

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**AUGU PEPTĪDU CIKLĀŽU REKOMBINANTA IEGŪŠANA UN *IN VITRO* REKONSTITŪCIJA**

MAGISTRA DARBS

Darba autore: *BSc. biol.* Anna Līna Bula  
Stud. apl. Nr.: ab19189  
Darba vadītājs: *Dr.* Teodors Panteļejevs  
Darba recenzente: *Dr. biol.* Ilva Liekniņa

RĪGA 2024

## KOPSAVILKUMS

BURP domēna proteīni ir augu izcelsmes proteīni, kuriem nesēn raksturota peptīdu ciklāzes aktivitāte. Dabā sastopamas gan BURP autociklāzes, gan BURP transciklāzes.

Darba mērķis bija izpētīt BURP autociklāžu *in vitro* rekonstitūcijas pieejas, kā arī veikt rekombinantu lineāru peptīdu substrātu produkciju un pārbaudīt, vai rekonstitutētie BURP proteīni spēj veikt transciklizāciju. *E. coli* ekspresijas sistēmā producēja trīs augu sugu BURP domēna proteīnus un to rekonstitūcijai izmantoja šādas pieejas: ekspresija *E. coli SHuffle* šūnās, bezšūnu sintēze, ķīmiska refoldēšana. Izdevās veikt rekonstitūciju AhyBURP proteīnam un noteikt to stabilizējošus apstākļus, kā arī raksturot tā autociklizācijas reakciju.

Darbs tika izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā starptautiskā studentu sintētiskās bioloģijas konkursa “iGEM 2023” ietvaros.

**Atslēgvārdi: RiPPs, cikliski peptīdi, BURP domēns, proteīnu rekonstitūcija**

## SUMMARY

BURP domain proteins are plant proteins that have recently been characterized as peptide cyclases. In nature, both BURP autocyclases and BURP transcyclases are found.

The aim of the study was to investigate the *in vitro* reconstitution of BURP autocyclases and to produce recombinant linear peptide substrates to test whether these BURP proteins are capable of transcyclization. BURPs from three plant species were produced using the *E. coli* expression system, and the following approaches were used for reconstitution: expression in *E. coli SHuffle* cells, cell-free synthesis, and chemical refolding. Successful reconstitution of the AhyBURP protein and characterization of its stabilizing conditions were achieved.

The work was done at the Latvian Institute of Organic Synthesis as part of the international synthetic biology competition "iGEM 2023".

**Keywords: RiPPs, cyclic peptides, BURP domain, protein reconstitution**

# SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI .....	5
IEVADS .....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	7
1.1. Cikliski peptīdi un to iegūšana .....	7
1.1.1. Organiskās sintēzes metodes .....	7
1.1.2. Bioloģiskas ieguves metodes .....	8
1.2. Ribosomāli sintezēti un pēc translācijas modificēti peptīdi .....	10
1.2.1. RiPP un to biosintēzes ceļu atklāšana .....	11
1.2.2. Augu RiPPs .....	12
1.3. BURP domēna proteīni .....	13
1.3.1. BURP proteīnu atklāšana .....	13
1.3.2. BURP domēna peptīdu ciklāzes aktivitāte .....	14
1.3.3. BURP domēna struktūra .....	17
1.4. Disulfīdu saturošu proteīnu rekombinanta producēšana .....	18
2. MATERIĀLI UN METODES .....	20
2.1. Materiāli .....	20
2.2. Metodes .....	23
2.2.1. Ekspresijas konstruktū dizains .....	23
2.2.2. Klonēšana .....	23
2.2.3. Ekspresijas testi .....	24
2.2.4. Lielapjoma ekspresija .....	24
2.2.5. Ekspresija ar autoindukciju .....	25
2.2.6. Proteīnu bezšūnu sintēze .....	25
2.2.7. Proteīnu attīrīšana .....	26
2.2.8. Proteīnu refoldēšana .....	26
2.2.9. Termālās nobīdes skrīnings .....	27
2.2.10. Ciklizēšanas reakcijas .....	27
2.2.11. Masspektrometrija .....	28
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	29
3.1. BURP proteīnu ekspresijas testi .....	29
3.2. BURP proteīnu attīrīšana .....	30
3.3. BURP proteīnu foldēšanās problēma .....	32
3.3.1. Ekspresija <i>SHuffle</i> šūnās .....	33
3.3.2. Bezšūnu sintēze .....	35
3.3.3. Refoldēšana .....	36
3.4. Rekombinantu peptīdu producēšana .....	39
3.5. Ciklizēšanas reakcijas .....	41
3.5.1. Autociklizēšana .....	41
3.5.2. Lineāro peptīdu ciklizēšana .....	43
3.6. Problēmas, potenciālie risinājumi .....	44
3.7. Nākotnes perspektīvas .....	45
SECINĀJUMI .....	47
PATEICĪBAS .....	48
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	49
PIELIKUMI .....	55

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

DMSO – dimetilsulfoksīds

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

DTT – ditiotreitols

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe

IPTG – izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozīds

LB – lizogēnā barotne (angļu val. *Lysogeny broth*)

LC-MS – šķidrās hromatogrāfijas masspektrometrija

MALDI-TOF – matricas asistēta lāzera dezorpcijas/ionizācijas lidojuma laika masspektrometrija

MES – 2-(N-morfolino)-etānsulfonskābe

MS/MS – tandēma masspektrometrija

MWCO – *molecular weight cut off* (angļu val.), molmasas robeža

OD<sub>600</sub> – optiskais blīvums (absorbcija) pie 600 nm

PIPES – piperazīn-*N,N'*-bis(2-etānsulfonskābe)

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorīds

RiPP – ribosomāli pēc translācijas modificēti peptīdi

RNS – ribonukleīnskābe

SDS – nātrijs dodecilsulfāts

SDS-PAGE – nātrijs dodecilsulfāta poliakrilamīda gēla elektroforēze

SOC – superoptimālā barotne ar katabolītu supresiju

TCEP – tris(2-karboksietil)fosfīns

Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)-propān-1,3-diols

## IEVADS

Ribosomāli sintezēti pēc translācijas modificēti peptīdi (RiPPs) ir plaša un daudzveidīga dabā sastopamu peptīdu klase, kas ietver augstvērtīgus savienojumus ar vērtīgām bioaktivitātēm. Perspektīva RiPP apakšklase ir cikliskie peptīdi, kuru augstā stabilitāte, specifitāte un šūnu membrānas permeabilitāte padara tos par vērtīgiem zāļvielu kandidātiem (Ji, Nielsen et al. 2024). Nesen augu BURP domēna proteīni identificēti kā RiPP producējošas peptīdu ciklāzes – enzīmi, kas katalizē ciklizēšanas reakciju starp peptīda aminoskābju atlikumiem (Chigumba et al. 2022). BURP domēnu proteīni dabā sastopami gan kā autociklāzes, kas ekspresētas vienā polipeptīdā ar savu peptīdu substrātu, gan kā transciklāzes, kas ekspresētas atsevišķi no sava peptīdu substrāta (Lima et al. 2023). BURP proteīnus potenciāli varētu attīstīt kā sintētiskās bioloģijas rīkus ciklisko peptīdu producēšanai.

**Darba mērķis** ir izpētīt trīs augu sugu BURP autociklāžu *in vitro* rekonstitūcijas pieejas un pārbaudīt, vai šie proteīni spēj veikt arī transciklizāciju.

### **Darba uzdevumi:**

- veikt BURP proteīnu rekombinantu producēšanu *E. coli* ekspresijas sistēmā;
- izpētīt dažādas pieejas BURP proteīnu *in vitro* rekonstitūcijai;
- veikt rekombinantu peptīdu substrātu producēšanu *E. coli* ekspresijas sistēmā;
- testēt BURP proteīnu ciklizēšanas spēju ar lineāro peptīdu substrātiem.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Cikliski peptīdi un to iegūšana

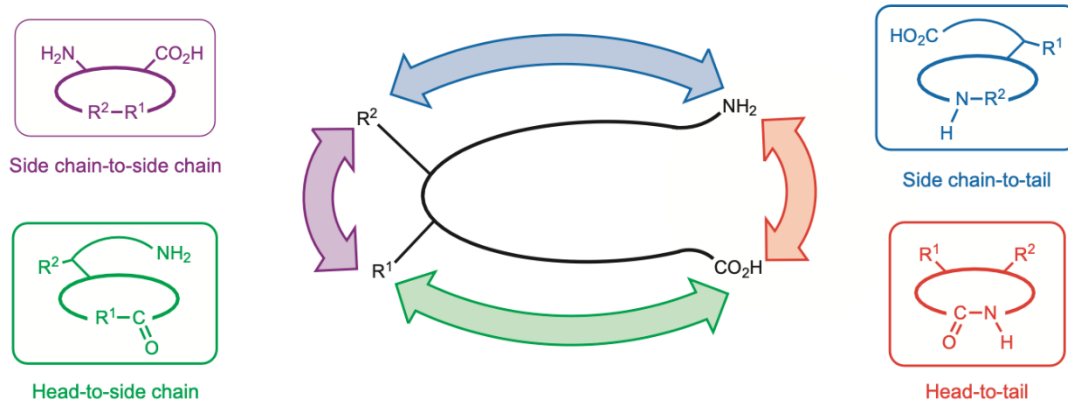
Cikliski peptīdi ir peptīdi, kas satur kovalentu saiti starp diviem peptīda ķēdes atlikumiem, veidojot ciklisku molekulāru struktūru. Cikliskiem peptīdiem piemīt vairākas īpašības, kas tos padara par daudzsološu potenciālu terapeitisku modalitāti (Ji et al. 2024). Cikliskā struktūra samazina peptīdu telpisko konformāciju daudzveidību, tiem piešķirot augstāku stabilitāti nekā lineāriem peptīdiem un rezistenci pret proteolītisku degradāciju (Khatri et al. 2019). Tiem ir arī augstāka specifitāte, kas ļauj saistīties tā sauktajās “*undruggable*” jeb mazām molekulām nepiemērotās vietās, piemēram, proteīnu-proteīnu mijiedarbības virsmās (Rubin et al. 2016). Cikliskiem peptīdiem ir lielāks virsmas laukums, salīdzinot ar mazām molekulām, kas tiem piešķir arī augstāku afinitāti pret mērķproteīnu. Dažos gadījumos tiem piemīt arī augstāka membrānas permeabilitāte jeb spēja šķērsot šūnas membrānu (Li et al. 2023), ko padara iespējamu peptīdu hameleoniskā īpašība mainīt konformāciju hidrofilā vai hidrofobā vidē (Whitty et al. 2016). Patlaban tiek lietotas ap 40 ciklisko peptīdu zāļvielu (Zorzi et al. 2017) un katru gadu kā jauna zāļviela tiek apstiprināts vidēji viens jauns ciklisks peptīds.

### 1.1.1. Organiskās sintēzes metodes

Cikliskos peptīdus iespējams producēt ar organisko sintēzi, vispirms sintezējot lineārus peptīdus un tad tos ciklizējot. Plaši izmantota ir *Fmoc* cietās fāzes peptīdu sintēzes metode, kur pirmā aminoskābe ar C-galu tiek kovalenti saistīta pie cieta polimēra sveķiem, tai noņem N-gala *Fmoc* aizsarggrupu un pievieno nākamo aminoskābi, kas arī satur N-gala *Fmoc* aizsarggrupu. Polipeptīds pakāpeniski tiek sintezēts C-N virzienā un beigās tiek atdalīts no sveķiem skābā vidē. Šī metode ļauj lielā apjomā sintezēt dažādus lineārus peptīdus ar augstu tīrību (Hansen et al. 2015). Pēc sintēzes peptīdus attīra ar reversās fāzes hromatogrāfiju (RP-HPLC) un raksturo ar LC-MS.

Peptīdu sintētiskai ciklizēšanai ir dažādas dizaina pieejas, lai iegūtu *head to tail*, *head to side chain*, *sidechain to tail* vai *sidechain to sidechain* ciklizētus produktus (**1. attēls.**). Galvenokārt izmanto disulfīdu ciklizāciju, makrolaktamizāciju, vara katalizētu azīda-alkīna ciklopievienošanu (*CuAAC*), *ring-closed metathesis (RCM)* (Bechtler et al. 2021). Disulfīdsaišu formēšanās notiek ar oksidāciju starp diviem cisteīna atlikumiem. Makrolaktamizācija ietver iekšmolekulāru ciklizēšanu caur amīn- un karboksilgrupām. Azīda-alkīna cikloapvienošanā peptīds ar alkīna un azīda funkcionālajām grupām pēc Huisgen 1,3 cikloapvienošanas formē 1,4-diaizvietotu triazolu (Punna et al. 2005). *Ring closing metathesis* tiek producēts cikloalkēns,

savienojoties peptīda sānu ķēdēs esošiem termināliem olefīniem. Daudzās no šīm reakcijām tiek izmantotas nedabiskas aminoskābes, kas nav atrodamas dzīvos organismos.



**1.attēls.** Shematisks attēlojums peptīdu ciklizēšanas stratēģijām.  $R^1$ ,  $R^2$  – aminoskābju atlikumu sānu ķēdes. (White et al. 2011)

**Figure 1.** Schematic representation of peptide cyclisation strategies.  $R^1$ ,  $R^2$  – amino acid residue side chains. (White et al. 2011)

Veicot ķīmisku ciklizāciju, procesu sarežģī nepieciešamība pievienot un noņemt aizsarggrupas, lai virzītu reakciju specifitāti, kā arī pēc iespējas jānovērš starpmolekulāras reakcijas, kas notiek pie augstām peptīdu koncentrācijām un noved pie peptīdu polimerizācijas.

### 1.1.2. Bioloģiskas ieguves metodes

Ciklisku peptīdu bioloģiskai identificēšanai un sintēzei ir attīstītas dažādas metodes. Peptīdu ciklizāciju visbiežāk veic caur disulfīdsaitēm, taču šādu peptīdu bibliotēku skrīnēšanu un turpmāku testēšanu nevar veikt iekššūnas reducējošajā vidē. Ir izstrādātas dažādas metodes mazāk labilai, neatgriezeniskai ciklizēšanai. Tiek izmantots, piemēram, fāgu displejs (Smith et al. 1985) ar bis-elektrofīlu linkeru modifikāciju, kuru ciklisko peptīdu produkcijai pielāgoja Heinis ar kolēģiem (Heinis et al. 2009). Tiek izmantots arī mRNS un ribosomu displejs, kas producē kovalenti saistītus mRNS un to kodēto peptīdu kompleksus. Displeja metodes ļauj atlasīt ar mērķproteīnu saistītus spējīgus peptīdus no liela apjoma kombinatoriālām peptīdu bibliotēkām, selekcijas beigās nosakot peptīda kodējošo nukleotīdu sekvenci. Millward un kolēģi raksturojuši piecu mRNS displeja peptīdu ciklizēšanai ar bifunkcionālu reaģentu (NHS-pamatnes disukcīnimidilglutarātu) (Millward et al. 2005), kur šķērssaite veidojas starp peptīda N-terminālo amīngrupu un lizīna  $\epsilon$ -amīngrupu. Szostak un kolēģi ir attīstījuši mRNS displeju, lai sintezētu makrocikliskus peptīdus, kas satur nedabiskas aminoskābes (Josephson et al. 2014). Benkovic ar kolēģiem ir attīstījuši šķeltu inteīnu mediētu ligāciju, kuras

pamatā ir ievietot mērķa peptīdu starp šķelta inteīna daļām, kurš splaisinga rezultātā formē N-C ciklisku mērķa peptīdu (Tavassoli et al. 2007).

Tiek izmantota arī dabā satopamo ciklisko peptīdu biosintētisko ceļu inženierija un rekonstitūcija. Piemēram, Walsh un kolēģi veica heterologu *in vivo* ekspresiju *Streptomyces lividans* baktērijas antibiotiskajam ribosomāli sintezētam tiopeptīdam GE37468 inženierētā *Streptomyces coelicolor* organismā, iegūstot 30 reižu augstākus tiopeptīda iznākumus. Autori vēl randomizēja kodonus tiopeptīda prekursora peptīda gēnā un ekspresēja 133 modificētus prekursora variantus, iegūstot 29 jaunus analogus, no kuriem 12 saglabāja antibiotisku aktivitāti (Young et al. 2012).

Iespējams arī veikt *in vitro* rekonstitūciju un modifikācijas biosintēzes ceļiem, kur reakcijā tiek savienots prekursora peptīds ar to modificējošajiem enzīmiem, kā arī citiem reakcijai nepieciešamiem kofaktoriem. *In vitro* rekonstitūcija ir modulārs process, kas paver iespējas kontrolēt reakcijas apstākļus, veikt optimizāciju, palielināt enzīmu koncentrācijas un līdz ar to arī ciklizācijas iznākumus. Tā, piemēram, Sardar un kolēģi veica *in vitro* cianobaktīnu rekonstitūciju ar pieciem modificējošiem enzīmiem. Viņi variēja enzīmus un to pievienošanas secību, iegūstot jaunus ciānbaktīnu produktus (Sardar et al. 2015). Hudson un kolēģi rekombinanti ekspresēja termofilās baktērijas *Thermobispora bispora* biosintēzes ceļā iesaistīto prekursora peptīdu un enzīmus *E. coli*, attīrīja un savienoja reakcijā, kur izdevās producēt tiomuracīnu, kam piemita antibiotiska aktivitāte (Hudson et al. 2015). Pavisam nesenā rakstā Liu un kolēģi apraksta apvienotu biokatalīzes bezšūnu sintēzes sistēmu (*UniBioCat*) RiPP biosintēzes *in vitro* rekonstitūcijai (W. Q. Liu et al. 2024). Šāda pieeja var būt noderīga, jo proteīnu producēšanai netiek izmantotas dzīvas šūnas, ļaujot producēt, piemēram, *E. coli* šūnām toksiskus proteīnus.

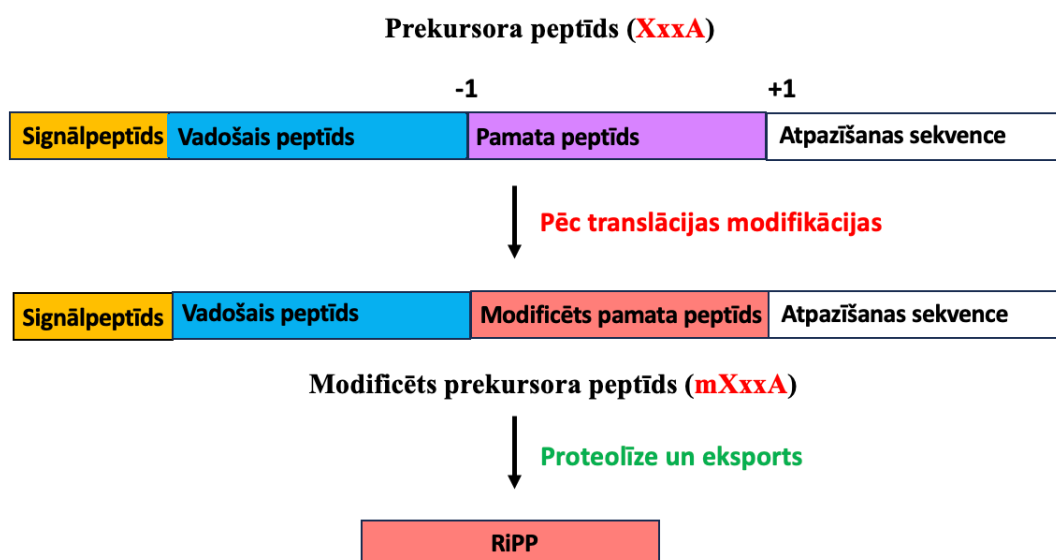
Efektīvākai jaunu ciklisko peptīdu producēšanai var veikt enzīmu inženieriju, kas ļauj uzlabot dabā sastopamus peptīdus modificējošos enzīmus. Jia un kolēģi nesēn publicēja pētījumu, kurā inženierēja sortāzi A kā autociklāzi, iegūstot augstus ciklizācijas iznākumus un novēršot polimerizācijas problēmu, kas sastopama *head-to-tail* ciklisko peptīdu produkcijā (Jia et al. 2023). Lacerna ar kolēģiem savienoja enzīmu PagG (ciānbaktēriju ģimenes makrociklāze) kopā ar ciklizējamo substrātu un novēroja efektīvu ciklizāciju (Lacerna et al. 2024).

Kopumā biosintēzes ceļu inženierija un rekonstitūcija strauji attīstās kā alternatīva pieeja daudzveidīgu ciklisko peptīdu produkcijai, kas ir pārāk sarežģīta ķīmiskām ciklisko peptīdu produkcijas metodēm. Pie tam biosintēzes metodes ir dabai draudzīgākas, jo neietver organisko šķīdinātāju izmantošanu.

## 1.2. Ribosomāli sintezēti un pēc translācijas modificēti peptīdi

Ribosomāli sintezēti pēc translācijas modificēti peptīdi (angļu val. *ribosomally synthesized post-translationally modified peptides*, turpmāk tekstā RiPPs) ir plaši sastopami dabā kā sekundārie metabolīti baktērijās, sēnēs, dzīvniekos un augos. Šie peptīdi sākotnēji tiek sintezēti, ribosomai translējot peptīdu kodējošu mRNS, un tālāk tos modificē dažādi enzīmi, veicot pēctranslācijas modifikācijas, piemēram, N-metilēšanu, cistīnu formēšanu, prolīnu hidroksilēšanu, sulfonēšanu, makrociklizēšanu caur aminoskābju sānu ķēdēm, u. c. (Rodríguez et al. 2022). Daudziem RiPPs peptīdiem piemīt medicīnā noderīgas bioaktivitātes (Pfeiffer et al. 2024).

