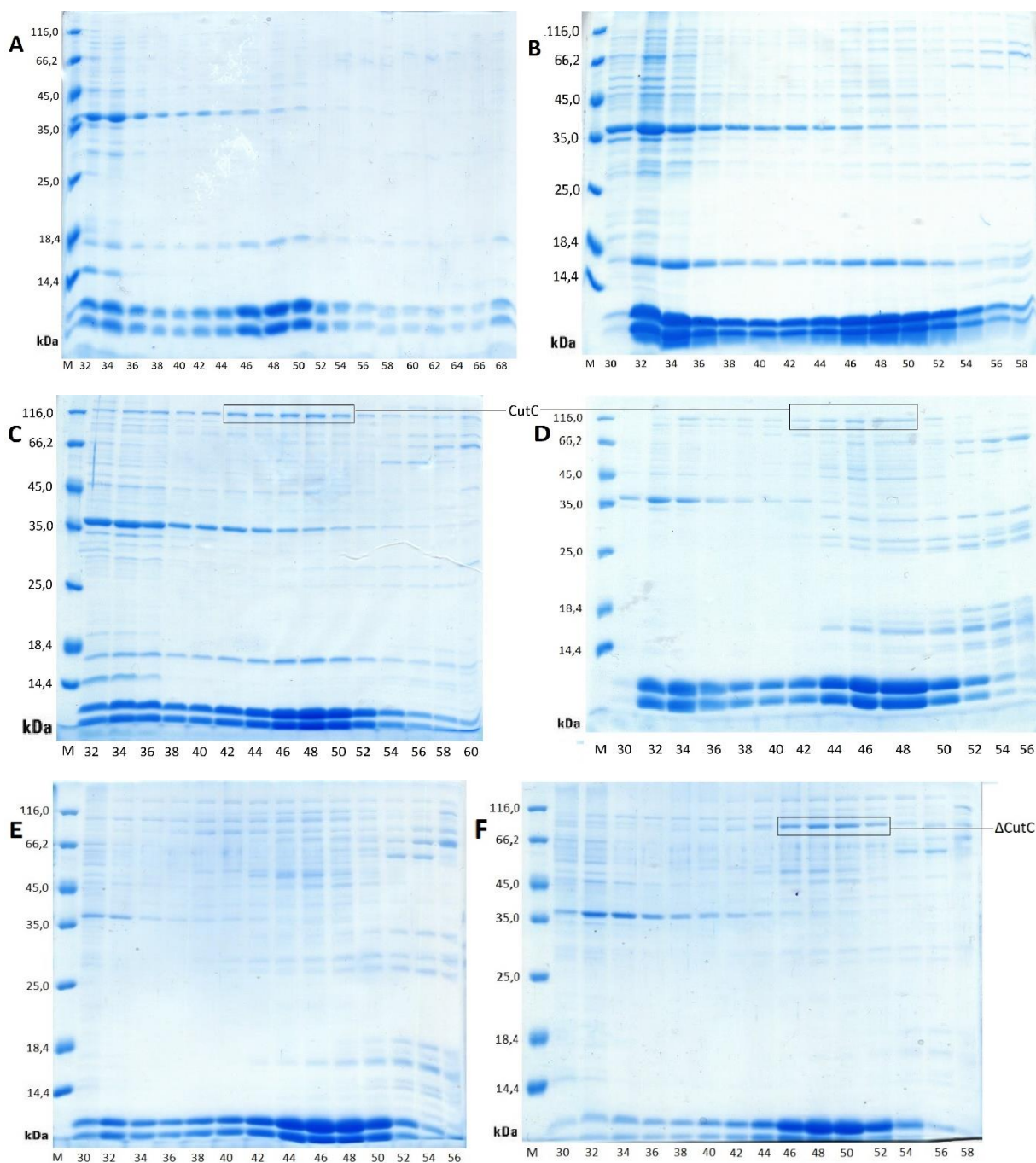
Hsp70 spēj mijiedarboties ar citu proteīnu hidrofobām peptīdu sekvencēm, kas nodrošina piesaistīšanos nefoldētiem proteīniem, kam hidrofobas sekvences ir pieejamas. Šajā gadījumā Hsp70 no *E. coli* šūnām piesaistījies ceturtais proteīna hidrofobai peptīdu sekvences daļai un, visticamāk, veicinājis 4. proteīna foldingu. Pētījumos, kur analizēti Pdu BMC, konstatēts, ka proteīnu sekvences daļas, kas nodrošina citu proteīnu piesaisti un iepakšanu bakteriālajos mikrokompartmentos, ir amfipātiskas un satur leicīna rāvējslēdzi (Christopher M. Jakobson et al., 2017). Leicīna rāvējslēdzis veidojas, savstarpējas mijiedarbības veidojot proteīnu α spirālēm, kam periodiski atkartojas leicīna aminoskābju atlikumi. Rezultātā spirāles vienā sēnā koncentrējas hidrofobi aminoskābju atlikumi, kas, nonākot kontaktā ar tādas pašas uzbūves spirāli, savienojas un veido hidrofobās mijiedarbības. Šāda tipa enkapsulācijas peptīda

partneris, kas atrodas ceturrtā proteīna sekvencē, arī būtu hidrofobs, tādēļ varētu piesaistīt Hsp70, kura piesaistīšanās pie proteīniem arī balstīta uz hidrofozām mijiedarbībām.