RiPPs ietver plašu klāstu ar strukturāli ļoti daudzveidīgiem peptīdu produktiem, kas rodas dažādu biosintēzes ceļu rezultātā. Šo peptīdu raksturošanai Arnison un kolēģi ir ierosinājuši izmantot vienotu nomenklatūru (Arnison et al. 2013). Ribosomāli sintezēto sākotnējo peptīdu sauc par prekursora peptīdu, kura nosaukumu veido pēc formas “xxxA”, kur “xxx” ir sugas nosaukums un “A” nozīmē prekursors. Tas var būt 20 - 110 aminoskābju atlikumu garš un var sastāvēt no šādām daļām: N-terminālas signāla peptīda sekvences, vadošā (*leader*) peptīda, pamata (*core*) peptīda un atpazīšanas (*recognition*) sekvences (**2. attēls**). Signāla sekvences parasti sastopamas eikariotu prekursora peptīdiem, tās ir nepieciešamas peptīdu transportam uz citām organelām un sekrēcijai ārpus šūnas. Vadošās un atpazīšanas sekvences atpazīst enzīmi, kas veic pamata peptīdu pēc translācijas modifikācijas. Pamata peptīda sekvence veido RiPP gala produktu, kam veiktas pēc translācijas modifikācijas un kurš beigās tiek proteolītiski nošķelts no pārējām prekursora peptīda daļām (Eslami et al. 2024). Tomēr jāatzīmē, ka RiPP ir ļoti plaša un daudzveidīga peptīdu klase un piedāvātā nomenklatūra nevar to pilnībā aptvert. Ir gadījumi, kad prekursora peptīds ir savienots ar pēc translācijas modifikāciju veicošu enzīmu. Interessants piemērs ir autociklāze AhyBURP, kura atrodas prekursora peptīda C-galā un ietver pamata peptīda sekvenci (Chigumba et al. 2022).



**2. attēls.** Shematisks attēlojums ribosomāli sintezētu un pēctranslācijas modificētu peptīdu raksturošanai. (atveidots no Arnison et al. 2013)

*Figure 2. Schematic representation of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. (recreated from Arnison et al. 2013)*

### 1.2.1. RiPP un to biosintēzes ceļu atklāšana

Agrāk tādi vērtīgi metabolīti kā RiPP peptīdi pārsvarā tika identificēti ar *top-down* pieeju, balstoties uz to bioaktivitāti. Tam sekoja šo savienojumu izolēšana un strukturāla raksturošana. Šos savienojumus var izdalīt no ekstraktiem, taču iznākumi bieži vien ir zemi, jo šo sekundāro metabolītu koncentrācija organismos ir zema un attīrīšanas laikā rodas zudumi. Medicīnā tiek lietoti dabā atklāti savienojumi, kuriem novērotas, piemēram, pretiekaisuma un antimikrobiālas īpašības (Borel et al. 1994).

RiPP identificēšana ir iespējama arī ar *bottom-up* pieeju, kas tikai nesen kļuvusi aktuāla un šobrīd strauji attīstās. Atšķirībā no neribosomāliem peptīdiem (angļu. val. *non-ribosomal peptides, NRPs*) RiPP sekvenca ir kodēta organisma genomā. Pilnveidojoties sekvencēšanas tehnoloģijām, strauji turpina pieaugt pieejamo genomu un transkriptomu sekvenču un paralēli tiek izstrādāti bioinformātikas rīki, kas sekmē gēnu vadītu (angļu. val. *gene-guided*) jaunu dabas vielu sintēzes ceļu atklāšanu (Kersten et al. 2018). Tā, piemēram, genomizācija (angļu. val. *genome mining*) ļauj paredzēt biosintētisko gēnu klasterus (BGK, angļu val. *biosynthetic gene clusters BGC*) organismu genomos. Ir izveidotas plašas datubāzes ar paredzētiem BGK (Blin et al. 2017). Taču joprojām ir sarežģīti sasaistīt paredzētos BGK ar to producēto RiPP produktu sekvencēm un struktūrām. To mēģinājuši risināt Lee ar kolēģiem, attīstot *HypoRiPPAtlas*, kas savieno genomizācijas paredzētos BGK ar to produktiem (Lee et al. 2023).

BGK hipotētisko dabas vielu paredzētie masas spektri tiek salīdzināti un savietoti ar masas spektriem no GNPS (*Global Natural Product Social molecular networking*) datu bāzes, kurā apkopotas vairāk nekā 2000 masas spektru datu kopas no dažādiem organismiem (M. Wang et al. 2016).

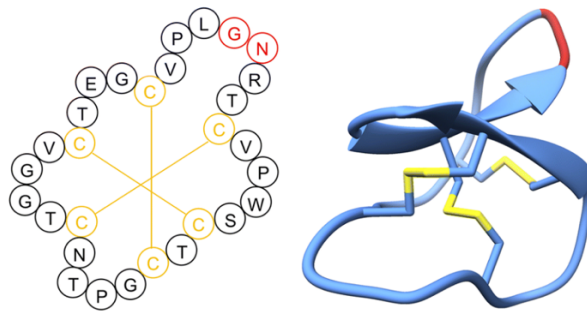
Atklājot un raksturojot pilnus RiPP biosintēzes ceļus, rodas iespējas tos izmantot mērķētai RiPP producēšanai, pārekspresējot nepieciešamos gēnus organismu kultūrās vai arī veicot *in vitro* biosintēzes ceļu rekonstitūciju un proteīnu inženieriju biosintēzē iesaistītajiem enzīmiem, lai paplašinātu iegūto peptīdu produktu daudzveidību (Do et al. 2023).

### 1.2.2. Augu RiPPs

Augu valstī ir sastopami dažādi RiPPs. Atšķirībā no baktērijām, tiem parasti ir garāki prekursora peptīdi, kas ietver arī endoplazmatiskā tīkla signālpeptīda sekvenci un bieži vien satur vairākus pamata peptīdu atkārtojumus, kas, visticamāk, ļauj augam ražot lielāku peptīda daudzumu. Lielākā daļa prekursora peptīdu ir šķelti no pēc translācijas modifikācijas veicošajiem enzīmiem, taču ir arī raksturoti RiPPs, kuru prekursora peptīds ir ģenētiski saistīts ar modifikācijas veicošu katalītisku domēnu, un veido vienu proteīnu produktu, piemēram, nesen identificēto BURP domēna proteīnu gadījumā (Chigumba et al. 2022).

Augu RiPPs plaši sastopama modifikācija ir makrociklizācija. Nesen detalizētā apskata rakstā Chekan un kolēģi aprakstīja galvenās augu RiPP klases, raksturojot to biosintēzes ceļus un detalizējot tiem raksturīgās struktūras un atklātās bioaktivitātes (Chekan et al. 2024). Lielākā klase ar identificētiem 761 peptīdiem ir ciklotīdi (**3. attēls**) ar *head to tail* makrociklizāciju jeb ciklizāciju, kas notiek starp N-terminālo amīngrupu un C-terminālo karbosilgrupu. Ciklotīdi satur arī trīs disulfīdu saites, kas formētas starp sešiem cisteīniem pamata peptīdā. Otra lielākā klase ir orbitīdi, kuriem ir ap 200 identificētu kandidātu. Līdzīgi kā ciklotīdi tie ir *head-to-tail* cikliski peptīdi, taču tie nesatur disulfīdsaites. Ir arī PawS-atvasināti peptīdi ar *head-to-tail* ciklizāciju un vienu disulfīdsaiti. Augos sastopami arī lineāri RiPPs ar tādām pēctranslācijas modifikācijām kā proīnu hidroksilācija un tirozīnu sulfācija. Visnesenāk definētā RiPP klase ir burpidīti jeb cikliski peptīdi, kas tiek biosintezēti, mijiedarbojoties ar BURP domēnu, kam nesen raksturota peptīdu ciklāzes aktivitāte. Tie var būt gan šķelti no prekursora peptīda, gan atrasties prekursora peptīda C-terminālajā galā.

### Ciklotīds kalata B1



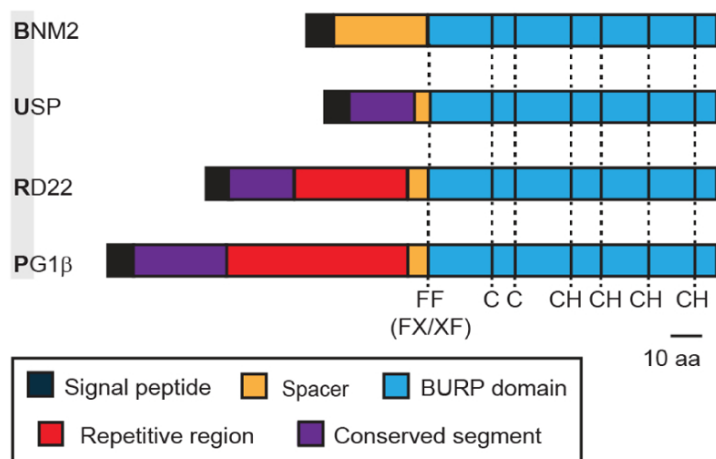
**3. attēls.** Ciklotīda kalata B1 shematiska struktūra un eksperimentāli noteiktā struktūra (PDB: 1NB1). Ar dzeltenu iekrāsotas disulfīdu saites, bet ar sarkanu atlikumi, kuri ir *head-to-tail* ciklizēti. (Chekan et al. 2024)

**Figure 3.** Schematic structure and experimentally determined structure (PDB: 1NB1) of cyclotide kalata B1. Disulfide bonds are colored yellow, residues which are head-to-tail cyclized are in red. (Chekan et al. 2024)

### 1.3.BURP domēna proteīni

#### 1.3.1. BURP proteīnu atklāšana

BURP domēna proteīni ir augiem raksturīga proteīnu klase, ko pirmoreiz 1998. gadā raksturoja Hattori un kolēģi (Hattori et al. 1998). Proteīnu klases nosaukumu veido četru augu sugu proteīnu pirmie burti, kuros šie domēni pirmoreiz tika identificēti (BNM2 no *Brassica napus microspore derived embryo*, USP no *Vicia faba*, RD22 no *Arabidopsis thaliana* un PG1β no *Solanum lycopersicum*). BURP domēnu proteīni parasti satur noteiktus strukturālos motīvus: N-terminālu hidrofobu reģionu, kas ietver signālpeptīdu, vadot BURP proteīna subcelulāro lokalizāciju, vidēju variablu reģionu, kas dažos BURP proteīnos ietver īsus atkārtojumus, un C-terminālu BURP domēnu. BURP domēns sastāv no ~230 aminoskābēm un tam ir saglabāts CHX<sub>10</sub>CHX<sub>25-27</sub>CHX<sub>25-26</sub>CH sekvenču motīvs, kur X ir nenoteiktas aminoskābes.



**4.attēls.** Shematiska reprezentācija BURP apakšklašu struktūrai. (Mydy et al. 2024)

**Figure 4.** Schematic representation of BURP subclass structures. (Mydy et al. 2024)

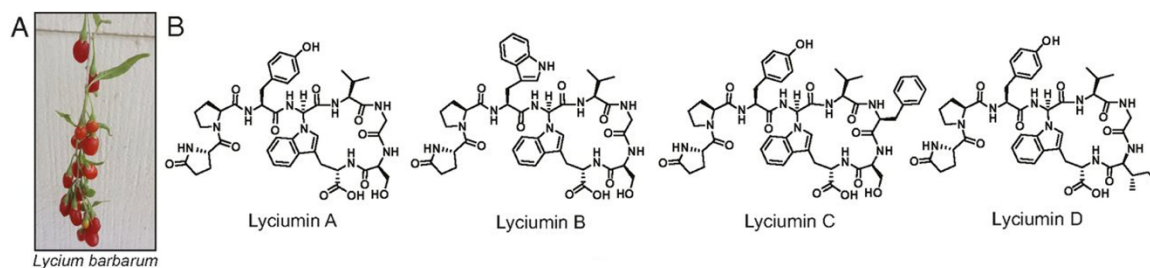
Analizējot BURP gēnu struktūru, autori izteica pieņēmumu, ka šo proteīnu evolūcijas pamatā ir eksonu pārkārtošanās, kuras rezultātā savienojušies vismaz četri eksoni: viens N-gala signālpeptīdam, viens variablajam reģionam un divi BURP domēnam. Pie tam variablajā reģionā, iespējams, notikusi *de novo* atkārtojumu sekvenču amplifikācija. Mydy un kolēģi izveidojuši shematisku reprezentāciju četru BURP domēna proteīnu apakšklašu struktūrai (**4. attēls**).

Kaut gan BURP proteīnus ir viegli identificēt pēc raksturīgā domēna CH sekvences motīva, atklāt šo proteīnu veiktās funkcijas ir bijis sarežģīti. Analizējot BURP proteīnu ekspresijas līmeņus, atklājas ļoti atšķirīgi ekspresijas līmeņi gan dažādos vides apstākļos, gan dažādās augu attīstības stadijās un augu audos, kā arī BURP proteīnu subcelulārā lokalizācija mēdz būt daudzveidīga (Van Son et al. 2009), (Park et al. 2015), (W. Wang et al. 2022). Tas liecina par dažādām, iespējams diverģējušām, BURP proteīnu funkcionālajām lomām. Daži BURP proteīni ir asociēti ar lomu augu attīstības procesā, dažiem ir paaugstināta ekspresija tieši abiotiska stresa apstākļos (H. Liu et al. 2014). Strauji pieaugot pieejamo augu genoma sekvencēm, ir identificēts liels skaits BURP domēna proteīnu dažādās augu sugās (Sun et al. 2019), (Y. Li et al. 2016). Tomēr līdz šim salīdzinoši maz bijis zināms par šo proteīnu funkcijām.

### 1.3.2. BURP domēna peptīdu ciklāzes aktivitāte

2018. g. Kersten un kolēģi raksturoja godži auga (*Lycium barbarum*, **5. attēls A**) cikliskā RiPP liciumīna prekursora peptīda identificēšanu un jaunu liciumīnu identificēšanu citu sugu augos (Kersten et al. 2018). Liciumīni satur kovalentu saiti starp triptofāna indola slāpekli un

glicīna  $\alpha$ -oglekli (**5. attēls, B**). Tiem piemīt noderīgas bioaktivitātes, piemēram, liciumīnam A piemīt proteāžu inhibitora aktivitāte, kā arī tas inhibē angiotensīna konvertāzi.



**5. attēls.** A – Godži augs (*Lycium barbarum*). B – Dažādu liciumīnu struktūras no *Lycium barbarum*. (Kersten et al. 2018)

**Figure 5.** A – Matrimony vine (*Lycium barbarum*). B – Structures of various lyciumins from *Lycium barbarum*. (Kersten et al. 2018)

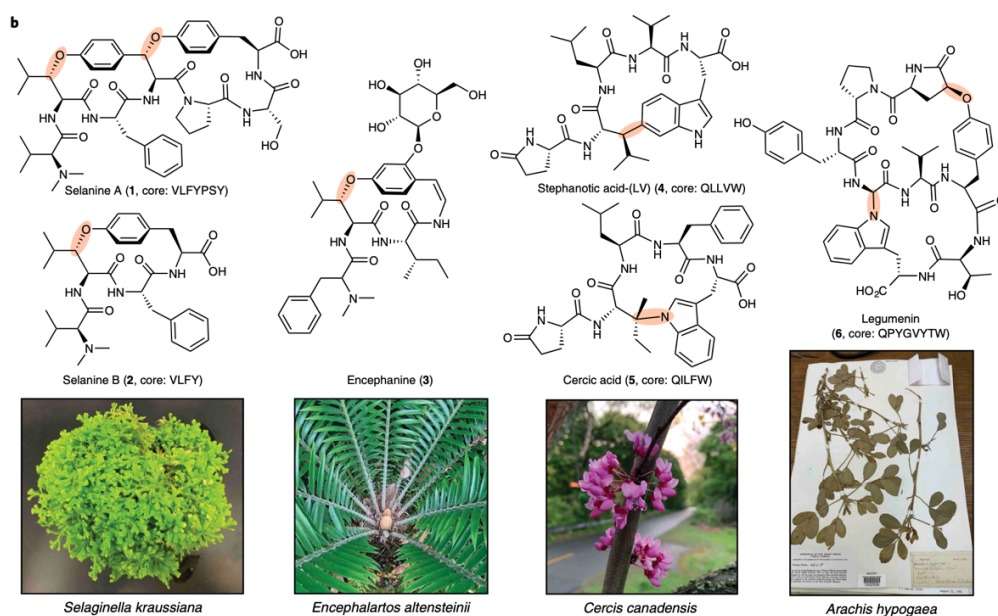
Balstoties uz *L. barbarum* ekstraktos identificētā liciumīna aminoskābju sekvenci un analizējot auga transkriptomu, tika identificēts prekursora peptīda gēns, kurā liciumīna pamata peptīda sekvence ir saistīta ar C-terminālu BURP proteīna sekvenci. Tālāk autori izmantoja genomizraci, lai identificētu liciumīnu prekursorus *Amaranthaceae*, *Fabaceae* un *Solanaceae* augu sugās. Viņi meklēja homologus gēnus, kas kodē BURP domēna proteīnus un liciumīna raksturīgas sekvences N-termināli no identificētajiem BURP domēniem. Tādā veidā atklāja jaunus liciumīna veida cikliskos peptīdus, kuru klātbūtni augu ekstraktos apstiprināja ar šķidrās hromatogrāfijas maspektrometriju (LC-MS).

Autori veica liciumīna ciklisko peptīdu biosintēzes *in planta* rekonstitūciju modeļauga *N. benthamiana* lapu audos un ieguva 10 – 40 reizes lielākus peptīdu iznākumus nekā dabīgi sastopami liciumīni, kas sintezēti *L. barbarum* saknēs. Autori arī pētīja ciklizācijas specifitāti, variējot ar liciumīnu pamata peptīda aminoskābju sekvences garumu un sastāvu. Tika noskaidrots, ka ciklizācija pieļauj izmaiņas pamata peptīda sekvences sastāvā, taču ne sekvences garumā, kas ierobežots līdz piecām aminoskābēm. Striktie sekvences garuma ierobežojumi liecina, ka pamata peptīds visticamāk novietojas strikti definētā ciklāzes aktīvajā centrā. Šajā pētījumā autoriem vēl neizdevās identificēt ciklāzes aktivitāti, kas atbildīga par liciumīnu formēšanos, taču viņi izteica varbūtību, ka liciumīna un BURP domēna atrašanās vienā prekursora peptīdā varētu būt saistīta ar atbildi uz abiotisku stresu – zināms, ka BURP gēnu ekspresija mēdz būt asociēta ar stresa atbildi un liciumīna I prekursora peptīda gēnam ir paaugstināta ekspresija sojas auga saknēs skābas augsnes un  $Al^{3+}$  piesārņojuma apstākļos.

Turpinot darbu, 2022. gada sākumā Kersten un kolēģi publicēja pētījumu, kurā raksturoja liciumīnu prekursora peptīdā ietvertu BURP domēnu kā autokatalītisku peptīdu ciklāzi, kuras

aktivitātei nepieciešami vara joni (Chigumba et al. 2022). Šis pētījums nepārprotami apstiprināja, ka BURP domēns spēj katalizēt kovalentas saites veidošanos starp liciumīna prekursora peptīda sānu ķēdēm.

Autori papildus identificēja vēl piecas ciklisku RiPP klases, kas saistītas ar BURP ciklāzēm, kā arī raksturoja bioinformātikas darbplūsmas jaunu RiPP identificēšanai, kombinējot metabolomikas datus un genomizrāci. Pētīto augu transkriptomos identificēja BURP domēna proteīnu gēnus un pētīja to N-terminālajā galā esošos peptīdu atkārtojumus, lai salīdzinātu ar ekstraktos identificētajiem peptīdiem, rēķinoties arī ar biosintētiskām modifikācijām (ciklizāciju, N-gala modifikācijām, piemēram, metilēšanu, piroglutamāta formēšanos). Šādu darbplūsmu izmantoja, lai 297 augos identificētu jaunus cikliskos peptīdus, kas saistīti ar BURP domēnu, tostarp *Selaginella kraussiana* SkrBURP ar pamata peptīdu VLFYPSY (kas tiek ciklizēts par mono-VLFY vai biciklisku peptīdu ar ditirozīna ētera šķērssaitēm starp leicīnu-2, tirozīnu-4 un tirozīnu-7), *Cercis canadensis* CcaBURP1 (QILFW ar C-N šķērssaiti starp izoleicīna beta oglekli un triptofāna indola gredzena slāpekli) un CcaBURP2 (QLLVW) un *Arachis hypogaea* AhyBURP (QPYGVYTW) (6. attēls).



**6. attēls.** Piemēri dažiem Kersten un kolēģu pētītajiem augiem un tajos identificēto ciklisko peptīdu struktūrām ar izceltām makrociklizācijas saitēm. (Chigumba et al. 2022)

**Figure 6.** Examples of some of the plants studied by Kersten et al. and their identified cyclic peptide structures with highlighted macrocyclisation bonds. (Chigumba et al. 2022)

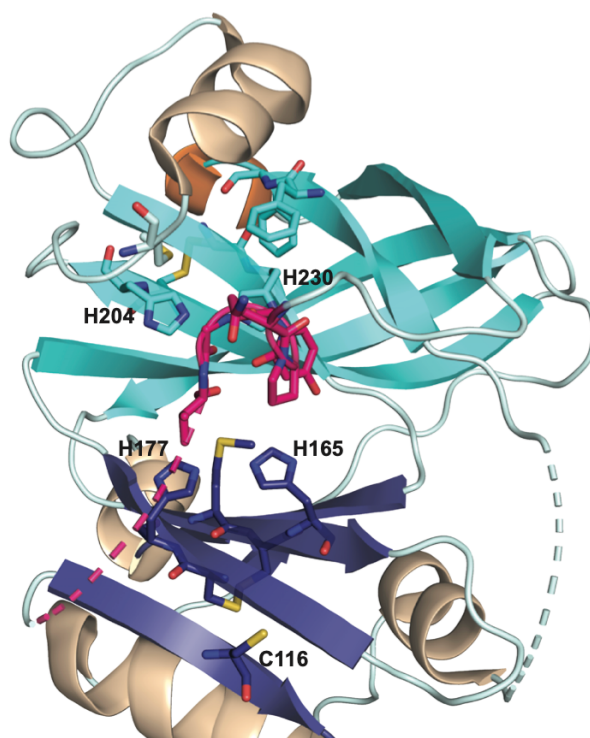
Autori apstiprināja hipotēzi, ka pašam BURP domēnam varētu piemist autociklāzes aktivitāte, veicot *in vitro* rekonstitūciju BURP domēna proteīniem ar peptīdu motīviem. Inkubējot BURP proteīnus ar dažādu metālu joniem un ar masspektrometriju analizējot

produktus, izdevās detektēt tripsīna šķelšanas produkta peptīdu ar divu ūdeņražu jonu masas zudumu, kas liecina par ciklizāciju. Šo peptīdu ciklizācija, nevis vienkārši dehidrogenācija, tika apstiprināta, analizējot to fragmentāciju ar MS/MS.

2022. gada beigās Lima un kolēģi publicēja atklājumu par šķeltu BURP peptīdu ciklāzi arbBURP no *Coffea arabica* auga jeb tādu BURP proteīnu, kas tiek ekspresēts atsevišķi no sava prekursora peptīda substrāta (Lima et al. 2023). Tātad BURP proteīniem dabā piemīt gan autociklāzes, gan transciklāzes aktivitātes.

### 1.3.3. BURP domēna struktūra

Jaunākais raksts par BURP ciklāzēm tika publicēts 2024. gada februārī, kur Mydy un kolēģi raksturoja AhyBURP proteīna no *Arachis hypogaea* 3D struktūru ar un bez vara joniem (PDB kodi: 8SY2, 8SY3) (Mydy et al. 2024), kuru pētniekiem izdevās noteikt, izkristalizējot *E. coli* rekombinanti producētu Se-Met iezīmētu proteīnu. Šis bija ļoti nozīmīgs atklājums, jo līdz tam vienīgā strukturālā informācija par BURP domēna proteīniem bija balstīta uz *AlphaFold2* paredzējumiem. Noteiktā struktūra liecina, ka AhyBURP ir homodimērs ar diviem otrā tipa (angļu val. *type II*) vara saistīšanas centriem, ko veido BURP domēna disulfīdu saites, kas telpiski pietuvina histidīna atlikumus (**7. attēls**). Testējot ciklizācijas reakcijas bezskābekļa apstākļos, autori demonstrēja, ka AhyBURP dabīgā peptīda substrāta ciklizācijai nepieciešams skābeklis. Izmantojot indikatoru radikāļu detekcijai (angļu val. *radical trap CHANT*), kura masa palielinās, mijiedarbojoties ar radikāļiem, autori secināja, ka ciklizācijas pamatā visticamāk ir radikāļu mehānisms. Veicot ciklizācijas reakcijas ar AhyBURP mutantiem, tika pierādīts, ka proteīns neveic starpmolekulāru ciklizāciju jeb nav spējīgs ciklizēt cita AhyBURP proteīna pamata peptīdu.



**7. attēls.** Shematiska reprezentācija AhyBURP katalītiskā centra struktūrai (PDB: 8SY3). (Mydy et al. 2024)

**Figure 7.** Schematic representation of AhyBURP catalytic centre structure. (PDB: 8SY3). (Mydy et al. 2024)

#### 1.4. Disulfīdu saturošu proteīnu rekombinanta producēšana

Lai rekombinanti producētu aktīvu enzīmu, ir svarīgi, lai tas ieņemtu pareizu konformāciju jeb foldu. Veicot proteīnu ekspresiju *E. coli*, bieži ir sastopamas problēmas ar proteīnu disulfīdu saišu formēšanos. Baktēriju šūnu citoplazmā, kur notiek transkripcija un translācija, ir reducējoša vide ar reducētā/oksidētā glutationa (GSH:GSSG) attiecību no 50:1 līdz 200:1 (Alonso-Moraga et al. 1987), atšķirībā no eikariotu endoplazmatiskā tīkla ar GSH:GSSG attiecību no 1:1 līdz 3:1. Endoplazmatiskajā tīklā notiek oksidēšanās-reducēšanās apstākļu un proteīnu disulfīdizomerāžu mediēta disulfīdsaišu formēšanās (Hwang et al. 1992), (Bass et al. 2004).

Ir pieejamas dažādas stratēģijas, lai iegūtu pareizi foldētu proteīnu. Var izmantot īpaši inženierētas baktēriju šūnas, piemēram, *SHuffle* šūnas, kuras atvasinātas no *E. coli* SMG96 šūnām bez *gor* un *trxB* reduktāzēm (Faulkner et al. 2008), (Lobstein et al. 2016). *SHuffle* šūnu citoplazmā arī tiek konstitutīvi ekspresēta proteīnu disulfīdu izomerāze DsbC bez signālpeptīda sekvenču, kas to parasti transportētu uz perioplazmu, līdz ar to DsbC nonāk citosolā.

Vēl viena pieeja ir bezšūnu sintēze, kur tiek izmantotas nepieciešamās molekulārās komponentes, lai reproducētu transkripcijas un translācijas procesu proteīna gēnam *in vitro* maza tilpuma reakcijā (Garenne et al. 2021). Šādi ir iespējams daudz precīzāk kontrolēt un mainīt proteīna sintēzes vidi, tostarp oksidējošos un reducējošos apstākļus, kas veicina proteīna disulfīdu saišu formēšanos. Pie tam sintēzes process un tālākie attīrīšanas soļi aizņem mazāk laika nekā rekombinanta ekspresija *E. coli*. Matsuda un kolēģi šādā sistēmā veiksmīgi sintezēja disulfīdsaites saturošus eikariotu izcelsmes proteīnus, izmantojot glutaciona buferšķīdumu un pievienojot baktēriju disulfīdu izomerāzi DsbC (Matsuda et al. 2013).

Vēl ir iespēja veikt *in vitro* proteīna refoldēšanu. Proteīnu ekspresēšana *E. coli* augstā temperatūrā (37 °C) un ar augstu inducētāja koncentrāciju bieži noved pie augstiem proteīnu ekspresijas līmeņiem, tomēr veicina proteīnu nepareizu salocīšanos un agregāciju. Baktēriju proteīnu kvalitātes kontroles sistēma nespēj šos proteīnus apstrādāt un rezultātā tie nonāk ieslēgšanas ķermenīšos (angļu val. *inclusion bodies*) (Georgiou et al. 1999). Kaut gan ieslēgšanas ķermenīšos esošajiem proteīniem ir augsta tīrība, kā arī tie tiek pasargāti no proteolītiskas degradācijas, lai tos iegūtu funkcionālā formā, jāveic to izšķīdināšana un proteīnu refoldēšana. Ieslēgšanas ķermenīšus parasti izšķīdina, izmantojot haotropiskus reaģentus, kā, piemēram, urīnvielu vai guanidīna hidrohlorīdu. Šādos apstākļos proteīni ir denaturēti. Lai iegūtu proteīnus ar natīvu struktūru, jāsamazina denaturējošā reaģenta koncentrācija. Tam var pielietot dažādas stratēģijas, piemēram, strauji atšķaidot denaturēto proteīnu lielā tilpumā buferšķīduma, kas nesatur denaturējošus aģentus, vai arī denaturējošā aģenta koncentrāciju samazinot ar pakāpenisku dialīzi. No denaturējošā reaģenta var atbrīvoties arī, proteīnu imobilizējot uz afinitātes kolonnas un pakāpeniski mainot buferšķīdumu.

Refoldēšanas procesā ir ļoti daudz mainīgo parametru, kas var ietekmēt to, vai un cik lielu daļu proteīna izdodas refoldēt. Svarīgi ir tādi buferšķīdumu parametri kā pH, sāls koncentrācija, stabilizējošās piedevas, piemēram, L-arginīns, trehaloze, saharoze, glicerīns, oksidējošie un reducējošie aģenti, u. tml. (Lebediker et al. 2014). Lai iegūtu veiksmīgu refoldēšanas protokolu un to tālāk attīstītu, var veikt refoldēšanas apstākļu skrīningu (Y. Wang et al. 2017).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

1. tabula. Reaģenti un resursi.

Table 1. Reagents and resources.

Reaģents vai resurss	Avots	Identifikācijas kods
<b>Reaģenti un vielas</b>		
Agars	Fisher Scientific, Meksika	BP1423-500
Agaroze	Carl Roth, Vācija	3810.4
Ampicilīns	Thermo Fisher, Beļģija	J60977-14
Beta-merkaptobetānols	Thermo Scientific, Vācija	125472500
Bromfenolzilais	Fisher Scientific, Indija	B392-5
Citronskābe	Carl Roth, Vācija	1818.1
DTT	Fisher Bioreagents, Kanāda	BP172-25
EDTA	Sigma Aldrich, Ķīna	ED2SS-1KG
Etanols, 96%	Latvijas Balzāms, Latvija	
EZ-Run™ proteīnu marķieris	Fisher Scientific	BP3603500
Glicerīns	Fisher Scientific, ASV	G33-1
Glutations (oksidēts)	Goldbio, ASV	G-060-10
Glutations (reducēts)	Glenthams Life Sciences, Lielbritānija	GE1520
Guanidīna hidrohlorīds	Carl Roth, Vācija	6069.3
IPTG	Fisher Scientific, Itālija	BP1755100
Imidazols	Sigma Aldrich, Ķīna	288-32-4
Vara hlorīds	Acros Organics	315281000
L-arginīns	Fisher Bioreagents, Ķīna	BP370-100
MES monohidrāts	Thermo Scientific, Vācija	H56472
Nātrija azīds	Sigma Aldrich, Vācija	102587631
Nātrija citrāts	Fisher Bioreagents, ASV	M-15716
Nātrija dodecilsulfāts (SDS)	Fisher Scientific, Japāna	BP166-500
Nātrija hidroksīds	RK Chem, Latvija	215-185-5
Nātrija hlorīds	Carl Roth, Vācija	0601.3
Sālsskābe	Stanlab, Polija	231-595-7
SYPRO Orange	Sagatavots <i>in house</i>	
Tris	Fisher Scientific, ASV	BP152-500
Urīnviela	Fisher Scientific	U15-3
Virkon® S	DuPont, ASV	F1702
<b>Barotnes un šķīdumi</b>		
2xYT barotne	Formedium, UK	YDB0102
LB agars	Formedium, UK	LMM0202
LB barotne ( <i>Miller recepte</i> )	Formedium, UK	LMM0125
SOC barotne	Sagatavots <i>in house</i>	
2X Laemmli buferšķīdums	Sagatavots <i>in house</i>	
1 M IPTG šķīdums ūdenī	Sagatavots <i>in house</i>	
100 mg/mL ampicilīna šķīdums ūdenī	Sagatavots <i>in house</i>	

5 M NaCl šķīdums ūdenī	Sagatavots <i>in house</i>	
1 M DTT šķīdums ūdenī	Sagatavots <i>in house</i>	
70%, 20% etanols	Sagatavots <i>in house</i>	
0.5 M EDTA šķīdums ūdenī	Sagatavots <i>in house</i>	
1 M Tris, pH 8.0, šķīdums ūdenī	Sagatavots <i>in house</i>	
1 M citronskābes šķīdums ūdenī	Sagatavots <i>in house</i>	
S30 ekstrakts	Sagatavots <i>in house</i>	
TAE buferšķīdums	Sagatavots <i>in house</i>	
Termālās nobīdes skrīninga buferšķīdumi	Sagatavoti <i>in house</i>	
<b>Komplekti</b>		
<i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Lietuva	K0502
<i>GeneJET Plasmid Maxiprep Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Lietuva	K0491
<i>GeneJET Gel Extraction Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Lietuva	K0691
<i>BugBuster® Protein Extraction Reagent</i>	Merck Millipore	70584-M
<i>In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit</i>	Thermo Fisher Scientific	89895
<i>Peptide Calibration Standard</i>	Bruker, Vācija	
<i>Gibson Assembly Master Mix</i>	New England Biolabs	M5510
<i>MALDI Peptide/protein 3-matrix kit</i>	LaserBio Labs, Francija	
<i>Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific, Lietuva	F531S
<b>Aparatūra</b>		
Autoklāvs Systec DX-65	Systec, Vācija	
Centrifūga Beckman Coulter Avanti J-E (ar nomaināmiem rotoriem: J-10, J-20)	Beckman Coulter	JSE12F08
Centrifūga Beckman Coulter Allegra X-30R ar rotoru C0650	Beckman Coulter	ALZ11M027
Centrifūga Eppendorf Centrifuge 5418 ar rotoru FA-45-18-11	Eppendorf	5418AM016826
Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, ASV	
Frakcionētājs GE Healthcare Frac-920	GE Healthcare, ASV	GE-F920
Gelfiltrācijas kolonna HiLoad Superdex™ 200 pg 16/600	Cytiva, ASV	28989335
Gelfiltrācijas kolonna HiLoad Superdex™ 75 pg 16/600	Cytiva, ASV	28989333
Gelfiltrācijas kolonna Superdex™ 75 Increase 10/300 GL	Cytiva, ASV	29148721
Gēlu horizontālās elektroforēzes iekārta Multi Sub Midi un barošanas bloks CS-300V	Cleaver Scientific, Lielbritānija	
Gēlu vertikālās elektroforēzes iekārta X-cell Surelock Minicell	Life Technologies, ASV	
HiPrep Desalting Sephadex G-25 53 mL	Cytiva, ASV	17508701
HisTrap HP 5 mL	Cytiva, ASV	17524802

HiTrap Q HP 5 mL	Cytiva, ASV	17115401
Inkubators-kratītājs ES-20	Biosan	BS-010111-AAA
Inkubators-kratītājs Infors HT Multitron Standard	Infors, Šveice	
Masspektrometrs Bruker autoflex maX	Bruker, Vācija	
Mikrotilpumu spektrofotometrs NanoDrop 2000c	Thermo Scientific,	ND2000CLAPTOP
Multifunkcionālais orbitālais kratītājs Biosan PSU-20i	Biosan	BS-010145-ACI
pH-metrs Adrona AM-1605	Adrona, Latvija	
Preparatīvās proteīnu šķidrumu hromatogrāfijas sistēma ÄKTA Purifier 25 L	Cytiva	29018224
Svari KERN ABT 120-5DM	Kern, Vācija	
Ultraskaņas homogenizators Hielscher UP200Ht	Hielscher, Vācija	350612411
Vorteksa iekārta Biosan V-1 plus	Biosan	BS-010203-AAG
<b>Laboratorijas inventārs un materiāli</b>		
Steritop 0,22 µm pudeļu filtri buferšķīdumu filtrēšanai	Merck Millipore	S2GVT05RE
Centrifugācijas filtri Amicon-ultra ar membrānas caurlaidību 10 kDa: 15 mL	Merck Millipore	UFC5010
Koniskās kolbas: 250 mL un 2 L	Schott	212166302
Mikromēģenes 1,5 mL un 2 mL	Sarstedt	72.690.001 72.695.500
Stobriņi 15 mL un 50 mL	Sarstedt	62.554.502 62.547.254
Spectra Por dialīzes membrānas ar caurlaidību 12-14 kDa	Spectrum Laboratories	08-670-3BB
Šļirces 20 mL, 3 mL	Bbraun	4617207V-02 4617022V
Šļirču filtri Filtropour: 0,22 µm, 0,45 µm	Sarstedt	83.1826.001 83.1826
<b>Baktēriju celmi un plazmīdas</b>		
T7 Express Competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs	C2566H
DH5α Competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific	18265017
SHuffle <sup>®</sup> T7 Competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs	C3026J
pEXP sērijas vektori	Prof. Marko Hyvönen	
pETMCSI bezšūnu sintēzes vektors	Prof. Otting	
<b>Lietojumprogrammas</b>		
ProtParam proteīnu parametru aprēķināšanai	Expasy	
<i>T<sub>m</sub></i> Calculator	Thermo Fisher Scientific	
Sequence Manipulation Suite, Reverse Translate	bioinformatics.org Paul Stothard	
Translate tool	Expasy	
PeptideMass	Expasy	
DNAWorks v.3.2.4	NIH HPC	
ChimeraX	RBVI	

## 2.2. Metodes

Maģistra darbs tika izstrādāts laika periodā no 2023. gada 1. jūlija līdz 2023. gada 10. oktobrim.

### 2.2.1. Ekspresijas konstruktū dizains

Darbā tika izmantoti četru augu sugu BURP proteīnu gēni: *CcaBURP2-[1xQLLVW]* no *Cercis canadensis*, *SkrBURP-[1xVLFYPSY]* no *Seleginella kraussiana*, *AhyBURP* no *Arachis hypogaea*. Gēni tika pasūtīti kā dubultpavediena DNS fragmenti no *Twist Bioscience* (ASV). Gēniem tika veikta kodonu optimizācija atbilstoši *E. coli* ekspresijas sistēmai, izmantojot piegādātāja lietotni. Tika izmantoti dažāda garuma proteīnu konstrukti, piemēram, *CcaBURP1* apzīmē pilna garuma BURP proteīnu, *CcaBURP2* apzīmē proteīnu bez N-terminālās signālpeptīda sekvences un *CcaBURP3* apzīmē tikai BURP domēnu (proteīnu sekvencēm skat. 1. piel.).

BURP proteīnu gēni bija ieklonēti pEXP vektoros (vektori ir dāvinājums no Dr. Marko Hyvönen). Šie vektori ļauj veikt gēna klonēšanu, izmantojot vienādus praimerus viena gēna paralēlai klonēšanai dažādos N-terminālas iezīmes saturošos vektoros. Praimeru ir komplementāri vektoram un gēnam, ļaujot veikt klonēšanu ar *Gibson assembly* metodi.

Rekombinanto peptīdu producēšanai tika izvēlēts pEXP vektors ar 8xHis-GB1 tagu tā mazā izmēra, šķīdības un stabilitātes dēļ. Tā kā peptīdi ir mazi (8-10 aminoskābes), to klonēšanai netika sūtīti atsevišķi gēni, bet tika izmantots praimeru asemblēšanas PCR. Praimeru dizainēja, izmantojot *DNAWorks* v.3.2.4. (Hoover et al. 2002), kur, ievadot vēlamā inserta PCR produkta nukleotīdu sekvenci, tiek iegūtas optimālas praimeru sekvences ar atbilstošu GC% saturu un kušanas temperatūrām. Šie praimeru savstarpēji pārklājas, PCR funkcionē gan kā praimeru, gan kā DNS pamatne (angļu val. *template*), un rezultātā tiek iegūts peptīda gēns ar pEXP vektoram komplementārām pārkarēm *Gibson Assembly* reakcijai.

### 2.2.2. Klonēšana

BURP konstruktū insertu pavairošanai veica PCR: reakcijas kopējais tilpums bija 20 µL: 10 µL *2X Phusion™ High-Fidelity Master Mix*, 1 µL pamatnes DNS (ar koncentrāciju 10 ng/µL), 0,5 µL katra praimera (ar koncentrāciju 100 nM), 0,6 µL DMSO, 7,4 µL d. H<sub>2</sub>O. Peptīdu insertu ģenerēšanai veica tādu pašu PCR, tikai bez atsevišķa pamatnes DNS. Reakcijas parametri tika izvēlēti atbilstoši kita protokola norādījumiem, optimālās anīlinga temperatūras noteikšanai tika izmantots *Thermo Fisher T<sub>m</sub> Calculator* (praimeru 2. un 3. pielikumā). BURP konstruktū produktus analizēja uz 1% agarozes gēla, peptīdu PCR produktus – uz 3% agarozes

gēla. DNS izdalīšanai no agarozes gēla tika izmantots *GeneJET Gel Extraction Kit*, un DNS izdalīšana tika veikta pēc kitā iekļautā protokola.

Klonēja ar *Gibson Assembly*, kas ir plaši izmantota klonēšanas metode (Gibson et al. 2009). Tā ļauj savienot vairākus fragmentus neatkarīgi no nukleotīdu sekvences, neieviešot “rētas” starp fragmentiem. Reakcijas sastāvā ir trīs enzīmi: T5 eksonukleāze, kas izveido 3' pārkares gan sašķeltajam vektoram, gan PCR produkta insertam, *Phusion* DNS polimerāze, kas pēc fragmentu anīlinga aizpilda iztrūkstošos nukleotīdus starp fragmentiem, un *Taq* DNS ligāze, kas kovalenti savieno atsevišķus DNS fragmentus, izveidojot pilnu vektoru bez griezumiem (angļu val. *nicks*).

Klonēšanu veica ar HindIII un BsaI restrikcijas enzīmiem sašķeltu pEXP vektoru un gēna insertu, kas PCR pavairots ar praimeriem, kur ap 20 nt ir komplementāri vektora sekvencei un ap 20 nt komplementāri gēnam. Savienoja 2  $\mu$ L vektora (konc. 50 ng/ $\mu$ L) un 2  $\mu$ L inserta (konc. 100 ng/ $\mu$ L) kopā ar 10  $\mu$ L *Gibson Assembly master mix* un inkubēja 50°C 1 h. Reakcijas produktus transformēja *E. coli* DH5 $\alpha$  šūnās. Plazmīdas izdalīšanai tika izmantots *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* un plazmīdu izdalīšana veikta pēc kitā iekļautā protokola.

### 2.2.3. Ekspresijas testi

Ekspresijas testu paraugiem vienu koloniju vai šūnas no glicerīna stoka inokulēja sterilās 13 mL plastmasas mēģenēs, kas saturēja 3 mL LB barotnes ar ampicilīnu (visās barotnēs 100  $\mu$ g/mL) un tās tika audzētas pa nakti pie 30°C ar kratīšanu 200 apgr./min. Nākamajā dienā 500  $\mu$ L nakts kultūras tika pievienoti 50 mL LB barotnes ar ampicilīnu 250 mL kolbā un šūnas tika audzētas pie 37°C ar kratīšanu 200 apgr./min. Testējot ekspresiju pie zemas temperatūras, kad šūnas sasniedza OD<sub>600</sub> ap 0.4, temperatūra tika pazemināta (īdz 25°C, 20°C, 18°C atkarībā no testiem). Pēc stundas tika inducēta proteīnu ekspresija ar testējamo IPTG koncentrāciju un šūnas tika atstātas inkubētās pa nakti pie 200 apgr./min (ekspresējot 37 °C, ekspresiju inducēja pie OD<sub>600</sub> 0.6 un šūnas inkubēja 4 h). Pēc ekspresijas 1 mL šūnu kultūras tika nocentrifugētas pie 4200 xg, 10 min. Šūnas tika resuspendētas ar 200  $\mu$ L *BugBuster<sup>®</sup> Protein Extraction Reagent*, tam pievienoja 0.2  $\mu$ L Lysonase® un maisījums tika inkubēts 5 min istabas temperatūrā. Šķīstošā un nešķīstošā proteīnu frakcijas tika atdalītas ar centrifugēšanu pie 12 000 xg, 5 min. Tika sagatavoti SDS-PAGE gēla paraugi kopējai frakcijai (šķīstošie un nešķīstošie proteīni) un tikai šķīstošajai frakcijai.