3.5. BMC producēšana ar koekspresētiem kodola enzīmiem

Lai pārbaudītu bakteriālo mikrokompartmentu kodolu enzīmu spēju iepakoties kompartmentos, trīs no četriem kodola enzīmiem (CutC, AlcDH un AldDH) katrs atsevišķi tika koekspresēti ar BMC čaulas proteīniem un attīrīti pēc tās pašas metodes, kā tika veikta tukšu kompartmentu attīrīšana. Proteīnu ekspresija veikta līdzīgi koekspresijas eksperimentiem, izmantojot divas plazmīdas - čaulas proteīni ekspresēti, izmantojot jau iepriekš aprakstīto 1-3combo+E konstruktu pETDuet vektorā. Šī plazmīda transformēta BL21 (DE3) *E.coli* celmā šūnās, un no tām pagatavotas kompetentās šūnas. Izveidotajās kompetentajās šūnās transformētas pRSF-TEVDuet plazmīdas, kurās bija izveidoti konstrukti ar katru no enzīmiem kopā ar ceturto proteīnu (CutC+4, AlcDH+4 un AldDH+4). Visas koekspresijas audzētas 0,4 L tilpumā, inducētas ar 1 mM IPTG un attīrītas pēc 3.1. apakšnodaļā aprakstītās shēmas, gelfiltrācijas attīrīšanai izmantojot Superose 6 10/600 gelfiltrācijas kolonnu.

Poliakrilamīda gela elektroforēzē analizējot gelfiltrācijas frakcijas no BMC attīrīšanas kopā ar AlcDH un AldDH, gelā nebija novērojamas zonas, kas atbilstu ekspresētajiem enzīmiem (23. attēls A-1-3combo+E-AlcDH+4, B-1-3combo+E-AldDH+4). Enzīmiem nesaistoties ar čaulas proteīniem, tie, visticamāk, ultracentrifugācijas procesā nav sedimentējušies un palikuši supernatantā, tādēļ arī nav redzami gelfiltrācijas attīrīšanas procesā. BMC čaulas proteīni izveidojuši tukšus kompartmentus - gelfiltrācijas attīrīšanas pīķa frakcijās gan ar AlcDH, gan AldDH redzami visi pieci ekspresētie čaulas proteīni. Enzīmiem raksturīgo zonu trūkums gelos liecina, ka AlcDH un AldDH nespēj saistīties ar pašu BMC un šie enzīmi kompartmentā tiek iepakoti, piesaistoties pie kāda no pārējiem kodola enzīmiem, kuru saistība jau aprakstīta 3.3. nodaļā. AlcDH un AldDH, visticamāk, saistās savstarpēji, abiem enzīmiem saistoties ar PTAC un AldDH piesaistoties arī pie raksturenzīma CutC.

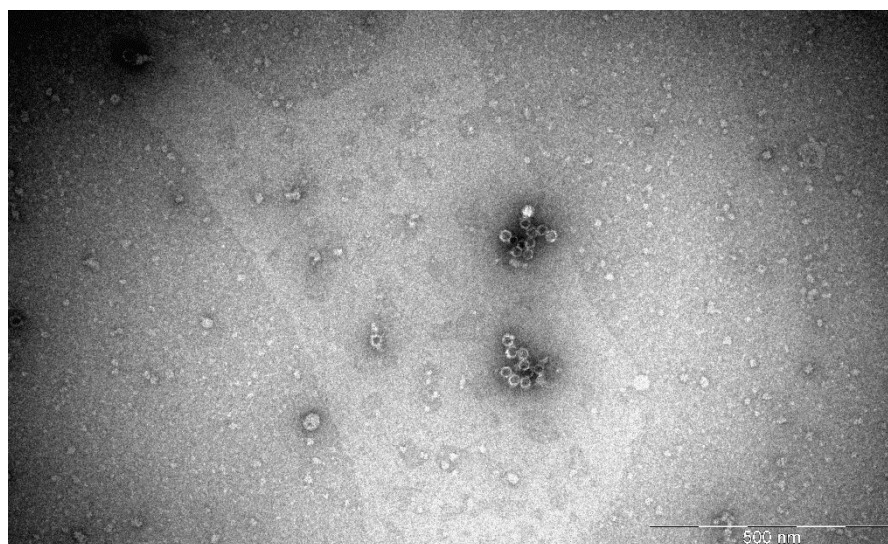


24. attēls. BMC producēšana ar koekspressētiem kodola enzīmiem, attīršana, izmantojot Superose 6 10/600 gelfiltrācijas kolonnu. **A)** 1-3combo+E-AlcDH+4 attīršana. M- marķieris, 32.-68. frakcija. **B)** 1-3combo+E-AldDH+4 attīršana. M-marķieris, 30.-58. frakcija. **C)** 1-3combo+E-CutC+4 attīršana, M- marķieris, 32.-60. frakcija. **D)** 1-3combo+E-CutC attīršana, M- marķieris, 30.-58. frakcija. C) un D) attēlos apvilktas CutC zonas. **E)** 1-3combo+E-N-CutC attīršana. M- marķieris, 30.-56. frakcija. **F)** 1-3combo+E- Δ CutC attīršana. M. marķieris, 30.-58. frakcija, apvilktas Δ CutC zonas.