### 2.2.4. Lielpjoma ekspresija

Tika sagatavota nakts kultūra: vienu koloniju vai šūnas no glicerīna stoka inokulēja 25 mL kolbā 50 mL LB barotnes, kas papildināta ar ampicilīnu. Šūnas audzēja pa nakti pie

30°C, 200 apgr./min. Nākamajā dienā nakts kultūru atšķaidīja tilpuma attiecībā aptuveni 1:100 pret kopējo ekspresijas tilpumu, parasti 40 mL nakts kultūras uz 4 L LB barotnes ekspresijai 2 L kolbās. Šūnas tika inkubētas 37°C pie kratīšanas 200 apgr./min līdz sasniedza OD<sub>600</sub> 0.4. Kolbas tika 1 h inkubētas 18°C temperatūrā pie 200 apgr./min, pirms tika inducēta proteīna ekspresija ar 0.1 mM IPTG beigu koncentrāciju. Nākamajā dienā šūnas nocentrifugēja pie 6000 xg 10 min 4°C. Šūnu masu glabāja -80°C saldētavā līdz tālākai proteīna attīrīšanai.

Proteīniem, kuriem paredzēts veikt refoldēšanu, tika veikta ekspresija pa nakti 37°C, kas veicina proteīnu akumulēšanos ieslēgšanas ķermenīšos.

### 2.2.5. Ekspresija ar autoindukciju

Autoindukcija ir rekombinantu proteīnu ekspresijas metode, kur šūnas tiek audzētas barotnē, kas satur gan glikozi, gan laktozi. *Lac* operatora kontrolēto gēnu ekspresija tiek inducēta, kad šūnas patērējušas visu glikozi un sāk metabolizēt laktozi, kas allolaktozes formā saista un neitralizē *lac* represoru. Šajā darbā tika izmantota ZYM-5052 autoindukcijas barotne (Studier et al. 2005). Ekspresējot proteīnu, pēc nakts kultūras atšķaidīšanas 2 L ZYM-5052 barotnes šūnas 5 h audzēja 37°C pie 200 apgr./min, tad pārlīka uz 18°C un atstāja inkubēties 20 h.

### 2.2.6. Proteīnu bezšūnu sintēze

Proteīnus iespējams producēt arī bezšūnu sistēmā, kur vienā reakcijā apvieno proteīna gēnu (kas ieklonēts speciālā bezšūnu sintēzes vektorā pETMCSI) un nepieciešamo *E. coli* transkripcijas un translācijas mašīnēriju. Šī metode ļauj ātri mazā tilpumā producēt rekombinantus proteīnus viegli kontrolējamos apstākļos. Arī ekspresētā proteīna attīrīšana ir vienkāršāka.

Darbā tika veiktas bezšūnu sintēzes reakcijas CcaBURP2 proteīnam. Proteīna gēns tika ieklonēts pETMCSI vektorā un pavairots ar *GeneJET Plasmid Maxiprep Kit* atbilstoši ražotāja protokolam. Mazā dialīzes membrānā ar 12-14 MWCO ievietoja 1 mL reakcijas maisījumu, to ievietoja 10 mL buferšķīdumā 15 mL plastmasas mēģenē (bezšūnu sintēzes reakcijas un buferšķīdumu sastāvi 4. pielikumā). Reakciju atstāja inkubēties pa nakti (aptuveni 14 h) 30°C pie 180 apgr./min. Nākamajā dienā maisījumu dialīzes membrānā nocentrifugēja un uz SDS-PAGE gēla analizēja šķīstošās un nešķīstošās frakcijas.

Lai mainītu reakcijas oksidēšanās-reducēšanās apstākļus tika testēti dažādi reducējošie aģenti: tika izmantots reducējošais aģents beta-merkaptotanolis (3,4 mM), kā arī reducēts un oksidēts glutations dažādās attiecībās (1:0.4 mM un 1:0.1 mM GSH:GSSG attiecībās) ar un bez 1.7 mM DTT. Reakcijas temperatūra tika pazemināta līdz 25°C.

## 2.2.7. Proteīnu attīršana

### BURP proteīni

Uz ledus atsaldēja šūnas un tās resuspendēja Ni afinitātes hromatogrāfijas buferšķīdumā (10 mL uz 1 g šūnu), pārnesa uz atbilstoša tilpuma vārglāzi, kas ievietota ledus vanniņā. To sonicēja 10 min ar ultraskaņas impulsiem režīmā 1 s impulss, 1 s pauze, 100 W, amplitūda atkarībā no tilpuma (50 – 100 mL 70%, >100 mL 90%). Lizātu centrifugēja 30 000 ×g 45 min 4°C. Supernatantu filtrēja caur 0.22 µm šļirces filtru. Proteīnu injecēja uz buferšķīdumā A (visi buferšķīdumu 5. pielikumā) ekvibrētas 5 mL HisTrap HP kolonnas ar ātrumu 3 mL/min. Kolonnu mazgāja ar 10 kolonnas tilpumiem buferšķīduma A un eluēja ar 100% buferšķīduma B, fracionējot pa 2 mL. Frakciju saturu analizēja ar SDS-PAGE gēlu. Eluētajam proteīnam tika veikta atsāļošanas (ang. val. *desalting*) hromatogrāfija ar 53 mL HiPrep Desalting Sephadex G-25 kolonnu TEV proteāzes šķelšanas buferšķīdumā (50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA), tad tika pievienota TEV proteāze (masas attiecībā 1:50 TEV pret šķelamo proteīnu). Šķelšanu atstāja pa nakti 4°C, paraugu SDS-PAGE gēlam paņēma pirms un pēc šķelšanas. Proteīnu iekoncentrēja ar Amicon 10 kDa MWCO koncentratoriem līdz 2-3 mL un inžektēja uz gelfiltrācijas kolonnas (Superdex 75 pg 16/600), kas ekvibrēta gelfiltrācijas buferī (20 mM nātrija citrāts, pH 7.0, 300 mM NaCl). Attīršanas frakcijas tika analizētas ar 12% Tris-glicīna SDS-PAGE gēlu.

### Peptīdi

Peptīdu attīršanai veica šūnu lizēšanu Ni afinitātes buferšķīdumā A ar 8 M urīnvielu (5. pielikums), proteīnu attīrja Ni afinitātes hromatogrāfiju un eluātu refoldēja, dializējot pret 2 L refoldēšanas buferšķīduma bez urīnvielas. Pēc refoldēšanas šķīdumu nocentrifugēja pie 30000 xg 30 min 4°C. Šķīstošajai frakcijai pievienoja TEV proteāzi un pa nakti atstāja šķelties. Nākamajā dienā peptīdu attīrja ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju.

## 2.2.8. Proteīnu refoldēšana

Pirms proteīnu refoldēšanas tika veikta ieslēgšanas ķermenīšu mazgāšana pēc Nelson *et al.* 2014. gadā publicētā protokola (Nelson et al. 2014).

### Refoldēšana ar pakāpenisku dialīzi

Attīrītos ieslēgšanas ķermenīšus izšķīdināja Ni afinitātes hromatogrāfijas buferšķīdumā (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazols, 8 M urīnviela) un sonicēja (60 W, 5 s on/10 s off, 10 min). Maisījumu centrifugēja pie 45 000 xg 40 min 18°C. Supernatantu izfiltrēja caur 0.22 µm šļirces filtru un inžektēja uz 5 mL HisTrap HP kolonnas, kas ekvibrēta

buferšķīdumā A (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazols, 8 M urīnviela). Proteīns tika eluēts ar 100% buferšķīdumu B (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazols, 8 M urīnviela), ievietots dialīzes membrānā (ar 12-14 kDa izslēdzošām porām) un 2 h dializēts pret 2 L bufera C (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM beta-merkaptotetanols, 4 M urīnviela), tad 2 h dializēts pret 2 L bufera D (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM beta-merkaptotetanols, 2 M urīnviela) un pa nakti atstāts dializēties pret 2 L bufera E (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM beta-merkaptotetanols). Nākamajā dienā proteīns tika centrifugēts pie 30 000 xg 20 min 4°C, lai atdalītu nogulsnes, kas veidojušās dialīzes procesā. Supernatants tika iekonzentrēts līdz 3 mL un attīrīts ar gēlfiltrāciju (Superdex 75 pg 16/600 kolonna). Proteīnu saturošās frakcijas tika analizētas ar SDS-PAGE gēlu.

### **Refoldēšana ar ātru atšķaidīšanu**

Proteīns tika attīrīts 8 M urīnvielā kā aprakstīts pakāpeniskās dialīzes protokolā. Pēc eluēšanas no HisTrap kolonnas, proteīnam veica dialīzi, lai atbrīvotos no imidazola. Tad pa maziem tilpuma intervāliem (500 µL) ar šļirci strauji injicēja 500 mL refoldēšanas buferšķīdumā (50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 3 mM reducēts glutations, 0.3 mM oksidēts glutations, 10% glicerīns), kas vārglāzē tika maisīts ar magnētisko maisītāju pie 600 apgr./min 4°C. Injekcijas atkārtoja ik pa 5 min, līdz viss proteīns tika atšķaidīts buferī bez denaturējošā aģenta. Maisījumu atšķaidīja līdz 1000 mL 20 mM Tris, pH 8.0 buferšķīdumā, lai mazinātu sāļu koncentrāciju un veica jonapmaiņas hromatogrāfiju. Atšķaidīto proteīnu inžektēja uz 5 mL HiTrap Q HP kolonnas ar ātrumu 3 mL/min un eluēja ar gradientu 0-100% bufera B pa sešiem kolonnas tilpumiem. Alternatīvi pēc proteīna refoldēšanas veica proteīna iekonzentrēšanu ar Ni afinitātes hromatogrāfiju – šādā gadījumā proteīnu pirms hromatogrāfijas neatšķaidīja. Pēdējais attīrīšanas solis bija gēlfiltrācijas hromatogrāfija (ar HiLoad Superdex 75pg 16/600 kolonnu).

### **2.2.9. Termālās nobīdes skrīnings**

Lai noteiktu, vai iegūtais proteīns ir foldēts un noteiktu to stabilizējošus buferšķīduma apstākļus, tika veikts termālās nobīdes skrīnings. Katra reakcija (20 µL) saturēja 10 µM proteīnu, 5x SYPRO Orange™ un dažādus buferšķīduma apstākļus. Mērījumi tika veikti ar Applied Biosystems Prism 7500 kvantitatīvā PCR iekārtu, izmantojot TAMRA krāsvielas filtru moduli.

### **2.2.10. Ciklizēšanas reakcijas**

Reakcijām 20 un 50 µL tilpumā 1.5 mL mikromēģenē savienoja AhyBURP proteīnu 30 µM beigu koncentrācijā, reakcijas buferšķīdumu (250 mM nātrija fosfātu-citrātu, pH 7.0)

pievienoja  $\text{CuCl}_2$  līdz 1 mM koncentrācijai, negatīvās kontroles paraugiem nepievienoja  $\text{CuCl}_2$ , bet pielika 0.5 mM EDTA. Maisījumu atstāja inkubēties pa nakti aptuveni 20 h 22°C.

### 2.2.11. Masspektrometrija

Masspektrometrijas analīzei ciklizēšanas reakcijas produktiem veica šķelšanu ar tripsīnu, izmantojot komerciālo *In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination* kitu atbilstoši kita protokolam (bez alkilācijas un guanidinācijas soļiem). Sašķeltos reakcijas produktus sajauc ar CHCA matricu tilpumā 1:1 uz masspektrometrijas plates. Kalibrācijai izmantoja *Bruker Peptide calibration standard* (Bruker 8206195). Pilieniem ļāva nožūt, pirms plates ievietošanas masspektrometrā.

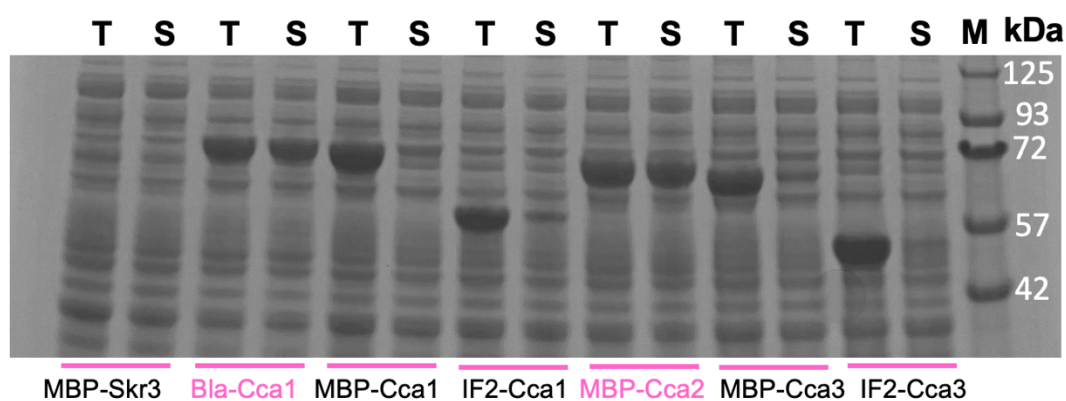
Spektri tika uzņemti uz Bruker Autoflex Max matricas-asistēta lāzera desorbcijas/ionizācijas (MALDI) ierīces ar lidojuma laika (TOF – *time of flight*) masas analizatoru. Masas analīzi veica pozitīvajā režīmā ar jonu reflektora izmantošanu. Izmantotā masas amplitūda bija 700 - 3500 Da.

Tika meklēti pamata peptīdu saturošie signāli, balstoties uz paredzētajiem m/z peptīdu signāliem pēc šķelšanas ar tripsīnu (izmantojot *PeptideMass prediction* programmu). Veica salīdzinājumu reakcijas un kontroles paraugiem.

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. BURP proteīnu ekspresijas testi

Vispirms tika veikti dažādu augu sugu BURP proteīnu ekspresijas testi *E. coli* BL21 T7 *Express* šūnās ar dažādām N-terminālajām 8xHis saturošām iezīmēm stabilitātes un šķīdības uzlabošanai. Tika izmantotas halofilās beta laktamāzes (Bla), maltozi saistošā proteīna (MBP), iniciācijas faktora 2 (IF2), glutationa S transferāzes (GST), GB1, LIPO iezīmes. Tika veikta proteīnu ekspresija 20°C ar 0,1 mM IPTG. Producēto proteīnu šķīdību analizēja, lizējot šūnas mazā apjomā ar *BugBuster* reaģentu – uz SDS-PAGE gēla salīdzināja kopējo un šķīstošo frakciju, lai noteiktu, kura iezīme piešķir visaugstāko šķīdību (**8. attēls**).



**8. attēls.** SDS-PAGE gēls daļai no ekspresijas un šķīdības testu paraugiem BURP proteīniem ar dažādām iezīmēm. (T - kopējā frakcija, S - šķīstošā frakcija). Konstrukti ar augstas šķīdības ekspresiju izcelti rozā krāsā.

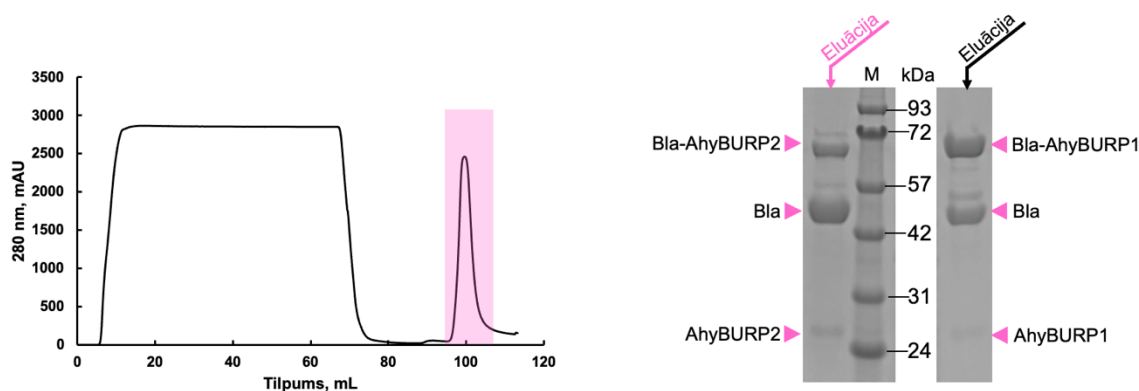
**Figure 8.** SDS-PAGE gel for some expression and solubility test samples of BURP domain proteins with various fusion tags. (T - total, S - soluble). Constructs with a high expression level are highlighted in pink.

Visaugstāko proteīnu ekspresijas daudzumu un šķīdību izdevās iegūt ar halofilās beta-laktamāzes un maltozes saistošo proteīnu iezīmēm, kas tālāk tika izmantotas kā iezīmes BURP proteīnu lielapjoma ekspresijai un attīrīšanai. Ar GST, GB1 un LIPO iezīmēm novēroja zemu ekspresijas iznākumus. IF2 iezīme piešķir augstu ekspresiju, taču proteīni bija nešķīstoši. Interesanti, ka bija novērojamas izteiktas atšķirības dažāda garuma BURP proteīnu konstruktu šķīdībā ar vienādu iezīmi. Piemēram, CcaBURP1 (pilna garuma CcaBURP proteīns) un CcaBURP3 (tikai BURP domēns) kopā ar MBP nav šķīstoši, taču CcaBURP2 (BURP domēns ar N-terminālu pamatpeptīda motīvu bez signālpeptīda sekvenses) bija gandrīz pilnībā šķīstošs

(8. attēls). Šīs izteiktās atšķirības ilustrē, cik liela ietekme uz ekspresētā proteīna šķīdību var būt izvēlētajām ekspresētā proteīna sekvences robežām.

### 3.2. BURP proteīnu attīršana

Attīrot BURP proteīnus ar beta-laktamāzes iezīmi, tika novērota problēma - kaut gan tā BURP proteīniem piešķir augstu šķīdību, proteīna produktam bija tendence tikt strauji degradētam tā, ka BURP proteīns tika atdalīts no iezīmes jau līzes un niķeļa afinitātes hromatogrāfijas laikā (tika izmantots PMSF kā proteāžu inhibitors), kā redzams SDS-PAGE analizē (9. attēls). Tas noveda pie BURP proteīna zudumiem, jo bez 8xHis-Bla iezīmes BURP proteīni nesaistās pie niķeļa agarozes sveķiem un nonāk caurplūdes frakcijā. Iespējams, tas notika linkera sekvences dēļ starp Bla iezīmi un BURP proteīnu - varbūt linkera sekvence starp Bla iezīmi un BURP proteīnu ir vairāk dinamiska, kas varētu to padarīt par pieejamāku substrātu dažādām *E. coli* proteāzēm un veicināt proteolīzi attīršanas procesā. Ar MBP iezīmi šādas degradācija netika novērota, tādēļ tā tika izvēlēta kā optimālā iezīme turpmākai proteīnu producēšanai. Taču, ja Bla iezīme būtu vienīgā opcija, proteolīzes problēmu varētu mēģināt risināt, variējot ar linkera sekvences garumu un pielietojot alternatīvus proteāžu inhibitorus vai to kokteiļus.

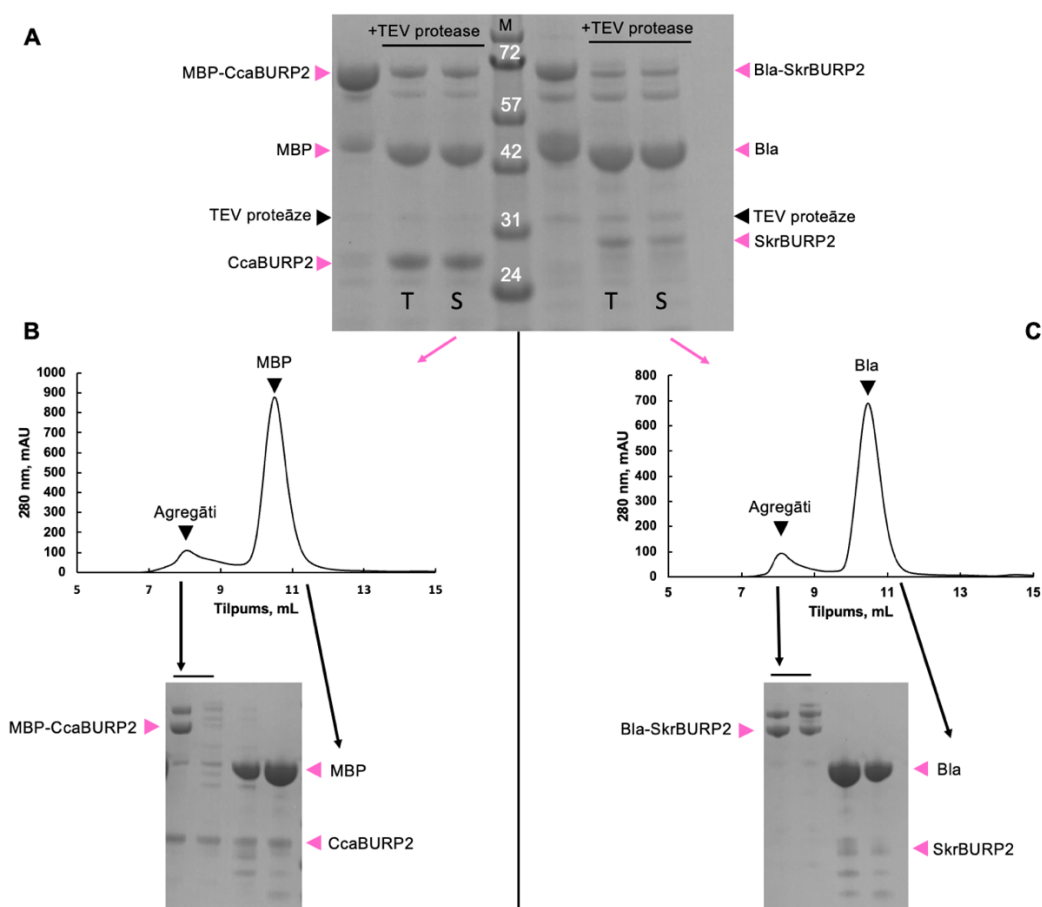


9. attēls. Niķeļa afinitātes hromatogramma (5 mL HisTrap HP kolonna) un SDS-PAGE gēls Bla-AhyBURP1 un Bla-AhyBURP2 attīršanas frakcijām, kur redzama ievērojama Bla taga proteolītiska degradācija. Eluācijas frakcija iekrāsota rozā krāsā.