Figure 24. BMC production with coexpressed core enzymes, purification using Superose 6 10/600 gel filtration column. **A)** Purification of 1-3combo+E-AlcDH+4. M- marker, fractions 32 to 68. **B)** Purification of 1-3combo+E-AldDH+4. M- marker, fractions 30 to 58. **C)** Purification of 1-3combo+E-CutC+4. M- marker, fractions 32 to 60. **D)** Purification of 1-3combo+E-CutC. M- marker, fractions 30 to 58. In images C) and D) the CutC corresponding zones are marked. **E)** Purification of 1-3combo+E-N-CutC. M- marker, fractions 30 to 56. **F)** Purification of 1-3combo+E- Δ CutC. M- marker, fractions 30 to 58, Δ CutC corresponding zones are marked.

Vienīgais no pārbaudītajiem enzīmiem, kas spēja saistīties ar bakteriālo mikrokompartmentu čaulu, bija raksturenzīms CutC - enzīmam raksturīgā zona bija redzama

BMC pīķa frakcijās (24. attēls C), kas liecina par enzīma klātbūtni BMC. Apskatot šo 1-3combo+E-CutC+4 paraugu no pīķa 50. frakcijas ar elektronmikroskopijas palīdzību, bija novērojami bakteriālie mikrokompartimenti (25. attēls), taču to izmērs salīdzinājumā ar tukšiem BMC (12. attēls B) nebija ievērojami mainījies. CutC piesaiste čaulas proteīniem varētu liecināt par raksturenzīma nozīmīgo lomu veiksmīgā kodola savākšanās un funkcionāla kompartimenta izveides procesā.



25. attēls. Elektronmikroskopijas attēls ar 1-3c+E-CutC+4 pēc gelfiltrācijas (50. frakcija).

Figure 25. Electronmicroscopy images of 1-3c+E-CutC+4 after gel filtration (fraction No. 50).

Enzīmu koekspresijas eksperimentos ar atsevišķajiem čaulas proteīniem visi pārbaudītie enzīmi saistījās ar 4. BMC čaulas proteīnu, kas lika izdarīt pieņēmumu par 4. proteīnu kā starpnieku enzīmu iepakojšanai. Lai pārbaudītu šo hipotēzi, visi trīs kodola enzīmi (AlcDH, AldDH un CutC), kuru saistība ar čaulas enzīmiem tika pārbaudīta, tos koekspresējot kopā ar visiem pieciem čaulas proteīniem, tika ekspresēti, izmantojot tikai četrus čaulas proteīnus, kas izmantoti tukšo BMC sintēzē, t.i. bez 4. BMC proteīna. Līdzīgi kā ar visiem pieciem čaulas proteīniem, AlcDH un AldDH saistīšanās nenotika arī šajā gadījumā. Savukārt, analizējot attīrīto 1-3combo+E+CutC kombināciju, poliakrilamīda gelā bakteriālo mikrokompartimentu pīķa frakcijās novērojama zona, kas atbilst CutC (24. attēls D).

Akrilamīda gelā vizualizētajās frakcijās CutC zonas ir nedaudz mazākas kā raksturenzīma koekspresijā ar visiem pieciem čaulas proteīniem, bet CutC klātbūtne liecina, ka 4. BMC proteīnam nav tik nozīmīga loma enzīmu piesaistē, kā iepriekš tika prognozēts. Iespējams, 4. proteīns veicina enzīmu efektīvāku piesaisti, stabilizējot vai pastiprinot mijiedarbības starp CutC un čaulas proteīniem, taču tas nav obligāti nepieciešams, lai notiktu CutC piesaistīšanās čaulas proteīniem un tā iepakojšana kompartmentā.

Lai detalizētāk spētu analizēt CutC piesaistīšanās spēju pie BMC čaulas proteīniem, četru čaulas proteīnu (1-3combo+E) ekspresija tika veikta kopā ar jau koekspresijas analizē izmantotajiem CutC variantiem ar un bez N-terminālā domēna. Čaulas proteīni tika ekspresēti ar CutC katalītisko domēnu (bez N-terminālā domēna, Δ CutC) un konstruktu, kas satur tikai N-terminālo domēnu (N-CutC). Šādā veidā būtu iespējams pārbaudīt potenciālo N-terminālā domēna lomu CutC piesaistei bakteriālā mikrokompartmenta čaulas enzīmiem. Arī šajā gadījumā proteīnu producēšana un attīrīšana veikta kā iepriekš, izmantojot Superose 6 10/600 gelfiltrācijas kolonnu.