**Figure 9.** Nickel affinity chromatogram (5 mL HisTrap HP column) and SDS-PAGE gel analysis of Bla-AhyBURP1 and Bla-AhyBURP2 purification, showing significant proteolytic degradation of the Bla tag. Elution fraction highlighted in pink.

Tālākajā attīršanas procesā tika novērotas vēl citas problēmas. Veica mērķētu iezīmes nošķelšanu ar TEV proteāzi: MBP-CcaBURP2 gadījumā šķelšana nebija pilnībā efektīva, taču nošķeltais CcaBURP2 proteīns neveidoja nogulsnes un palika šķīstošajā frakcijā. Bla-

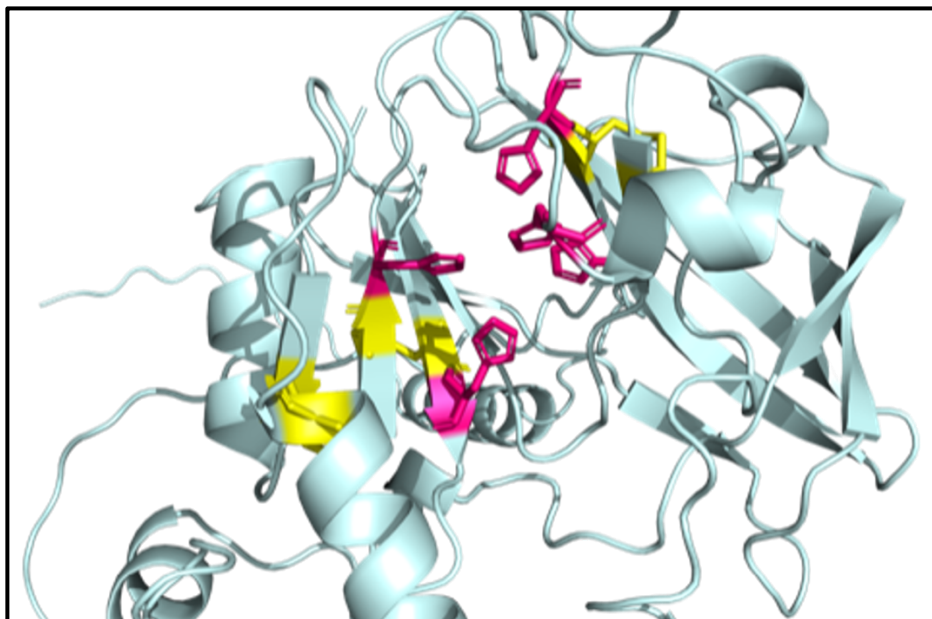
SkrBURP2 gadījumā šķelšana arī nebija pilnībā efektīva, pie tam šķelšanas laikā daļa SkrBURP2 agregējās un izkrita nogulsnēs (**10. attēls A**). Tika veikta gelfiltrācijas hromatogrāfija, lai atdalītu BURP proteīnus no iezīmēm, taču hromatogrammā varēja novērot tikai divus pīkus: pirmais atbilda agri eluējošam agregētam proteīnam, otrs – nošķeltajai iezīmei (**10. attēls B, C**). Analizējot gelfiltrācijas frakcijas uz SDS-PAGE gēla, varēja novērot, ka nošķeltais CcaBURP2 proteīns mazos daudzumos ir visās frakcijās, kas liecina par nespecifisku saistību ar kolonnas matricu vai arī heterogēnu masu sadalījumu (**10. attēls, B**). Tas liecina, ka CcaBURP2 proteīns visticamāk nav pareizi foldēts. SkrBURP2 proteīns bija jau sākotnēji degradējies un frakcijās gandrīz nebija novērojams (**10. attēls C**).



**10.attēls.** A – SDS-PAGE analīze MBP-CcaBURP2 un Bla-SkrBURP2 šķelšanai ar TEV proteāzi (T – kopējā frakcija, S – šķīstošā frakcija), B un C – Gelfiltrācijas hromatogrammas (HiLoad Superdex 75 pg 10/300 kolonna). Lielākā daļa SkrBURP2 ir izkritusi nogulsnēs un, lai gan CcaBURP2 ir šķīstošs, tā eluācija neatbilst pareizi foldētam proteīnam.

**Figure 10.** A – SDS-PAGE gel analysis of MBP-CcaBURP2 and Bla-SkrBURP2 TEV cleaving (T - total, S – soluble, B and C – Subsequent SEC chromatograms (HiLoad Superdex 75 pg 10/300 kolonna). Most of the SkrBURP2 has precipitated and while CcaBURP2 remains in the soluble fraction, it does not elute properly in SEC.

### 3.3.BURP proteīnu foldēšanās problēma



**11.attēls.** *AlphaFold2* paredzētā BURP domēna struktūra (*Coffea arabica arbBURP*) ar izceltiem cisteīniem (dzeltēni) un histidīniem (rozā).

**Figure 11.** *AlphaFold2* predicted BURP domain structure (*Coffea arabica arbBURP*) with highlighted cysteine (yellow) and histidine (pink) residues.

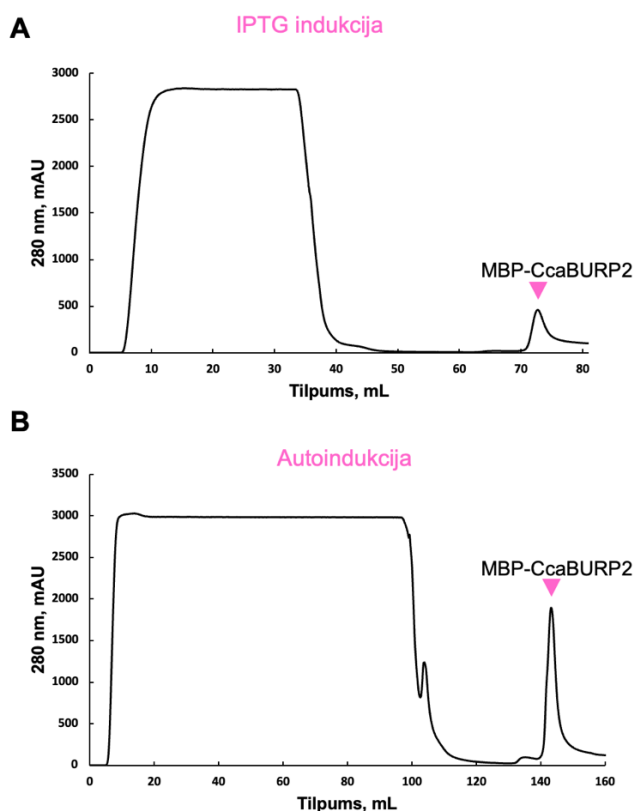
Analizējot *AlphaFold2* paredzēto BURP domēna proteīna struktūru, pēc CH motīvu telpiskā izvietojuma var novērot vietas, kur, visticamāk, BURP ciklāzes aktīvā centra struktūru veido vairākas disulfīdu saites, kas ļauj pieciem histidīniem koordinēt vara jonu, kas nepieciešams enzīmu aktivitātei (**11. attēls**). Kopš eksperimentu veikšanas ir publicēta eksperimentāli noteikta AhyBURP domēna struktūra, kas ir ļoti līdzīga paredzētajai un apstiprina šos minējumus (Mydy et al. 2024). Tādēļ kļūva skaidrs, ka aktīvu BURP proteīnu iegūšanai būs jāmeklē cita pieeja, kas risinātu foldēšanās problēmu, jo *E. coli* citoplazmā nav atbilstoši oksidēšanas-reducēšanas apstākļi, kā arī foldēšanās šaperoni, kas nodrošinātu eikariotu izelsmes proteīnu, kas satur daudzas disulfīdsaites, pareizu foldēšanu.

Tika izvēlētas trīs dažādas pieejas – pirmkārt, tika mēģināta ekspresija *E. coli SHuffle* šūnās, kas ir ģenētiski inženierēts BL21(DE3) šūnu atvasinājums, kur konstitutīvi tiek ekspresēta proteīnu disulfīdu izomerāze DsbC bez periplazmas signālpeptīda, kas lokalizējas citoplazmā un tur funkcionē kā šaperons, palīdzot nepareizi salocītiem proteīniem veidot disulfīdu saites. Otrkārt, tika mēģināta bezšūnu sintēze, kur vienā reakcijā tiek iekļauta visa nepieciešamā šūnu mašīnērija *in vitro* transkripcijai un translācijai. Bija plānots veikt šādas reakcijas dažādos oksidēšanas-reducēšanas apstākļos, kas potenciāli varētu veicināt pareizu disulfīdu saišu formēšanos (Matsuda et al. 2013). Treškārt, tika veikta proteīnu ķīmiska

refoldēšana – pēc ekspresijas *E. coli* BL21 T7 *express* šūnās tika veikta proteīna denaturācija 8 M urīnvielas klātbūtnē, kam sekoja divas refoldēšanas pieejas: vai nu ar pakāpenisku dialīzi, vai arī strauja denaturētā proteīna atšķaidīšanu lielā tilpumā ar buferi bez denaturējoša aģenta.

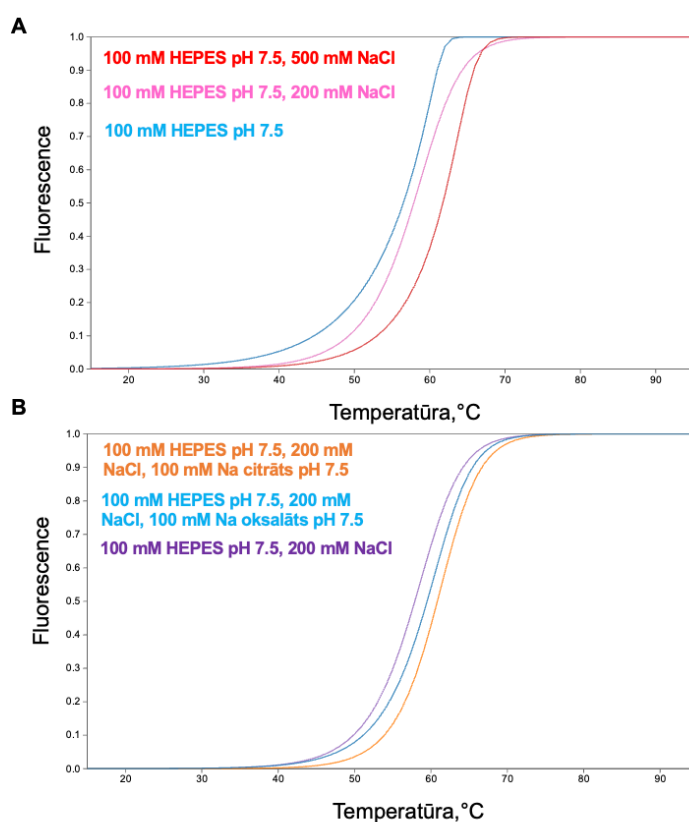
### 3.3.1. Ekspresija *SHuffle* šūnās

Tika veikta ekspresija un attīršana proteīniem, kas ekspresēti BL21 T7 *Express* un *SHuffle* šūnās. Kopējais proteīna daudzums *SHuffle* šūnās bija zemāks nekā T7 *Express* šūnās. Tika novērota lēna *SHuffle* šūnu augšana, visticamāk tādēļ, ka tām ir augstāks oksidatīvais stress. *SHuffle* šūnās tika iegūts maz AhyBURP proteīna, kad proteīna ekspresija tika inducēta ar IPTG. Lai uzlabotu proteīna iznākumus, tika izmantota autoindukcija jeb ekspresijas metode, kur šūnas vispirms patērē barotnē esošo glikozi, tad sāk metabolizēt laktozi, kas pie reizes arī inducē proteīna ekspresiju. Šāda pieeja noveda pie uzlabotas šūnu augšanas un rezultātā ekspresijas beigās tika iegūta lielāka biomasa un lielāki proteīna iznākumi uz litru barotnes nekā ar IPTG indukciju (**12. attēls**).



**12.attēls.** Niķeļa afinitātes hromatogrammas (5 mL HisTrap HP kolonna) 1 L MBP-CcaBURP2 proteīna attīršanai no *SHuffle* šūnām ar IPTG indukcijas (A) un autoindukcijas (B) metodēm. **Figure 12.** Nickel affinity chromatograms (5 mL HisTrap HP column) for 1 L MBP-CcaBURP2 purification from *SHuffle* cells using IPTG induction (A) and autoinduction (B) methods.

Veicot attīrīšanu, gefiltrācijas hromatogrāfijā *SHuffle* šūnās ekspresētais AhyBURP eluējās atbilstoši dimēram (6. pielikums), salīdzinot ar kolonnas ražotāja norādītajiem eluēšanas tilpumiem. Tam tika veikts termālās nobīdes skrīnings (angļu val. *thermal shift assay*) ar dažādiem buferšķīduma apstākļiem, lai noteiktu, vai proteīns ir foldēts un kādi ir to stabilizējošie apstākļi. Vispirms tika veikts skrīnings pH un sāls koncentrācijām. Spriežot pēc līknēm, pieaugot temperatūrai, varēja novērot fluorescences pieaugumu, kas liecina par to, ka proteīnam ir folds un tas atfoldējas. Pēc TSA līknēm var spriest, ka AhyBURP2 stabilizē augstas sāls koncentrācijas: novēroja proteīna kušanas temperatūras pieaugšanu līdz ar augstākām NaCl koncentrācijām (13. attēls A).



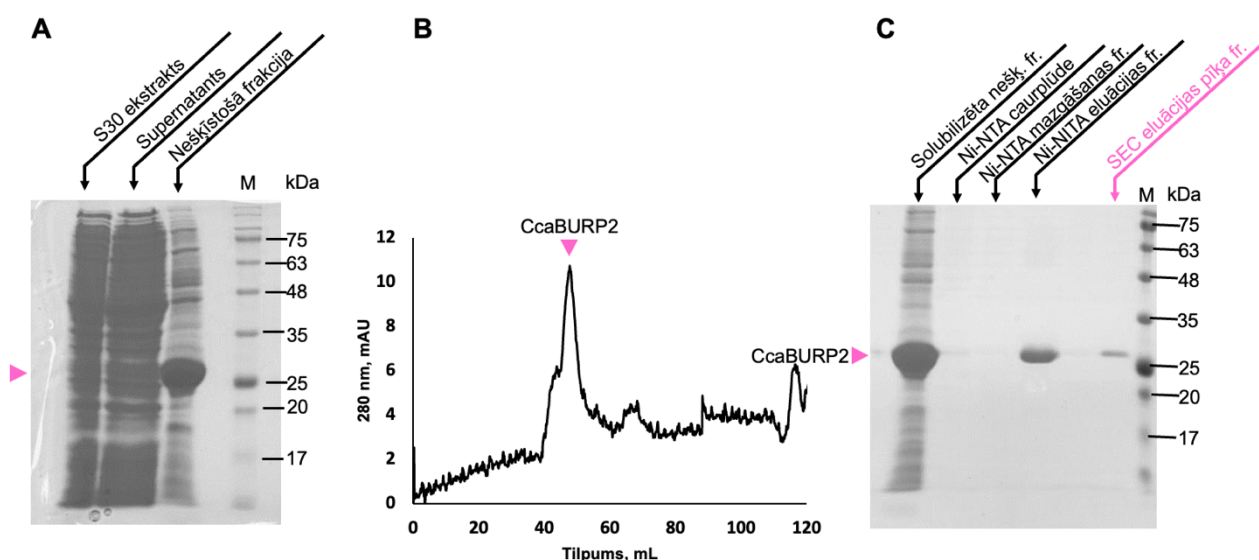
**13. attēls.** AhyBURP2 termālās nobīdes skrīnings ar SYPRO Orange™ krāsvielu. Grafikos norādītas normalizētās fluorescences līknes dažādiem buferšķīdumu apstākļiem. A – Fluorescences līknes ar 100 mM HEPES pH 7.5 bāzi un pieaugošu NaCl koncentrāciju. B – Fluorescences līknes ar 100 mM HEPES pH 7.5 bāzi un dažādiem karboksilātiem.

**Figure 13.** *AhyBURP2 thermal shift assay with SYPRO Orange™ dye. Normalized fluorescence curves for various buffer conditions are shown in the graph. A – Fluorescence curves with a 100 mM HEPES pH 7.5 base and increasing NaCl concentrations. B – Fluorescence curves with a 100 mM HEPES pH 7.5 base and different carboxylate additives.*

Tika veikts vēl viens apstākļu skrīnings ar stabilizējošām piedevām. No tām proteīnu visvairāk stabilizēja dažādi karboksilāti – nātrija citrāts, nātrija oksalāts (**13. attēls B**). Stabilizējošu efektu radīja arī aminoskābju – lizīna un glutamīnskābes – pievienošana.

### 3.3.2. Bezšūnu sintēze

CcaBURP2 proteīnam tika veikta bezšūnu sintēzes reakcija, mēģinot iegūt pareizi foldētu proteīnu. Tika iegūts augsts ekspresijas līmenis, spriežot pēc reakcijas analīzes ar SDS-PAGE, taču gandrīz viss proteīns bija nešķīstošajā frakcijā (**14. attēls A**). Nešķīstošo frakciju izšķīdināja 8 M urīnvielā (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glicerīns, 25 mM imidazols, 8 M urīnviela) un attīrīts ar niķeļa afinitātes hromatogrāfiju un eluēto proteīnu refoldēja, pakāpeniski dializējot un samazinot urīnvielas koncentrāciju (8 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0 M). Refoldēto proteīnu attīrīja ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju (**14. attēls B, C**), kur tas eluējās pie 40 mL, kas liecina, ka proteīns visticamāk ir agregējies.

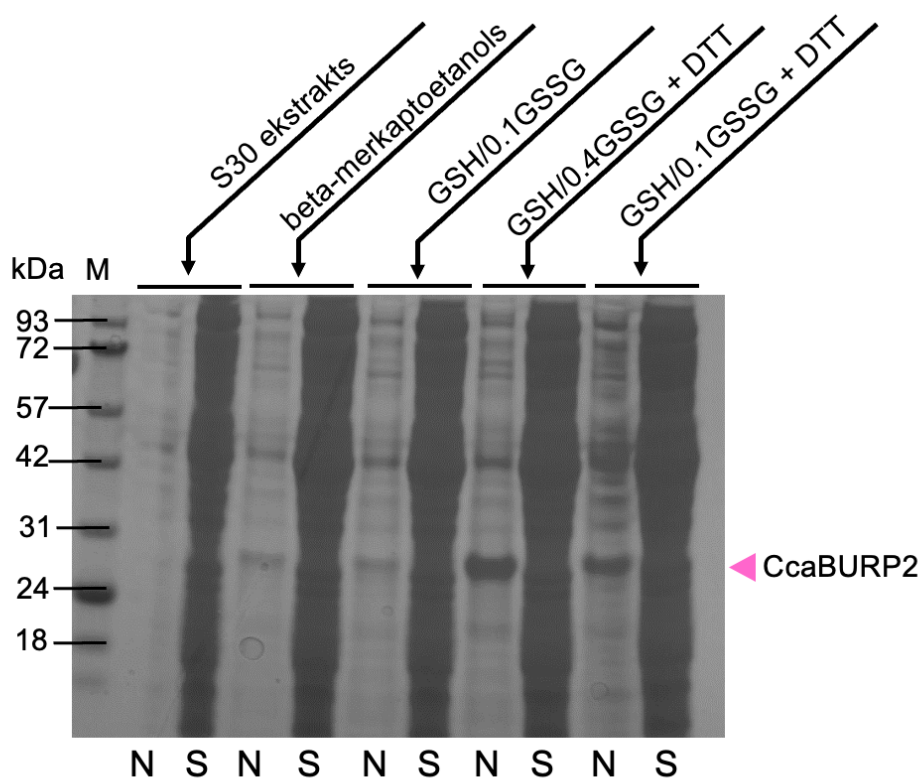


**14.attēls.** A - SDS-PAGE gēls CcaBURP2 bezšūnu ekspresijas reakcijai; B – Gelfiltrācijas hromatogramma (HiLoad Superdex 75 pg 16/600 kolonna) refoldētajam CcaBURP2; C – SDS-PAGE gēls CcaBURP2 attīrīšanas frakcijām.

**Figure 14.** A – SDS-PAGE gel for CcaBURP2 cell-free synthesis reactions; B – Gel filtration chromatogram (HiLoad Superdex 75 pg 16/600 column) for the refolded CcaBURP2; C – SDS-PAGE gel for CcaBURP2 purification fractions.

Bezšūnu sintēzes reakcijas tika atkārtotas, mainot oksidēšanas-reducēšanas apstākļus. Tika izmantots 3,4 mM beta-merkaptotetanolis kā reducējošais aģents, kā arī tika liktas reakcijas ar oksidētu un reducētu glutationu (1:0.4 mM un 1:0.1 mM GSH:GSSG attiecībās) ar un bez 1.7 mM DTT. Reakcijas arī tika inkubētas zemākā temperatūrā (25°C). Diemžēl neizdevās

uzlabot šķīstošā proteīna iznākumus, taču paraugos ar oksidētu un reducētu glutationu un DTT bija augstāka proteīna ekspresija – visvairāk ar 1:0.4 mM GSH:GSSG, 1.7 mM DTT (15. attēls).



**15.attēls.** SDS-PAGE gēls bezšūnu sintēzes reakcijām ar dažādiem oksidēšanas-reducēšanas apstākļiem. N – nešķīstošā frakcija, S – supernatants.

**Figure 15.** SDS-PAGE gel for cell-free synthesis reactions samples with varying redox conditions. N – insoluble fraction, S – supernatant.