Gelfiltrācijas frakciju analīze parāda, ka Δ CutC veiksmīgi iepakojas BMC, taču N-CutC zonas poliakrilamīda gelā nav redzamas (24. attēls E). C terminālo domēnu saturošā CutC zona redzama frakcijās ar lielāko BMC čaulas proteīnu koncentrāciju, un liecina par veiksmīgu saistīšanos starp enzīmu un čaulas proteīniem (24. attēls F). Šāds rezultāts noraida iepriekš izvirzīto teoriju par N-domēna lomu CutC piesaistē un iepakojšanā kompartmentā (Jan Zarzycki et al., 2015). Iespējams, CutC N-terminālā domēna loma varētu būt vairāk saistīta ar pārējo kodola enzīmu piesaistīšanu kompartmenta čaulas proteīniem, ko varētu pārbaudīt, BMC čaulas proteīnus un pārējos trīs kodola enzīmus koekspresējot kopā ar katru no CutC variantiem. Šādā veidā uzskatāmi būtu iespējams vizualizēt katra CutC domēna lomu pārējo enzīmu piesaistē kompartmenta čaulai, un detalizētāk izprast raksturenzīma nozīmi kopējā bakteriālo mikrokompartmentu veidošanās procesā.

Tā kā neviens no testētajiem enzīmiem, atskaitot CutC, nespēj piesaistīties čaulas proteīniem, tas varētu kalpot par adaptoru starp enzīmu veidoto kodolu un čaulu. Karboksisimām ir konstatēti adaptoru proteīni (Thawatchai Chaijarasphong, et al., 2016, Fei Cai et al., 2015), taču metabolosomām tādi vēl nav identificēti. Lai šo hipotēzi pārbaudītu, pirmkārt, būtu nepieciešams pārbaudīt arī PTAC spēju saistīties ar čaulas proteīniem, lai pilnībā apstiprinātu, ka CutC vienīgajam piemīt īpašība saistīties ar čaulu, un, otrkārt, ekspresēt čaulas proteīnus ar AlcDH, AldDH un PTAC ar un bez CutC klātbūtnes ar mērķi noskaidrot vai CutC klātbūtnē kāds no kodola enzīmiem spēj iepakoties BMC čaulā.

SECINĀJUMI

1. Koekspresējot četrus GRE2 tipa bakteriālo mikrokompartmenu proteīnus (1., 2., 3. un EutN), var iegūt simetriskas BMC daļiņas ar diametru 25-30 nm.
2. BMC daļiņu veidošanai ir nepieciešams mutants 3. proteīns ar 4 pēdējo aminoskābju *missense* mutāciju un 8 aminoskābju pagarinājumu.
3. Tukšas iegūtās BMC daļiņas satur vismaz trīs no četriem ekspresētajiem proteīniem (1.,3. un EutN).
4. Ceturtais BMC proteīns piesaista Hsp70, iespējams nesafoldēšanās vai hidrofobas mijiedarbības veidošanās dēļ.
5. Ceturtais BMC proteīns spēj saistīties ar visiem pilna garuma GRE2 kodola enzīmiem.
6. Kodola enzīmi veido savstarpējas mijiedarbības dažādās kombinācijās - CutC saistās ar AldDH un PTAC, AlcDH saistās ar AldDH un PTAC, AldDH saistās ar AlcDH un PTAC un PTAC saistās ar visiem trim enzīmiem: gan CutC, gan AlcDH, gan arī AldDH.
7. CutC spēj iepakoties BMC čaulā, un tas notiek arī bez ceturta BMC proteīna klātbūtnes, līdz ar to sākotnējā hipotēze par ceturta proteīna kā iepakšanas mediatora lomu nav apstiprināma.
8. CutC N-terminālā domēna klātbūtne nav obligāti nepieciešama CutC iepakšanai BMC, līdz ar to tā funkcija paliek nezināma.

PATEICĪBAS

Vēlētos izteikt pateicību:

Darba vadītājam *MSc. biol.* Gintam Kalniņam - par darba vadīšanu, palīdzību, padomiem un atbalstu;

Dr. biol., prof. Kasparam Tāram - par iespēju izstrādāt bakalaura darbu;

MSc. biol. Egijai Zolei- par darba recenzēšanu;

MSc. biol. Ilvai Liekniņai- par zinātnisko palīdzību, skaidrojumiem un ieteikumiem;

Inārai Akopjanai - par palīdzību un padomiem mikrobioloģisko darbu veikšanā;

Gundai Grīnbergai - par ultracentrifugāciju;

Dr. biol. Jurim Jansonam- par elektronmikroskopijas sietiņu sagatavošanu un palīdzību elektronmikroskopijas attēlu iegūšanā.

IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS

- Anna H. Chen, Avi Robinson-Mosher, David F. Savage, Pamela A. Silver¹, Jessica K. Polka. (2013). The Bacterial Carbon-Fixing Organelle Is Formed by Shell Envelopment of Preassembled Cargo. *PLoS ONE*, 8(9), e76127. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076127>
- Chenguang Fan, Shouqiang Cheng, Yu Liu, Cristina M. Escobar, Christopher S. Crowley, Robert E. Jefferson, Todd O. Yeates and Thomas A. Bobika. (2010). Short N-terminal sequences package proteins into bacterial microcompartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7509-7514. doi:10.1073/pnas.0913199107
- Cheryl A. Kerfeld and Onur Erbilgin. (2015). Bacterial microcompartments and the modular construction of microbial metabolism. *Trends in Microbiology*, 23(1), 1-13. doi:10.1016/j.tim.2014.10.003
- Cheryl A. Kerfeld, Michael R. Sawaya, Shiho Tanaka, Chau V. Nguyen, Martin Phillips, Morgan Beeby, Todd O. Yeates. (2005). Protein Structures Forming the Shell of Primitive Bacterial Organelles. *Science*, 309, 936-938. doi:10.1126/science.1113397
- Cheryl A. Kerfeld, Sabine Heinhorst and Gordon C. Cannon. (2010). Bacterial Microcompartments. *The Annual Review of Microbiology*, 64, 391-408. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134211
- Cheryl A. Kerfeld, Clement Aussignargues, Jan Zarzycki, Fei Cai and Markus Sutter. (2018). Bacterial microcompartments. *Nature Reviews Microbiology*, 64, 1-14. doi:10.1038/nrmicro.2018.10
- Chiranjit Chowdhury, Sharmistha Sinha, Sunny Chun, Todd O. Yeates and Thomas A. Bobika. (2014). Diverse Bacterial Microcompartment Organelles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), 439-468. doi:10.1128/MMBR.00009-14
- Chiranjit Chowdhury, Sunny Chun, Allan Pang, Michael R. Sawaya, Sharmistha Sinha, Todd O. Yeates and Thomas A. Bobik. (2015). Selective molecular transport through the protein shell of a bacterial microcompartment organelle. *PNAS*, 112(10), 2990-2995. doi:10.1073/pnas.1423672112
- Christopher J. Thibodeaux and Wilfred A. van der Donk. (2012). Converging on a mechanism for choline degradation. *PNAS*, 109(52), 21184-21185. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1219534110>
- Cristina V. Iancu, Dylan M. Morris, Zhicheng Dou, Sabine Heinhorst, Gordon C. Cannon, Grant J. Jensen. (2010). Organization, Structure, and Assembly of α -Carboxysomes

- Determined by Electron Cryotomography of Intact Cells. *Journal of Molecular Biology*, 396(1), 105-117. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.019>
- Fei Cai, Markus Sutter, Jeffrey C. Cameron, Desiree N. Stanley, James N. Kinney and Cheryl A. Kerfeld. (2013). The Structure of CcmP, a Tandem Bacterial Microcompartment Domain Protein from the beta-Carboxysome, Forms a Subcompartment Within a Microcompartment. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 288(22), 16055–16063. doi:DOI10.1074/jbc.M113.456897
- Fei Cai, Susan L. Bernstein, Steven C. Wilson, and Cheryl A. Kerfeld. (2016). Production and Characterization of Synthetic Carboxysome Shells with Incorporated Luminal Proteins. *Plant Physiology*, 170, 1868–1877.
- Fei Cai, Zhicheng Dou, Susan L. Bernstein, Ryan Leverenz, Sabine Heinhorst, Jessup Shively, Gordon C. Cannon and Cheryl A. Kerfeld. (2015). *Life*, 5, 1141-1171. doi:doi:10.3390/life5021141
- Frey M., Rothe M, Wagner AF, Knappe J. (1994). Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycyl radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. Studies of [2H]glycine-substituted enzyme and peptides homologous to the glycine 734 site. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(17), 12432-1243.
- Gints Kalnins, Janis Kuka, Solveiga Grinberga, Marina Makrecka-Kuka, Edgars Liepinsh, Maija Dambrova and Kaspars Tars. (2015). Structure and Function of CutC Choline Lyase from Human Microbiota Bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(35), 21732-21740. doi:10.1074/jbc.M115.670471
- Gordon C. Cannon, Christopher E. Bradburne, Henry C. Aldrich, Stefanie H. Baker, Sabine Heinhorst, and Jessup M. Shively. (2001). Microcompartments in Prokaryotes: Carboxysomes and Related Polyhedra. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5351-5361. doi:10.1128/AEM.67.12.5351–5361.2001
- Gregory D. Havemann and Thomas A. Bobik. (2003). Protein Content of Polyhedral Organelles Involved in Coenzyme B12-Dependent Degradation of 1,2-Propanediol in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. *Journal of Bacteriology*, 185(17), 5086-5095.
- Huseby DL, Roth JR. (2013). Evidence that a metabolic microcompartment contains and recycles private cofactor pools. *Journal of Bacteriology*, 195(12), 2864-2879. doi:10.1128/JB.02179-12
- Jan Zarzycki, Onur Erbilgin, Cheryl A. Kerfeld. (2015). Bioinformatic Characterization of Glycyl Radical Enzyme-Associated Bacterial Microcompartments. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(24), 8315–8329. doi:10.1128/AEM.02587-15.