### 3.3.3. Refoldēšana

AhyBURP2 un CcaBURP2 proteīniem tika veikti refoldinga mēģinājumi. Tika mēģinātas divas pieejas - refoldēšana ar strauju atšķaidīšanu un refoldēšana ar pakāpenisku dialīzi.

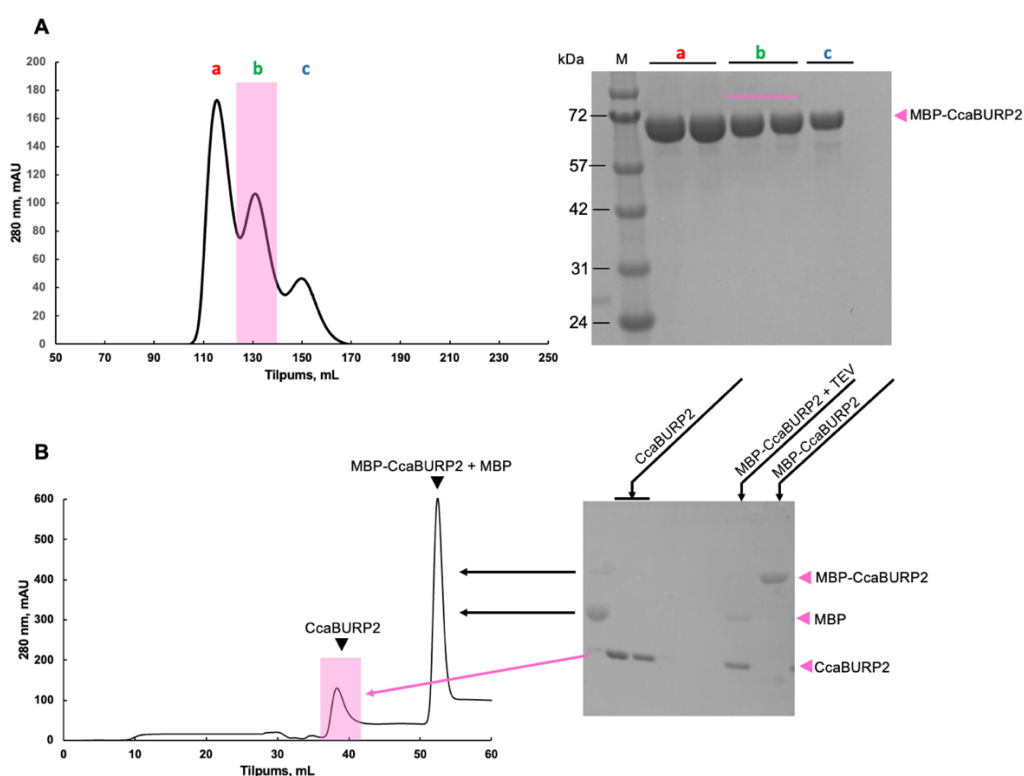
#### Refoldēšana ar strauju atšķaidīšanu

NHis-AhyBURP un MBP-CcaBURP2 tika izmantota refoldēšanas pieeja, kuras pamatā ir strauja denaturētā proteīna atšķaidīšana lielā tilpumā buferšķīduma bez denaturējoša aģenta (9 mL denaturēta proteīna atšķaidīti 300 mL buferšķīduma). Atšķaidot proteīnu, netika novērota agregācija, t. i., šķīdums bija dzidrs, taču attīrīšanas tālākos soļos, veicot jonapmaiņas vai niķeļa afinitātes hromatogrāfijas, injicējot lielu tilpumu ar refoldēto proteīnu (ap 300 mL), proteīns

nešķīstoši izgulsnējās uz kolonnas. Visticamāk, straujā lokālās koncentrācijas pieaugšana, proteīnam saistoties pie kolonnas, izraisīja agregāciju, pat ja proteīns sākotnēji bija pareizi safoldējies. Šī metode turpmāk vairs netika izmantota refoldēšanai.

## Refoldēšana ar pakāpenisku dialīzi

Veicot refoldēšanu ar dialīzi MBP-CcaBURP2 un NHis-AhyBURP2, tika novērota proteīna izgulsnēšanās, taču daļa proteīna saglabājās šķīstošā formā, ko attīrīja ar gēlfiltrācijas hromatogrāfiju. Piemēram, šādi refoldēja MBP-CcaBURP2 proteīnu, kuru refoldēšanas beigās attīrīja ar gēlfiltrācijas hromatogrāfiju (**16. attēls A**), tad veica MBP taga nošķelšanu ar TEV proteāzi un attīrīja ar reverso niķeļa afinitātes hromatogrāfiju. Refoldētam proteīnam šķelšana bija daudz efektīvāka nekā nerefoldētam MBP-CcaBURP2 (**16. attēls B**).

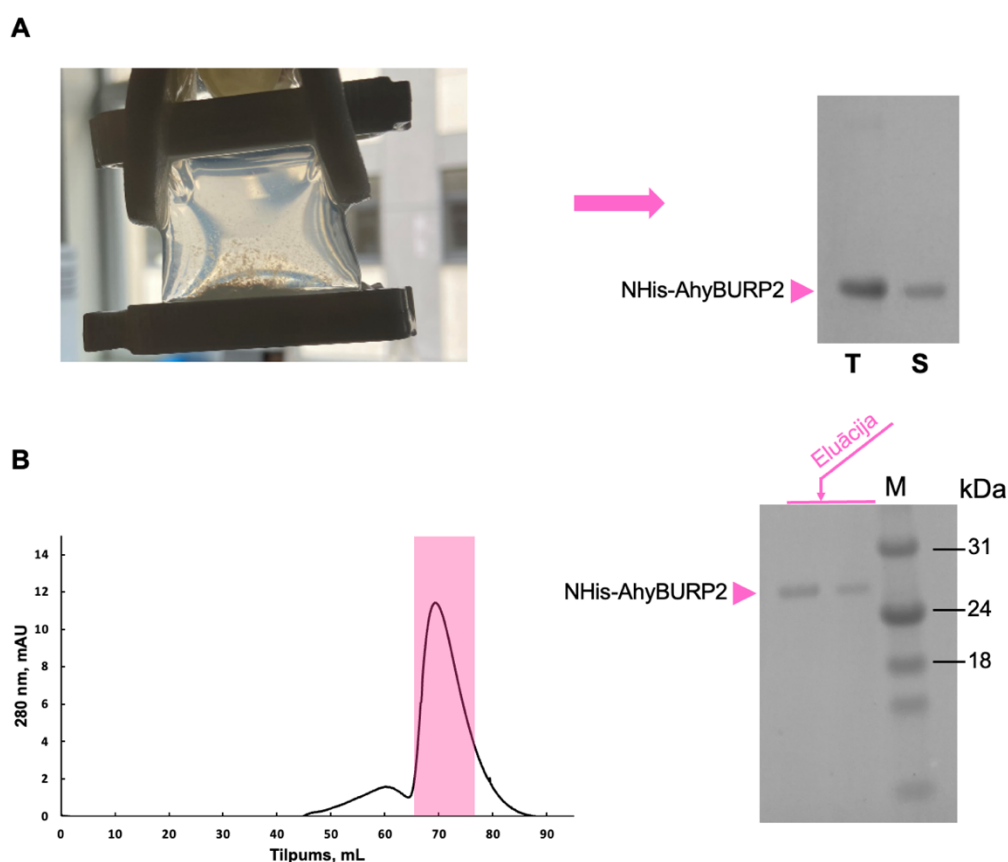


**16. attēls.** A – Refoldēta MBP-CcaBURP2 gēlfiltrācijas hromatogramma (HiLoad Superdex 75 pg 26/600 kolonna) un SDS-PAGE gēls attīrīšanas frakcijām. B – SDS-PAGE gēls proteīna šķelšanai ar TEV proteāzi un reversās niķeļa afinitātes hromatogramma (5 mL HisTrap HP kolonna).

**Figure 16.** A – Gel filtration chromatogram (HiLoad Superdex 75 pg 26/600 column) of refolded MBP-CcaBURP2 and SDS-PAGE gel of the fractions. B – SDS-PAGE gel for cleaved protein fractions with TEV protease and reverse IMAC chromatogram (5 mL HisTrap HP column).

Tika iegūts CcaBURP2, kuram veica termālās nobīdes skrīningu, lai noteiktu, vai proteīns ir foldēts un kādi buferšķīduma apstākļi palielina tā stabilitāti. Diemžēl TSA dati liecināja, ka, lai gan CcaBURP2 proteīns bija šķīstošs, tas nebija pareizi foldējies, jo netika novērots foldētam proteīnam raksturīgs fluorescences pieaugums. Iespējams, pēc šķelšanas ar TEV proteāzi, proteīns zaudēja folda stabilitāti, vai arī MBP tags traucēja refoldēšanā, izraisot šķīstošu agregātu veidošanos.

Tika refoldēts arī NHis-AhyBURP2 pēc tāda paša protokola, dialīzes procesā arī novēroja proteīna izgulsnēšanos dialīzes membrānā (**17. attēls A**). Gelfiltrācijas hromatogrāfijā nebija novērojami agregāti, NHis-AhyBURP2 eluējās atbilstoši dimēra masai (**17. attēls B**).



**17.attēls.** NHis-AhyBURP2 refoldēšana. A – Dialīzes membrāna ar izgulsnējušos proteīnu un SDS-PAGE gēls kopējai un šķīstošajai frakcijai; B – Gelfiltrācijas hromatogramma (HiLoad Superdex 75 pg 16/600 kolonna) refoldētajam AhyBURP2 proteīnam un SDS-PAGE gēla attīrīšanas frakcijas.

**Figure 17.** NHisAhyBURP refolding. A – A dialysis membrane with some precipitated protein and an SDS-PAGE gel for the total and soluble fractions; B – Gel filtration chromatogram (HiLoad Superdex 75 pg 16/600) for the refolded AhyBURP2 protein and SDS-PAGE gel fractions for the purified protein.

AhyBURP eluēšanās profils pēc refoldēšanas izskatījās vislabāk, tas arī tika izmantots tālāk ciklizācijas reakcijām.

### 3.4. Rekombinantu peptīdu producēšana

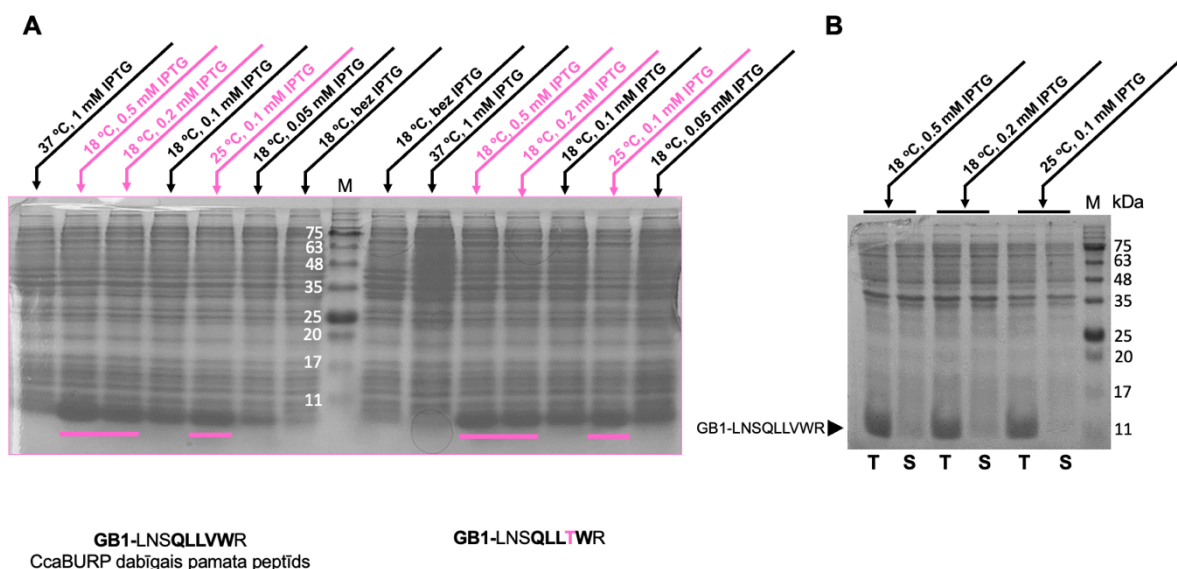
Paralēli mēģinājumiem iegūt foldētus BURP proteīnus, tika dizainēti un ekspresēti substrāta peptīdi, kas savienoti ar GB1 iezīmi, lai testētu BURP proteīnu katalizētu transciklizāciju. Par pamatu ņēma augos sastopamo peptīdu sekvenses, kas saistītas ar attiecīgajiem BURP proteīniem – AhyBURP – QPYGVYTW, CcaBURP – QLLVW, SkrBURP – VLFYPSY. Pamata peptīdu sekvencēs tika veikta aminoskābju aizvietošana, pievienošana un izdzēšana (**18. attēls**).

QLLVW	CcaBURP <i>core</i> peptīda sekvence
QLLTW	Mutācija V → T
QLLAVW	Insercija +A
QLLANVW	Dubulta insercija +AN

**18.attēls.** Piemēri CcaBURP2 pamata peptīda sekvenses modifikācijām.

*Figure 18. Examples of CcaBURP2 core peptide sequence modifications.*

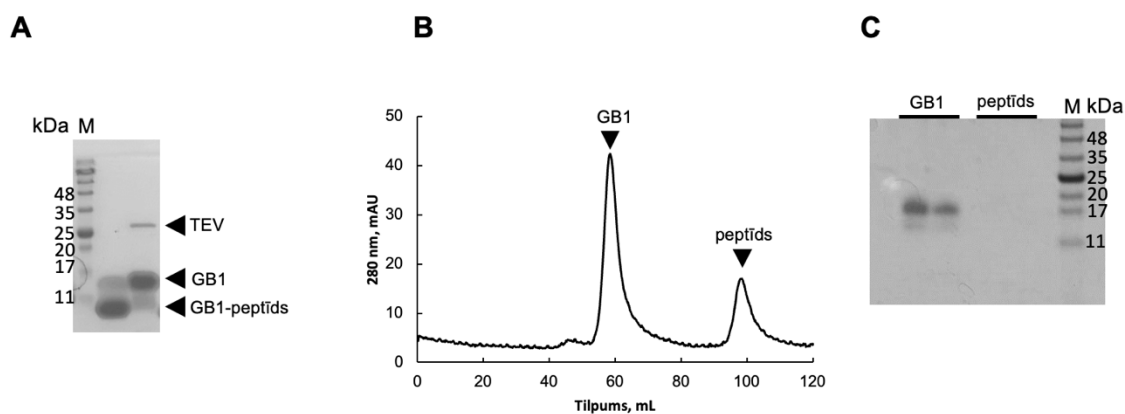
Veica ekspresijas testus peptīdiem ar dažādām IPTG koncentrācijām un ekspresijas temperatūrām. Pie 37 °C tika novērota ļoti zema ekspresija, tikmēr visaugstākā ekspresija bija novērota pie 18 °C ar 0.2 mM un 0.5 mM IPTG, kā arī pie 25°C ar 0.1 mM IPTG (**19. attēls A**). Analizējot optimālo ekspresijas apstākļu paraugu šķīdību, izmantojot *BugBuster* reaģentu, diemžēl tika konstatēts, ka GB1-peptīdi nebija šķīstoši (**19. attēls B**).



**19. attēls.** Peptīdu ekspresijas optimizācija. A – SDS-PAGE gēls CcaBURP pamata peptīda un tā mutanta peptīda ekspresijas testiem. B – SDS-PAGE gēls optimālo ekspresijas apstākļu šķīdības testiem. T – kopējā frakcija, S – šķīstošā frakcija.

**Figure 19.** Peptide expression optimization. A – SDS-PAGE gel for the CcaBURP core peptide and its mutant expression tests. B – SDS-PAGE gel of optimal expression condition sample solubility tests. T – total, S – soluble.

Peptīdu attīrīšanai izmantoja buferšķīdumus ar 8 M urīnvielu: peptīdus attīrīja ar Ni afinitātes hromatogrāfiju, tad refoldēja, dializējot pret refoldēšanas buferšķīdumu bez urīnvielas, un veica GB1 šķelšanu ar TEV proteāzi (**20. attēls A**). Analizējot šķelšanas produktus, varēja novērot, ka GB1 gēlā migrēja atbilstoši augstākai molmasai nekā sākotnējais GB1-peptīds. To varētu skaidrot ar GB1 negatīvo lādiņu ( $pI = 4.46$ ), kas tam liek migrēt pie augstākas masas, taču GB1-peptīda konstruktā peptīda daļa šo lādiņu, iespējams, neitralizē, kas izraisa migrāciju pie zemākas molmasas. Nošķeltos produktus attīrīja ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju (**20. attēls B**), varēja novērot divus pīķus, kas atbilda attiecīgi GB1 un peptīdam. Analizējot eluācijas frakcijas uz SDS-PAGE gēla (**20. attēls C**), bija redzams tikai GB1, bet ne peptīds, iespējams, tam elektroforēzes laikā notiek difūzija mazā izmēra (10 aminoskābes) dēļ. Kā arī būtu gaidāms, ka tas mazāk intensīvi iekrāsotos ar gēla krāsvielu. Nošķeltais peptīds netika izmantots ciklizēšanas reakcijām, jo tas bija pārāk zemā koncentrācijā.



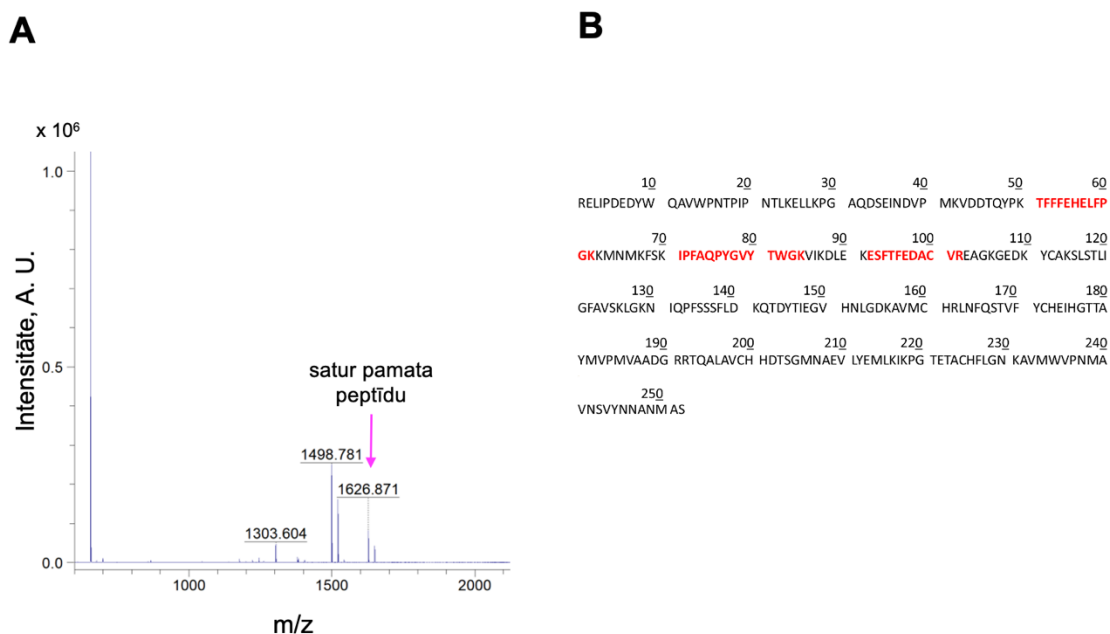
**20. attēls.** CcaBURP dabīgā pamata peptīda QLLVW attīrīšana. A – SDS-PAGE gēls GB1-peptīda TEV šķelšanas produktiem, B – gēlfiltrācijas hromatogramma (HiLoad Superdex 30 pg 16/600 kolonna) šķelšanas produktiem, C – SDS-PAGE gēls gēlfiltrācijas eluācijas frakcijām.

**Figure 20.** CcaBURP natural core peptide QLLVW purification. A – SDS-PAGE gel for GB1-peptide TEV cleaving products, B – gel filtration chromatogram (HiLoad Superdex 30 pg 16/600 column), C – SDS-PAGE gel for gel filtration elution fractions.

### 3.5. Ciklizēšanas reakcijas

#### 3.5.1. Autociklizēšana

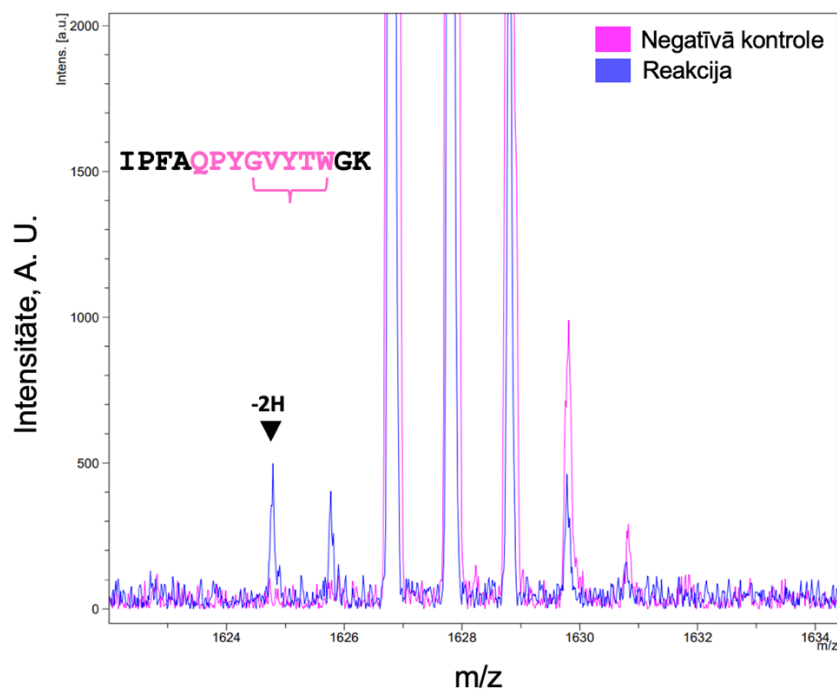
Autociklizācijas reakcijām tika izvēlēts izmantot AhyBURP refoldēto proteīnu, jo tam tika novērots optimālākais eluēšanas profils gēlfiltrācijas hromatogrāfijā, kas liecināja par pareizu proteīna foldu, t.i. proteīns veidoja izteiktu pīķi 65 – 75 ml reģionā. Autociklizēšanas reakcijām AhyBURP proteīns tika inkubēts 30  $\mu$ M koncentrācijā ar 1 mM CuCl<sub>2</sub> 20 h 20°C. Reakcijas produktiem tika veikta šķelšana ar tripsīnu un masspektrometrijas analīze (21. attēls).