- Jason D. Perlmutter, Farzaneh Mohajerani, Michael F. Hagan. (2016). Many-molecule encapsulation by an icosahedral shell. *eLife*, 5, 1-25. doi:DOI: 10.7554/eLife.14078
- Jeffrey C. Cameron, Steven C. Wilson, Susan L. Bernstein, Cheryl A. Kerfeld. (2013). Biogenesis of a Bacterial Organelle: The Carboxysome Assembly Pathway. *Cell*, 155, 1131-1140. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.044
- Julien Jorda, David Lopez, Nicole M. Wheatley and Todd O. Yeates. (2013). Using comparative genomics to uncover new kinds of protein-based metabolic organelles in bacteria. *Protein Science*, 22, 179-195. doi:10.1002/pro.2196
- Krista A. Shisler and Joan B. Broderick. (2014). Glycyl radical activating enzymes: Structure, mechanism, and substrate interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 546, 64-71. doi:https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.01.020
- Lee, M. J., Brown, I. R., Juodeikis, R., Frank, S. & Warren, M. J. (2016. gada Jul). Employing bacterial microcompartment technology to engineer a shell-free enzyme-aggregate for enhanced 1,2-propanediol production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*.
- Markus Sutter, Basil Greber, Clement Aussignargues, Cheryl A. Kerfeld. (2017). Assembly principles and structure of a 6.5-MDa bacterial microcompartment shell. *Science*, 356, 1293–1297.
- Markus Sutter, Daniel Boehringer, Sascha Gutmann, Susanne Gunther, David Prangishvili, Martin J Loessner, Karl O Stetter, Eilika Weber-Ban & Nenad Ban. (2008). Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(9), 939-947. doi:10.1038/nsmb.1473
- Martin Sagermann, Akashi Ohtakia and Kiel Nikolakakis. (2009). Crystal structure of the EutL shell protein of the ethanolamine ammonia lyase microcompartment. *PNAS*, 106(22), 8883– 8887. doi:doi10.1073/pnas.0902324106
- Michael G. Klein, Peter Zwart, Sarah C. Bagby, Fei Cai, Sallie W. Chisholm, Sabine Heinhorst, Gordon C. Cannon, Cheryl A. Kerfeld. (2009). Identification and Structural Analysis of a Novel Carboxysome Shell Protein with Implications for Metabolite Transport. *Journal of Molecular Biology*, 392, 319-333. doi:10.1016/j.jmb.2009.03.056
- Mihoko Takenoya, Kiel Nikolakakis and Martin Sagermann. (2010). Crystallographic Insights into the Pore Structures and Mechanisms of the EutL and EutM Shell Proteins of the Ethanolamine-Utilizing Microcompartment of *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 192(22), 6056–6063. doi:doi:10.1128/JB.00652-10
- Ping Chen, Dan I. Andersson and John R. Roth. (1994). The Control Region of the pdu/cob Regulon in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 176(17), 5474-5482.

- Seth D. Axen, Onur Erbilgin, Cheryl A. Kerfeld. (2014). A Taxonomy of Bacterial Microcompartment Loci Constructed by a Novel Scoring Method. *PLoS Computational Biology*, 10(10), 1-10. doi:10.1371/journal.pcbi.1003898
- Shiho Tanaka, Cheryl A. Kerfeld, Michael R. Sawaya, Fei Cai, Sabine Heinhorst, Gordon C. Cannon, Todd O. Yeates. (2008). Atomic-Level Models of the Bacterial Carboxysome Shell. *Science*, 319, 1083-1086. doi:10.1126/science.1151458
- Shouqiang Cheng, Chenguang Fan, Sharmistha Sinha and Thomas A. Bobik. (2012). The PduQ Enzyme Is an Alcohol Dehydrogenase Used to Recycle NAD⁺ Internally within the Pdu Microcompartment of *Salmonella enterica*. *PLoS One*, 7(10), e47144. doi:10.1371/journal.pone.0047144
- Smaranda Craciun and Emily P. Balskus. (2012). Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycyl radical enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(52), 21307–21312. doi:10.1073/pnas.1215689109
- Smaranda Craciun, Jonathan A. Marks, and Emily P. Balskus. (2014). Characterization of Choline Trimethylamine-Lyase Expands the Chemistry of Glycyl Radical Enzymes. *ACS Chemical Biology*, 9, 1408-1413. doi:10.1021/cb500113p
- Steven H. Zeisel and Kerry-Ann da Costa. (2009). Choline: An Essential Nutrient for Public Health. *Nutrition Reviews*, 11, 615-623. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x
- Thawatchai Chaijarasphong, Robert J. Nichols, Kaitlyn E. Kortright, Charlotte F. Nixon, Poh K. Teng, Luke M. Oltrogge and David F. Savage. (2016). Programmed Ribosomal Frameshifting Mediates Expression of the α -Carboxysome. *Journal of Molecular Biology*, 428, 153-164.
- Thorsten Selmer, Antonio J. Pierik and Johann Heider. (2005). New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria. *Biological Chemistry*, 386, 981–988. doi:10.1515/BC.2005.114
- Todd O. Yeates, Cheryl A. Kerfeld, Sabine Heinhorst, Gordon C. Cannon and Jessup M. Shively. (2008). Protein-based organelles in bacteria: carboxysomes and related microcompartments. *Nature reviews*, 6, 681-691. doi:10.1038/nrmicro1913.
- Todd O. Yeates, Christopher S. Crowley and Shiho Tanaka. (2010). Bacterial Microcompartment Organelles: Protein Shell Structure and Evolution. *Annu Rev Biophys*, 39, 185-205. doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131418
- W.H. Wilson Tang, M.D., Zeneng Wang, Ph.D., Bruce S. Levison, Ph.D., Robert A. Koeth, B.S., Earl B. Britt, M.D., Xiaoming Fu, M.S., Yuping Wu, Ph.D., and Stanley L. Hazen, M.D., Ph.D. (2013). Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and

Cardiovascular Risk. *The New England Journal of Medicine*, 368(17), 1575-1584.
doi:10.1056/NEJMoa1109400

W.H. Wilson Tang, Zeneng Wang, David J. Kennedy, Yuping Wu, Jennifer A. Buffa, Brendan Agatista-Boyle, Xinmin S. Li, Bruce S. Levison, Stanley L. Hazen. (2014). Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Pathway Contributes to Both Development of Renal Insufficiency and Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. *Circulation Research*, 116(3), 448-455.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305360

PIELIKUMI

1. pielikums
pRSF-TEVDuet plazmīdas ģenētiskā karte

pRSF-TEVDuet

```

                                ACYCDuetUP1 →                                T7 promoter-1
GCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAATTAATACGACTCACTATA

lac operator                                rbs                                His-Tag
GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAAATAATTTTGTAACTTTAATAAGGAGATAATCGATGGGCAGCAGCCATCACCATCACCAC
                                M G S S H H H H H H

                                NcoI      PstI      HindIII
TEV cleavage site BamHI  AscI      SalI      NotI      AflII
AGCCAGGATCACGAAACCTGTACTTTCAGGGATCCATGGCGGCCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAAGTCGAACAGAAAGTAATC
S Q D H E N L Y F Q G S M A R L Q V D K L A A A *

TatI  DuetUP2 →      T7 promoter-2      lac operator
GTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAG
← DuetDOWN1

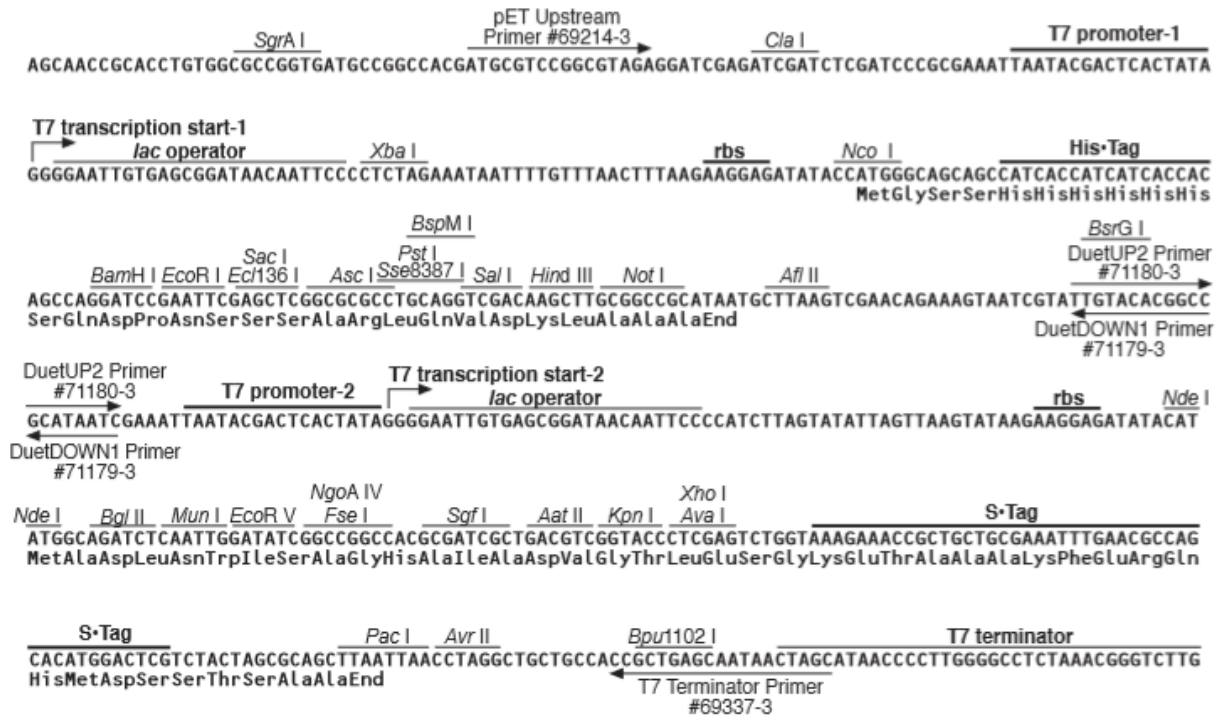
rbs      NdeI  BglII      MfeI      FseI      PvuI      KpnI
AAGGAGATATACATATGGCAGATCTCAATTGGATATCGGCCGGCCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCCCTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAA
M A D L N W I S A G H A I A D V G T L E S G K E T A A A K

                                PacI  AvrII
ATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGCGCAGCTTAATTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCT
F E R Q H M D S S T S A A *

AACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGAAACCTCAGGCATTGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAACCCAGCAATAGA
← T7_rev