**21.attēls.** A – MALDI-TOF Masspektrs ar tripsīnu sašķeltajiem AhyBURP2 ciklizēšanas reakcijas produktiem. B – Identificētie tripsīna šķelšanas produkti AhyBURP aminoskābju sekvencē.

**Figure 21.** A – MALDI-TOF Mass spectrum of AhyBURP cyclisation reaction tryptic digest products. B – Identified tryptic digest products in AhyBURP amino acid sequence.

Analizējot signālu, kas ietver pamata peptīdu, kam vajadzētu tikt modificētam, tika novērots papildu signāls, kas atbilst 2H masas zudumam – atbilstoši monocikliskam ciklizācijas reakcijas produktam (**22. attēls**). Signāls nebija novērojams negatīvās kontroles reakcijā bez  $\text{CuCl}_2$  un ar EDTA, kas ar vara joniem veido helātu, neļaujot tiem saistīties ar enzīmu. Refoldētais AhyBURP ir spējīgs ciklizēt savu peptīda substrātu, producējot monociklisku produktu, kā rezultātā peptīds zaudē divus ūdeņraža atomus, tomēr, spriežot pēc cikliskā peptīda daudzuma, ciklizācija ir bijusi ar zemu efektivitāti. Bija plānots veikt MS/MS, lai pārlicinātos, ka notikusi ciklizācija, nevis tikai dehidrogenācija, bet to nebija iespējams veikt peptīda zemās koncentrācijas dēļ.

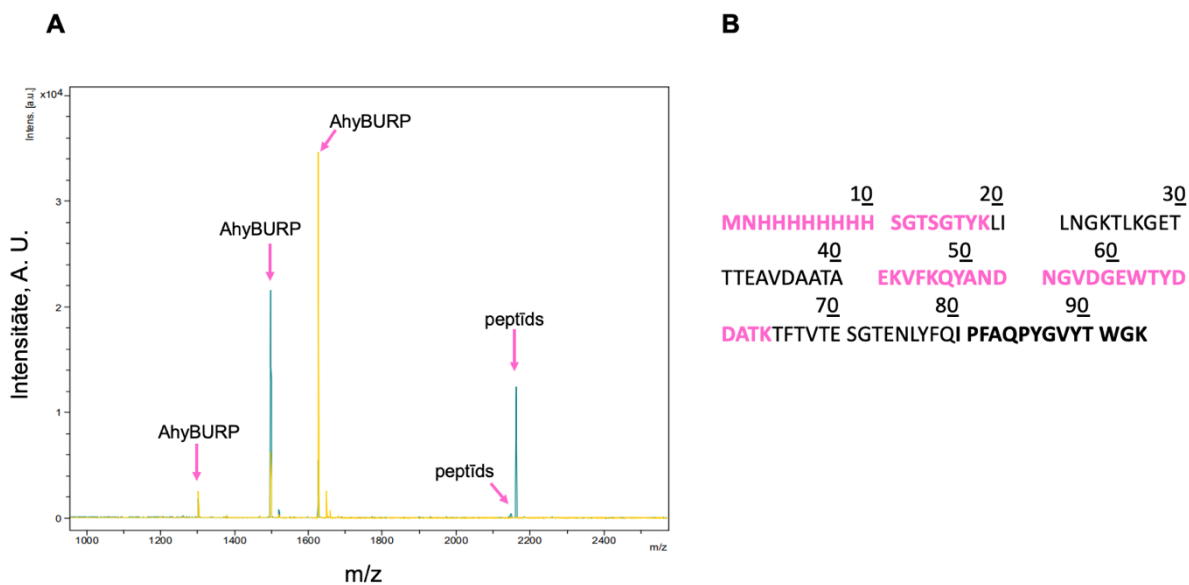


**22. attēls.** Pamata peptīdu saturošā peptīda signālu analīze. Reakcijas (zils) un negatīvās kontroles (rozā) salīdzinājums.

**Figure 22.** Core peptide-containing peptide signal analysis. Comparison of the reaction (blue) and negative control (pink).

### 3.5.2. Lineāro peptīdu ciklizēšana

Tika veikti transciklizācijas mēģinājumi ar refoldēto AhyBURP2 un rekombinanti iegūtajiem lineārajiem peptīdiem ar GB1 iezīmi. Inkubēja AhyBURP2 30  $\mu$ M koncentrācijā ar  $\sim$ 10  $\mu$ M lineāro peptīdu un 1 mM  $\text{CuCl}_2$  20 h 20°C. Reakcijas produktus analizēja ar masspektrometriju (**23. attēls**). Diemžēl starp identificētajiem peptīda signāliem bija tikai GB1 peptīdi, taču nebija AhyBURP2 pamata peptīdu saturošā tripsinizācijas produkta. Signāla trūkumu var izraisīt konkrētā peptīda nespēja jonizēties MALDI metodē. Līdz ar to nebija iespējams novērtēt, vai notikusi transciklizācija lineārajam peptīdam.



**23. attēls.** A – Masspektrs ar tripsīnu sašķeltajiem AhyBURP2 transciklizēšanas reakcijas produktiem. B – Identificētie tripsīna šķelšanas produkti GB1-peptīda aminoskābju sekvencē.

**Figure 23.** A – Mass spectrum of AhyBURP trans cyclisation reaction tryptic digest products. B – Identified tryptic digest products in GB1-peptide amino acid sequence.

### 3.6. Problēmas, potenciālie risinājumi

Mūsu novērojumi liecina, ka lielākais šķērslis BURP domēnus saturošu proteīnu produkcijā ir refolding, kas ir laikietilpīgs process un izraisa proteīna zudumus nepilnīga foldinga un daļējas agregācijas dēļ. Kā potenciālu risinājumu šai problēmai var minēt alternatīvas ekspresijas sistēmas, kā piemēram raugu *Pichia pastoris*. *P. pastoris* ir eikariotiem raksturīga sekrēcijas sistēma, kas iekļauj endoplazmatisko tīklu, nodrošinot atbilstošu oksidēšanas-reducēšanas vidi, kā arī disulfīdu izomerāzes. Atšķirībā no augstākiem eikariotiem (insektiem vai zīdītājiem), rauga šūnas nepieprasa sarežģītu un dārgu kultivāciju, un ekspresiju var veikt gan mazos tilpumos, gan izmantojot fermentācijas bioreaktoru.

Veicot bezšūnu sintēzi, ekspresētais proteīns bija nešķīstošs. Šo problēmu varētu risināt, modificējot reakcijas apstākļus – reakciju inkubējot pie zemākas temperatūras, kas palēninātu ekspresijas procesu un, iespējams, mazinātu producētā proteīna agregēšanos. Kā arī reakcijā varētu izmantot disulfīdu izomerāzi, piemēram *E. coli* DsbC, kas ir arī *E. coli* SHuffle šūnu citoplazmā, kur šī darba ietvaros izdevās producēt foldētu AhyBURP2 proteīnu. Matsuda un kolēģi, piemēram, ir veiksmīgi kombinējuši oksidēšanas apstākļu modificēšanu ar glutationu un DsbC pievienošanu, lai sintezētu disulfīdsaites saturošus proteīnus (Matsuda et al. 2013).

Ievērojama problēma bija arī AhyBURP2 zemā autociklizācijas efektivitāte, ko varētu skaidrot ar to, ka, iespējams, daļa refoldētā proteīna tomēr bija ar nepareizu konformāciju. Taču

balstoties uz rakstu, kas iznāca 2024. gada februārī (Mydy et al. 2024), AhyBURP ciklizācijas efektivitāte ir ievērojami zemāka nereducējošos apstākļos, kas arī tika izmantoti šajā darbā. Rakstā arī tiek demonstrēts, ka nereducējošos apstākļos pārsvarā tiek iegūts monociklisks produkts, kas sakrīt ar mūsu rezultātiem. Efektivitāti var ievērojami uzlabot, ciklizēšanas reakciju veicot GSH, GSH/GSSG, beta-merkaptoetanolā, TCEP, DTT klātbūtnē.

Lineāro peptīdu produkcijai tika izmantota rekombinanta ekspresija, jo šajā darbā bija paredzēts attīstīt tieši sintētiskās bioloģijas metodes ciklisku peptīdu producēšanai, taču jāatzīst, ka šī pieeja nesniedza vēlamos rezultātus – peptīdu attīrīšanas procesu sarežģīja tas, ka GB1-peptīdi ekspresējās nešķīstoši un tos nācās refoldēt. Kā arī pēc GB1 iezīmes nošķelšanas pamata peptīdus nevarēja identificēt ar SDS-PAGE un tos nevarēja iekoncentrēt ar centrifugālo ultrafiltrāciju mazo izmēru dēļ. Gelfiltrācijas eluācijas frakcijas nāktos liofilizēt un peptīdu pēc tam resuspendēt reakcijas buferšķīdumā, kas sarežģītu procesu. Tādēļ secinām, ka lineāru peptīdu substrātu producēšanai jēdzīgāks variants būtu izmantot peptīdu cietās fāzes sintēzi vai arī pasūtīt komerciāli sintezētus lineāros peptīdus. Rekombinantais ieguves ceļš varētu būt noderīgāks garāku prekursora peptīdu producēšanai (20 -100 aminoskābes).

### 3.7. Nākotnes perspektīvas

Joprojām ir aktuāls jautājums, vai BURP autociklāzēm piemīt arī transciklizēšanas aktivitāte. 2024. gada rakstā tika testēta AhyBURP autociklāzes spēja veikt starpmolekulāru ciklizāciju, kas netika novērota, iespējams sterisku traucējumu dēļ (Mydy et al. 2024). AhyBURP ir BURP paveids, kas savu pamata peptīdu satur pašā BURP domēnā, atšķirībā no CcaBURP un SkrBURP, kuros pamata peptīda motīvi atrodas N-termināli no BURP domēna. Iespējams, šādi BURP proteīni būtu vairāk spējīgi veikt starpmolekulāru ciklizāciju un būtu perspektīvākas transciklāzes. Vēl būtu vērts pētīt nesen atklāto škelto ciklāzi arbBURP (Lima et al. 2023), kas dabīgi veic transciklizāciju atsevišķi ekspresētam prekursora peptīdam. Varētu testēt šī šķeltā BURP ciklāzes aktivitāti ar dažādiem peptīdu substrātiem.

Šajā darbā ar producētajiem rekombinantajiem peptīdiem neizdevās testēt transciklizāciju, taču darbs pie tā turpinās, jo pavērtu plašākas iespējas no industriāla viedokļa – transciklizēšana ciklisko peptīdu producēšanas procesu padarītu modulārāku un ļautu BURP proteīnu izmantot kā biokatalizatoru, peptīda substrātu pievienojot stehiometriskā pārsvarā. Cikliskā peptīda produktu varētu attīrīt ar LC-MS un nenāktos to vēl nošķelt no BURP proteīna. BURP proteīniem vēl nav identificēta proteāze, kas veic pamata peptīda nošķelšanu no prekursora peptīda. Līdz ar to autociklizēšanas gadījumā nāktos ieviest, piemēram, TEV proteāzes šķelšanas sekvences, lai nošķeltu ciklisko peptīdu. Varētu arī izmantot Dang un kolēģu aprakstīto SNAC-tag (angļu val. *Sequence-specific Nickel Assisted Cleavage*) ķīmisko

šķelšanu (Dang et al. 2019). Ķīmiskas šķelšanas gadījumā ierobežojumus neradītu steriski traucējumi un šķelšanas enzīmu aktivitāte.

Vēl nākotnē varētu izmantot bezšūnu sintēzi ne tikai kā metodi foldētu BURP proteīnu producēšanai, bet arī kā pieeju ciklizēšanas reakcijām. Varētu vienā reakcijā sintezēt gan BURP proteīnu, gan lineāra peptīda substrātu (ar 8xHis iezīmi attīrīšanai) vara klātbūtnē un tādā veidā iegūt cikliska peptīda produktu. Piemēram, Liu un kolēģi nesēn aprakstījuši apvienotu biokatalīzes bezšūnu sintēzes sistēmu (*UniBioCat*), kur veica RiPP biosintēzes *in vitro* rekonstitūciju (W. Q. Liu et al. 2024).

Lai producētu jaunus cikliskos peptīdus, būtu noderīgi attīstīt BURP domēna proteīnus par enzīmiem, kas spējīgi efektīvi ciklizēt daudzveidīgus lineāro peptīdu substrātus, ne tikai savus dabīgos substrātus. BURP domēna proteīnus varētu transformēt par sintētiskās bioloģijas rīkiem ar plašāku ciklizējamo substrātu klāstu (gan ar daudzveidīgām substrāta aminoskābju sekvencēm, gan substrātu izmēriem), izmantojot virzītās evolūcijas (angļu val. *directed evolution*) metodes. Šim mērķim varētu veikt mutēto proteīnu ekspresiju *SHuffle* šūnās, kas ļautu skrīnēt proteīnus, balstoties uz to ciklizēšanas aktivitāti.

## SECINĀJUMI

1. Beta-laktamāzes iezīmei bija neoptimāla linkera sekvenca, kas veicināja iezīmes strauju proteolīzi. BURP domēna proteīnu optimālā šķīdību uzlabojošā iezīme, kas uzrāda arī augstu ekspresijas līmeni, ir MBP.
2. Dažādu garumu BURP proteīnu konstruktiem bija izteiktas šķīdības atšķirības pat ar šķīdību uzlabojošām iezīmēm.
3. BURP proteīnu *in vitro* rekonstitūcijai nepieciešama refoldēšana, lai izveidotos pareizas disulfīdsaites. BURP proteīnu ķīmiskai refoldēšanai piemērotāka metode ir refoldēšana ar pakāpenisku dialīzi, nevis ar atšķaidīšanu.
4. *E. coli SHuffle* šūnas ir piemērotas, lai ekspresētu foldētu AhyBURP2. Veicot autoindukciju, ekspresijas iznākumi ir augstāki nekā ar IPTG indukciju.
5. Bezšūnu sintēzē nepietiek tikai ar ķīmisku reducēšanas-oksidēšanas apstākļu modificēšanu, lai producētu foldētu BURP proteīnu.
6. Lineāru peptīdu producēšanai piemērotāka ir ķīmiska sintēze, nevis rekombinanta producēšana.
7. Izdevās veikt *in vitro* rekonstitūciju aktīvai AhyBURP2 ciklāzei. AhyBURP2 stabilizē augsta sāls koncentrācija un karboksilāti.
8. Testētajos apstākļos AhyBURP2 ciklizēšanas efektivitāte bija zema, kas, balstoties uz jaunāko literatūru, varētu būt reducējošā aģenta trūkuma dēļ.

## PATEICĪBAS

Autore izsaka lielu pateicību darba vadītājam Teodoram Panteļejevam par šīs pētījuma tēmas ierosināšanu, kā arī par vērtīgiem padomiem un atbalstu darba izstrādes un rakstīšanas procesā. Paldies OSI SZDL vadītājam Kristapam Jaudzemam par iespēju izstrādāt darba eksperimentālo daļu viņa vadītajā laboratorijā. Liela pateicība arī kolēģei Laurai Drunkai, ar kuru kopā autore strādāja pie šī projekta starptautiskā konkursa “iGEM 2023” ietvaros! Kā arī autore izsaka pateicību kolēģei Kristīnei Kitokai par bezšūnu sintēzes reaģentiem un apmācību reakciju uzstādīšanā.

Šī darba rezultāti tika prezentēti stenda referāta formā ar nosaukumu “*Plant autocatalytic peptide cyclases as tools for customized cyclic peptide production*” starptautiskajā konferencē “*Recent advances in structural biology and drug discovery*” konferencē Rīgā 2023. gada 18.-19. septembrī. Tāpat rezultāti tika prezentēti starptautiskā sintētiskās bioloģijas konkursa “iGEM 2023” ietvaros *Grand Jamboree* Parīzē 2023. gada 2. – 5. novembrī, kur par AhyBURP2 konstrukta raksturošanu ieguva nomināciju kategorijā “*Best Basic Part*”.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

- Alonso-Moraga, Angeles et al. 1987. "Glutathione Status and Sensitivity to GSH-Reacting Compounds of Escherichia Coli Strains Deficient in Glutathione Metabolism and/or Catalase Activity." *Molecular and Cellular Biochemistry* 73(1): 61–68.
- Arnison, Paul G. et al. 2013. "Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptide Natural Products: Overview and Recommendations for a Universal Nomenclature." *Natural Product Reports* 30(1): 108–60.
- Bass, Rosemary, Lloyd W. Ruddock, Peter Klappa, and Robert B. Freedman. 2004. "A Major Fraction of Endoplasmic Reticulum-Located Glutathione Is Present as Mixed Disulfides with Protein." *Journal of Biological Chemistry* 279(7): 5257–62.
- Bechtler, Clément, and Christina Lamers. 2021. "Macrocyclization Strategies for Cyclic Peptides and Peptidomimetics." *RSC Medicinal Chemistry* 12(8): 1325–51.
- Blin, Kai et al. 2017. "The AntiSMASH Database, a Comprehensive Database of Microbial Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters." *Nucleic Acids Research* 45(D1): D555–59.
- Borel, J. F., Camille Feurer, H. U. Gubler, and H. Stähelin. 1994. "Biological Effects of Cyclosporin A: A New Antilymphocytic Agent." *Agents and Actions* 43(3–4): 179–86.
- Chekan, Jonathan R., Lisa S. Mydy, Michael A. Pasquale, and Roland D. Kersten. 2024. "Plant Peptides - Redefining an Area of Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptides." *Natural Product Reports*.
- Chigumba, Desnor N. et al. 2022. "Discovery and Biosynthesis of Cyclic Plant Peptides via Autocatalytic Cyclases." *Nature Chemical Biology* 18(1): 18–28.
- Dang, Bobo et al. 2019. "SNAC-Tag for Sequence-Specific Chemical Protein Cleavage." *Nature Methods* 16(4): 319–22. <http://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0357-3>.
- Do, Truc, and A. James Link. 2023. "Protein Engineering in Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptides (RiPPs)." *Biochemistry* 62(2): 201–9.
- Eslami, Sara M., and Wilfred A. van der Donk. 2024. "Proteases Involved in Leader Peptide Removal during RiPP Biosynthesis." *ACS Bio and Med Chem Au* 4(1): 20–36.

- Faulkner, Melinda J. et al. 2008. "Functional Plasticity of a Peroxidase Allows Evolution of Diverse Disulfide-Reducing Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(18): 6735–40.
- Garenne, David et al. 2021. "Cell-Free Gene Expression." *Nature Reviews Methods Primers* 1(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s43586-021-00046-x>.
- Georgiou, George, and Pascal Valax. 1999. "Isolating Inclusion Bodies from Bacteria." *Methods in Enzymology* 309(1975): 48–58.
- Gibson, Daniel G. et al. 2009. "Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases." *Nature Methods* 6(5): 343–45.
- GP, Smith. 1985. "Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface." *Science* 228(4705): 1315–1317.
- Hansen, Paul R, and Alberto Oddo. 2015. "Capítulo 05: Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis." *Methods in Molecular Biology* 1348.
- Hattori, J., K. A. Boutilier, M. M. Van Lookeren Campagne, and B. L. Miki. 1998. "A Conserved BURP Domain Defines a Novel Group of Plant Proteins with Unusual Primary Structures." *Molecular and General Genetics* 259(4): 424–28.
- Heinis, Christian, Trevor Rutherford, Stephan Freund, and Greg Winter. 2009. "Phage-Encoded Combinatorial Chemical Libraries Based on Bicyclic Peptides." *Nature Chemical Biology* 5(7): 502–7.
- Hoover, David M., and Jacek Lubkowski. 2002. "DNAWorks: An Automated Method for Designing Oligonucleotides for PCR-Based Gene Synthesis." *Nucleic acids research* 30(10): 1–7.
- Hudson, Graham A. et al. 2015. "In Vitro Biosynthesis of the Core Scaffold of the Thiopeptide Thiomuracin." *Journal of the American Chemical Society* 137(51): 16012–15.
- Hwang, Christopher, Anthony J. Sinskey, and Harvey F. Lodish. 1992. "Oxidized Redox State of Glutathione in the Endoplasmic Reticulum." *Science* 257(5076): 1496–1502.
- Ji, Xinjian, Alexander L. Nielsen, and Christian Heinis. 2024. "Cyclic Peptides for Drug Development." *Angewandte Chemie - International Edition* 63(3).