```

2. pielikums
 PETDuet-1 plazmīdas ģenētiskā karte



pETDuet-1 cloning/expression regions

3. pielikums

1-3combo praimeru mutantās un natīvās sekvences salīdzinājums

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1668 bits(903)	0.0	906/907(99%)	1/907(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCATGGGTGATGCATTGGGGCTTATCGAAACCAAAGGTCTGGTGGCCTGTATTGAAGCAG	60		
Sbjct 1	CCATGGGTGATGCATTGGGGCTTATCGAAACCAAAGGTCTGGTGGCCTGTATTGAAGCAG	60		
Query 61	CGGACGCGATGTGTAAGCCGCCAACGTCGAACTGATCGGCTATGAAAACGTCGGCTCCG	120		
Sbjct 61	CGGACGCGATGTGTAAGCCGCCAACGTCGAACTGATCGGCTATGAAAACGTCGGCTCCG	120		
Query 121	GCCTGGTCACCGTGATGGTGAAAGGCGACGTCGGCGCGGTAAAAGCGGCGGTGGATTCCG	180		
Sbjct 121	GCCTGGTCACCGTGATGGTGAAAGGCGACGTCGGCGCGGTAAAAGCGGCGGTGGATTCCG	180		
Query 181	GTGTGGAATCCGCGCAGCGCATCGGCGAAGTGGTGACCTCGCTGGTCATCGCGCGTCCAC	240		
Sbjct 181	GTGTGGAATCCGCGCAGCGCATCGGCGAAGTGGTGACCTCGCTGGTCATCGCGCGTCCAC	240		
Query 241	ATAACGACATCAACAAAATCGTCATTAAACACAAGGCCGAAGGCCAGGAGAACGCAAAAT	300		
Sbjct 241	ATAACGACATCAACAAAATCGTCATTAAACACAAGGCCGAAGGCCAGGAGAACGCAAAAT	300		
Query 301	GGGTGATGCATTAGGTCTGATTGAAACCAAAGGTCTGGTGGCCTGCATTGAAGCGGC	360		
Sbjct 301	GGGTGATGCATTAGGTCTGATTGAAACCAAAGGTCTGGTGGCCTGCATTGAAGCGGC	360		
Query 361	TGCGATGTGTAAGCCGCCAACGTCGAGCTTATCGGCTATGAAAACGTCGGCTCCGGCCT	420		
Sbjct 361	TGCGATGTGTAAGCCGCCAACGTCGAGCTTATCGGCTATGAAAACGTCGGCTCCGGCCT	420		
Query 421	GGTCACCGCGATGGTGAAAGGCGACGTCGGCGCGGTGAAAGCAGCGGTGGATTCCGGTGT	480		
Sbjct 421	GGTCACCGCGATGGTGAAAGGCGACGTCGGCGCGGTGAAAGCAGCGGTGGATTCCGGTGT	480		
Query 481	GGAATCGGCGCAGCGCATCGGAGAAGTGGTGACCTCGCTGGTTATCGCCCCTCCGCATAA	540		
Sbjct 481	GGAATCGGCGCAGCGCATCGGAGAAGTGGTGACCTCGCTGGTTATCGCCCCTCCGCATAA	540		
Query 541	CGACATCAACAAAATCGTCTCGCATTACAAAATTGCGGACTAACGGAGAAACCTGATGAA	600		
Sbjct 541	CGACATCAACAAAATCGTCTCGCATTACAAAATTGCGGACTAACGGAGAAACCTGATGAA	600		
Query 601	AGAAGCGCTTGGTCTTATCGAAACCAAAGGTCTGGTGGCCTGTATTGAAGCCGCGGATGC	660		
Sbjct 601	AGAAGCGCTTGGTCTTATCGAAACCAAAGGTCTGGTGGCCTGTATTGAAGCCGCGGATGC	660		
Query 661	GATGTGTAAGCCGCCAACGTCGAATTGATTGGCTATGAAAACGTCGGCTCCGGCCTGGT	720		
Sbjct 661	GATGTGTAAGCCGCCAACGTCGAATTGATTGGCTATGAAAACGTCGGCTCCGGCCTGGT	720		
Query 721	CACCGCGATGGTGAAAGGCGACGTCGGCGCGGTCAACGCAGCGGTGACTCCGGCGTGGA	780		
Sbjct 721	CACCGCGATGGTGAAAGGCGACGTCGGCGCGGTCAACGCAGCGGTGACTCCGGCGTGGA	780		
Query 781	AGCGGCGAAACGCATCGGCAAGGTCGTCAGCTCTCGCGTATTGCGCGTCCACATAACGA	840		
Sbjct 781	AGCGGCGAAACGCATCGGCAAGGTCGTCAGCTCTCGCGTATTGCGCGTCCACATAACGA	840		
Query 841	CATCGAAAAATCGCCTCGCAGCACAAAGCATAAAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAG	900		
Sbjct 841	CATCGAAAAATCGCCTCGCAGCACAAAGCATAAAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAG	899		
Query 901	TCGAACA	907		
Sbjct 900	TCGAACA	906		

Bakalaura darbs „Ar holīna liāzi saistīto bakteriālo mikrokompartmentu raksturojums”
izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie
informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniska kopija atbilst izdrukai.

Autore: Eva Emīlija Česle

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: *MSc.biol.* Gints Kalniņš

Recenzents: *MSc.biol.* Egija Zole

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē

31.05.2018.

Darbs aizstāvēts bakalaura darbu pārbaudījuma komisijas sēdē.

06.06.2018.

Komisijas sekretārs(-e):