- Jia, Xinying et al. 2023. "Self-Cyclisation as a General and Efficient Platform for Peptide and Protein Macrocyclisation." *Communications Chemistry* 6(1): 1–10.
- Josephson, Kristopher, Alonso Ricardo, and Jack W. Szostak. 2014. "MRNA Display: From Basic Principles to Macrocycle Drug Discovery." *Drug Discovery Today* 19(4): 388–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.10.011>.
- Kersten, Roland D., and Jing Ke Weng. 2018. "Gene-Guided Discovery and Engineering of Branched Cyclic Peptides in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(46): E10961–69.
- Khatri, Bhavesh, Venkateswara Rao Nuthakki, and Jayanta Chatterjee. 2019. "Strategies to Enhance Metabolic Stabilities." *Methods in Molecular Biology* 2001: 17–40.
- Lacerna, Noel, Ying Cong, and Eric W. Schmidt. 2024. "An Autocatalytic Peptide Cyclase Improves Fidelity and Yield of Circular Peptides In Vivo and In Vitro." *ACS Synthetic Biology* 13(1): 394–401.
- Lebendiker, Mario, and Tsafi Danieli. 2014. "Production of Prone-to-Aggregate Proteins." *FEBS Letters* 588(2): 236–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.044>.
- Lee, Yi Yuan et al. 2023. "HypoRiPPAtlas as an Atlas of Hypothetical Natural Products for Mass Spectrometry Database Search." *Nature Communications* 14(1).
- Li, Jianan et al. 2023. "CycPeptMPDB: A Comprehensive Database of Membrane Permeability of Cyclic Peptides." *Journal of Chemical Information and Modeling* 63(7): 2240–50.
- Li, Yuan et al. 2016. "Identification and Expression Analysis of BURP Domain-Containing Genes in *Medicago truncatula*." *Frontiers in Plant Science* 7(APR2016): 1–16.
- Lima, Stella T. et al. 2023. "A Widely Distributed Biosynthetic Cassette Is Responsible for Diverse Plant Side Chain Cross-Linked Cyclopeptides\*\*." *Angewandte Chemie - International Edition* 62(7).
- Liu, Huanhuan et al. 2014. "Overexpression of Stress-Inducible OsBURP16, the  $\beta$  Subunit of Polygalacturonase 1, Decreases Pectin Content and Cell Adhesion and Increases Abiotic Stress Sensitivity in Rice." *Plant, Cell and Environment* 37(5): 1144–58.
- Liu, Wan Qiu et al. 2024. "Cell-Free Biosynthesis and Engineering of Ribosomally

- Synthesized Lanthipeptides.” *Nature Communications* 15(1).
- Lobstein, Julie et al. 2016. “Erratum to: SHuffle, a Novel Escherichia Coli Protein Expression Strain Capable of Correctly Folding Disulfide Bonded Proteins in Its Cytoplasm.” *Microbial Cell Factories* 15(1): 1–16.
- Matsuda, Takayoshi, Satoru Watanabe, and Takanori Kigawa. 2013. “Cell-Free Synthesis System Suitable for Disulfide-Containing Proteins.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431(2): 296–301.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.107>.
- Millward, Steven W., Terry T. Takahashi, and Richard W. Roberts. 2005. “A General Route for Post-Translational Cyclization of mRNA Display Libraries.” *Journal of the American Chemical Society* 127(41): 14142–43.
- Mydy, Lisa S. et al. 2024. “An Intramolecular Macrocyclase in Plant Ribosomal Peptide Biosynthesis.” *Nature Chemical Biology* 20(4): 530–40.
- Nelson, Christopher A., Chung A. Lee, and Daved H. Fremont. 2014. “Oxidative Refolding from Inclusion Bodies.” *Methods in Molecular Biology* 1140: 145–57.
- Park, Jiyoung, Yong Cui, and Byung Ho Kang. 2015. “AtPGL3 Is an Arabidopsis BURP Domain Protein That Is Localized to the Cell Wall and Promotes Cell Enlargement.” *Frontiers in Plant Science* 6(June).
- Pfeiffer, Isabel P.M., Maria Paula Schröder, and Silja Mordhorst. 2024. “Opportunities and Challenges of RiPP-Based Therapeutics.” *Natural Product Reports*.
- Punna, Sreenivas, Jane Kuzelka, Qian Wang, and M. G. Finn. 2005. “Head-to-Tail Peptide Cyclodimerization by Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition.” *Angewandte Chemie - International Edition* 44(15): 2215–20.
- Rodríguez, Vida. 2022. “Insights into Post-Translational Modification Enzymes from RiPPs: A Toolkit for Applications in Peptide Synthesis.” *Biotechnology Advances* 56(March 2021): 107908. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107908>.
- Rubin, Samuel, and Nir Qvit. 2016. “Cyclic Peptides for Protein–Protein Interaction Targets: Applications to Human Disease.” *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 26(3): 199–221.

- Sardar, Debosmita, Zhenjian Lin, and Eric W. Schmidt. 2015. "Modularity of RiPP Enzymes Enables Designed Synthesis of Decorated Peptides." *Chemistry and Biology* 22(7): 907–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.06.014>.
- Van Son, Le et al. 2009. "The BURP Domain Protein AtUSPL1 of Arabidopsis Thaliana Is Destined to the Protein Storage Vacuoles and Overexpression of the Cognate Gene Distorts Seed Development." *Plant Molecular Biology* 71(4–5): 319–29.
- Studier, F. William. 2005. "Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures." *Protein expression and purification* 41(1): 207–34.
- Sun, Huiru et al. 2019. "Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the BURP Domain-Containing Genes in Gossypium Hirsutum." *BMC Genomics* 20(1): 1–19.
- Tavassoli, Ali, and Stephen J. Benkovic. 2007. "Split-Intein Mediated Circular Ligation Used in the Synthesis of Cyclic Peptide Libraries in E. Coli." *Nature Protocols* 2(5): 1126–33.
- Wang, Mingxun et al. 2016. "Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking." *Nature Biotechnology* 34(8): 828–37.
- Wang, Wenzhu, Zhong Zhang, and Xingang Li. 2022. "Identification and Expression Analysis of BURP Domain-Containing Genes in Jujube and Their Involvement in Low Temperature and Drought Response." *BMC Genomics* 23(1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08907-9>.
- Wang, Yuanze et al. 2017. "A Systematic Protein Refolding Screen Method Using the DGR Approach Reveals That Time and Secondary TSA Are Essential Variables." *Scientific Reports* 7(1): 1–10.
- White, Christopher J., and Andrei K. Yudin. 2011. "Contemporary Strategies for Peptide Macrocyclization." *Nature Chemistry* 3(7): 509–24. <http://dx.doi.org/10.1038/nchem.1062>.
- Whitty, Adrian et al. 2016. "Quantifying the Chameleonic Properties of Macrocycles and Other High-Molecular-Weight Drugs." *Drug Discovery Today* 21(5): 712–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.005>.
- Young, Travis S., Pieter C. Dorrestein, and Christopher T. Walsh. 2012. "Codon

Randomization for Rapid Exploration of Chemical Space in Thiopeptide Antibiotic Variants.” *Chemistry and Biology* 19(12): 1600–1610.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.10.013>.

Zorzi, Alessandro, Kaycie Deyle, and Christian Heinis. 2017. “Cyclic Peptide Therapeutics: Past, Present and Future.” *Current Opinion in Chemical Biology* 38: 24–29.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.02.006>.

## **PIELIKUMI**

1. pielikums. BURP konstruktū nukleotīdu sekvences.

Konstrukta nosaukums	Nukleotīdu sekvence
<i>CcaBURP2-[1xQLLVW]</i>	CAATCCGCCCTCACTACAACCGGCTTTACCAGCTGAGCTTTACTGGAA AAGTATGTTGCCGAACACGACTATGCCCAAGGCCATTAAGGATTTGCTT TCGGCTGAAACATGGGTAAGACAATCTGCGACGATTTAAACTCCCAG TACTGGTTTGGCGTCATTGCGCCACCGAGACCCACTCACGCGACGAT AGCGGGAAATTCTGTTCTTATCGGAAAATGATTTGCACCCTGGTAAG AAGCTGAAGATGTTGTTACCAAGAGTCCTTACCCACCACGTTGATT CCCCATGAAGTCGCGGATACCATTCCCTTTAGTCTTAAAAAGGTCCCCG AAATCCTTAAAATGTTTAGTATCGAGCCAGAATCTAAAAAAGCGAAAA TTATCAAGGGTGTGATCCACCCTGCCAAGAGCCACCCACCAAAGGC GAGGAAAAACACTGCGCCACATCTTTGAGTCTATGGTAGATTATGCC ACATCAAAGTTGGGGAAAAATGTCAAGGCCTATTCCACGGAGGTCGA GAAAGAAACAACTGCAAACCTTACACAATTGCCCCAGGCGTTAAGA AGATTCAGACGAGGTTATGGCGTGCCATCAAACCTATTATCCCTACGT AGTATTCATTGTCATCAGGTTGGTGGATTGTCTCGTGCTATTTTCGTC CTTTGGAGGGGTCGGATGGCACGCGTGTCAAGGCCATCGTCGATATGC ACAGTGACACCAGCGATTGGGATGTGGATCACTTGGCGTTCCGCACCC TGAAGATCGATCCGGGAACAGCTTCTGTATGTCACCTTCCCCAGCGG ACAATGTGGTTTGGATTCCACATAAACTACTTAACTACTCTGGCGTCG ATGAGGGA
<i>AhyBURP</i>	CAATCCGCCCTCACTACAACCGCGTGAGCTGATCCCGGACGAAGATTA TTGGCAAGCGGTGTGGCCGAACACCCGATTCCGAACACCCTGAAGG AGCTGCTGAAACCGGGTGCAGCAGGACAGCGAAATCAACGATGTGCCG ATGAAAGTTGACGATAACCAATACCCGAAGACCTTCTTTTTTCGAGCAC GAACTGTTTCCGGGCAAGAAAATGAACATGAAGTTCAGCAAGATCCC GTTCGCGCAGCCGTACGGTGTGTATACCTGGGGCAAGGTTATTAAGA CCTGGAGAAAGAGAGCTTCACCTTCGAAGATGCGTGCCTGCGTGAGG CGGGCAAGGGCGAAGACAAATACTGCGCGAAGAGCCTGAGCACCCCTG ATCGGTTTTCGCGTTAGCAAGCTGGGCAAAAACATTACGCCGTTACAGC AGCAGCTTCTGGACAAACAAACCGATTATAACATCGAGGGTGTGCAC AACCTGGGCGATAAGGCGGTTATGTGCCACCGTCTGAACTTTCAGAGC ACCGTTTTCTACTGCCACGAAATCCACGGCACCCCGGTATATGGTGC CGATGGTTGCGGCGGATGGCCGTCGTACCCAAGCGCTGGCGGTGTGCC ACCACGATAACCAGCGGTATGAACGCGGAAGTGCTGTACGAAATGCTGA AGATTAACCGGGCACCGAGACCGGTGCCACTTCTGGGCAACAAG GCGGTGATGTGGGTTCCGAACATGGCGGTGAACAGCGTTTATAACAAC GCGAACATGGCGAGCTAACTACTCTGGCGTCGATGAGGGA
<i>SkrBURP-[1xVLFYPSY]</i>	CAATCCGCCCTCACTACAACCGATTGAGCGTGTTCATAGTGCCAAGGA AGGCGTTTCTGAAGCAATGAATGATCAGGGGCATCCTACCATTGCCAA CAAAGCCGTTCTGCATCAGTCGAGGATCCAAGCCAAGCTGATGCCGA TAACGTTTTATTCTATCCGAGCTATGCTGCCAGACCTAAGGCTCCAAGT ACCATGGATCACGATGCTACACACAATGCAGCACAAAACATGCATCAC CAGAAAGGAGCACTCCTCTTCTCAGAATGAATACACTAAAGGTTGGT GGTGAAGTAGTTATACCCTCACTAGCAAGCCATGCTCTTGGTGGACGA AAGCTGATGACTCCAAGACTAGAGCCATGCTTGGAAAGCATGGAATTG CCTCGGCTTCTCTCAGTTTTGAAGATTCTCTAGACTCTACACTCGCTC GCAAAGCAAGACCAACTTAGGGAACTGCCGATCTCCACCTTTACAA GGAGAGAAAAAGGCTTGGCTCTCCTCAATTAGAAGCATGACAAACTTT GCACGTTCCGTCTTGGAAAGACAAGAAGCCCCTCGAACATCTTAATCCC TCCCGTCCGGTGTCTTCTCCAGAGCATTTTAAGATAATGGACGTGAAA GTGGTCACTGAGAACTCCGTGGTCACATGTCATCCTATGGTGTCCCCT ATGCTCTTACATGTGCCACTTCGTTCCCAAGAGTGTCCCACCAAAGT CACCTTGCAGGACGATCACGACAAACTTGTGTAGTACCTGTGATGTG CCATATGGACACGTCTGAGTTCGACCCCTCCACCTCTCGTTCAAATC CTTAACACAAAACCTGGGGAAGCAGAAATGTGTCACTGGATGCCCAA CTCCCATATCATGTGGTACACTTCGGACGGAAAGACGCGCGATGTTCTT TGACTACTCTGGCGTCGATGAGGGA

## 2. pielikums. BURP klonēšanas praimeru.

<b>Klonējama BURP konstrukts</b>	<b>Praimeru sekvences</b>
CcaBURP1	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGGCGCTTTACCAGCTGAGCTTTACTGGA R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAAGTAGTTTTATGTGGAATCCAAACCACA
CcaBURP2	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGGTGATTTAAACTCCCAGTTACTGGTTTGGC
CcaBURP3	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGGCGACGATAGCGGGAAATTCCTGT
AhyBURP1	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGGCCGTGAGCTGATCCCGGAC R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCTCGCCATGTTTCGCGT
AhyBURP2	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGGCGACGATACCCAATACCCGAAGACC
SkrBURP1	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGGCATTGAGCGTGTTTCATAGTGCCA R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAAAGAACATCGCGCGTCTTTC
SkrBURP2	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGGCGCCGATAACGTTTTATTCTATCCGAG
SkrBURP3	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGGCCACCAGAAAGGAGCACTCCTC

3. pielikums. Peptīdu klonēšanas praimeru.

<b>Peptīda izcelsmes BURP</b>	<b>Klonējamais peptīds</b>	<b>Praimeru sekvences</b>
CcaBURP	QLLVW	F:GAAAACCTGTACTTCCAGCAGCTGCTGGT R:CACTATAGAATACTCAAGCTTACCACACCAGCAGCTGCTGGAA
	LNSQLLVWR	F:GAAAACCTGTACTTCCAGCTGAACAGC R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCGCCACACCAGCAGCTGGCTGTTTCAGCTGGAAGTACA
	LNSQLLTWR	F:GAAAACCTGTACTTCCAGCTGAACAGC R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCGCCAGGTCAGCAGCTGGCTGTTTCAGCTGGAAGTACA
	LNSQLLAVWR	F:GAAAACCTGTACTTCCAGCTGAACAGCCAG R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCGCCACACCCGCCAGCAGCTGGCTGTTTCAGCTGGAAG
	NSQLLANVWR	F:GAAAACCTGTACTTCCAGAACAGCCAGCT R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCGCCACACGTTCCGCCAGCAGCTGGCTGTTCTGGAAGT
SkrBURP	ADNVLFPSYAAR	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGCCGATAACGTGCTGT R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCGCGCCGCATAGCTCGGAAACAGCACGTTATCCGCCT
	ADNVLFYPSYAAR	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGCCGATAACGTGCTGTTTTATCC R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCGCGCCGCATAGCTCGGATAAAACAGCACGTTATCCG
	ADNVLFYPASYAAR	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGCCGATAACGTGCTGTTTTATCCGG R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCGCGCCGCATAGCTCGCCGGATAAAACAGCACGTTAT
	ADNVLAFYAPSYAAR	F:GAAAACCTGTACTTCCAGGCCGATAACGTGCTGGCGTTTATATGC R:CACTATAGAATACTCAAGCTTAGCGCGCCGCATAGCTCGGCGCATAAAACGCCAGCACG
AhyBURP	QPYGVYTW	F:GAAAACCTGTACTTCCAGCAGCCG R:CACTATAGAATACTCAAGCTTACCAGGTATACACGCCATACGGCTGCTGGAAGTACAG
	IPFAQPYGVYTWGK	F:GAAAACCTGTACTTCCAGATTCCGTTTGCGCAGCCGTAT R:CACTATAGAATACTCAAGCTTATTTGCCCCAGGTATACACGCCATACGGCTGCGCAAACG
	IPFAQPYGVYPWGK	F:GAAAACCTGTACTTCCAGATTCCGTTTGCGCAGCCGTAT R:CACTATAGAATACTCAAGCTTATTTGCCCCACGGATACACGCCATACGGCTGCGCAAACG

## 4. pielikums. CcaBURP2 bezšūnu sintēzes reakciju sastāvs.

Aminoskābju mikstūra	Tilpums, $\mu\text{L}$
50 mM ūdenī šķīstošās aa (15 mM)	236.25
50 mM skābē šķīstošās aa (15 mM)	236.25
50 mM bāziskā vidē šķīstošās aa (15 mM)	236.25
d. H <sub>2</sub> O	78.75
<b>Kopā, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>787.5</b>

10 x reakcijas mikstūra	Tilpums, $\mu\text{L}$
25 mM katrs rNTP (0.8 mM)	386.40
2.0 M HEPES (55 mM)	332.06
100 mM ATP (1.2 mM)	144.90
10 mM Folīnskābe (68 $\mu\text{M}$ )	82.11
100 mM cAMP (0.64 mM)	77.28
500 mM DTT (1.7 mM)	41.06
9.2 M NH <sub>4</sub> OAc (27.5 mM)	36.09
d. H <sub>2</sub> O	107.60
<b>Kopā (izmanto iekšējā un ārējā buferšķīdumā)</b>	<b>1207.50</b>

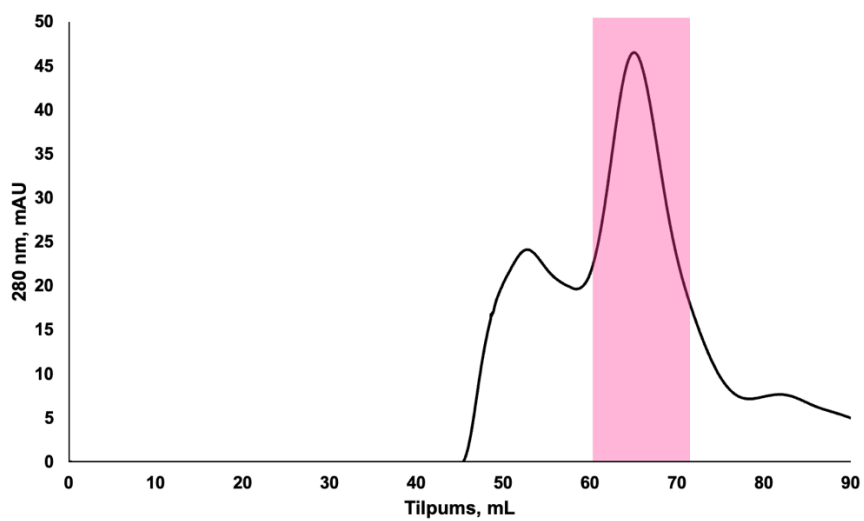
<i>Master mix</i>	Iekšējais	Ārējais
10 x reakcijas mikstūra	110.00	1000.00
1M kreatīna fosfāts (80 mM)	88.00	800.00
Aminoskābju mikstūra	73.33	666.67
4 M KGlu (208 mM)	57.20	520.00
1 M Mg(OAc) <sub>2</sub> (15 mM iekšējā; 19.3 mM ārējā)	16.50	193.00
17.5 mg/ml tRNS (0.175 mg/ml)	11.00	0.00
10 mg/ml kreatīna kināze (250 $\mu\text{g/ml}$ )	27.50	0.00
<b>Kopējais</b>	<b>383.53</b>	<b>3179.67</b>
		Ārējo buferšķīdumu atšķaida līdz 10 mL
		Ārējā buferšķīduma pH notitrē līdz pH 7.5

Vienai reakcijai	Tilpums, $\mu\text{L}$
<i>Master mix</i>	348.7
S30 ekstrakts	250.00
DNA (480 ng/ $\mu\text{L}$ )	20.83
d. H <sub>2</sub> O	380.50
<b>Kopā</b>	<b>1000</b>

5. pielikums. Proteīnu un peptīdu attīrīšanas buferšķīdumi.

<b>Buferšķīduma nosaukums</b>	<b>Sastāvs</b>
<b>BURP proteīnu attīrīšana bez refoldēšanas</b>	
Ni afinitātes hrom. buferšķīdums A	50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM imidazols, 10 mM beta-merkaptotetanol, 10% glicerīns
Ni afinitātes hrom. buferšķīdums B	50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazols, 10 mM beta-merkaptotetanol, 10% glicerīns
TEV šķelšanas buferšķīdums	50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerīns
Gelfiltrācijas buferšķīdums	20 mM Na citrāts pH 7.0, 300 mM NaCl, 10 mM, 10% glicerīns
<b>BURP proteīnu refoldēšana ar strauju atšķaidīšanu</b>	
Refoldēšanas Ni afinitātes hrom. buferšķīdums A	50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazols, 8 M urīnviela
Refoldēšanas Ni afinitātes hrom. buferšķīdums B	50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazols, 8 M urīnviela
Refoldēšanas buferšķīdums	50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.5 M L-arginīns, 3 mM reducēts glutatons, 0.3 mM oksidēts glutatons, 10% glicerīns
Jonapmaiņas hrom. buferšķīdums A	20 mM Tris pH 8.0, 10 mM NaCl
Jonapmaiņas hrom. buferšķīdums B	20 mM Tris pH 8.0, 1.0 M NaCl
<b>BURP proteīnu refoldēšana ar pakāpenisku dialīzi</b>	
Refoldēšanas Ni afinitātes hrom. buferšķīdums A	50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazols, 8 M urīnviela
Refoldēšanas Ni afinitātes hrom. buferšķīdums B	50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazols, 8 M urīnviela
Refoldēšanas dialīzes buferšķīdums C	50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM beta-merkaptotetanol, 4 M urīnviela
Refoldēšanas dialīzes buferšķīdums D	50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM beta-merkaptotetanol, 2 M urīnviela
Refoldēšanas dialīzes buferšķīdums E	50 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM beta-merkaptotetanol
Gelfiltrācijas buferšķīdums	20 mM Na citrāts pH 7.0, 300 mM NaCl
<b>Peptīdu attīrīšana</b>	
Refoldēšanas Ni afinitātes hrom. buferšķīdums A	50 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazols, 8 M urīnviela
Refoldēšanas Ni afinitātes hrom. buferšķīdums B	50 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 500 mM imidazols, 8 M urīnviela
Refoldēšanas dialīzes buferšķīdums	50 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM DTT
Gelfiltrācijas buferšķīdums	20 mM Na citrāts pH 7.0, 300 mM NaCl

6. pielikums. *E. coli* SHuffle AhyBURP2 proteīna gelfiltrācijas hromatogramma.



Dokumentārā lapa

Maģistra darbs „Augu peptīdu ciklāžu rekombinanta iegūšana un *in vitro* rekonstitūcija”  
izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie  
informācijas avoti un LUISā iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai un/vai e-  
studijās iesniegtai darba elektroniskai versijai.

Autore: Anna Līna Bula      *paraksts*      03.06.24

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. Teodors Panteļejevs      *paraksts*      03.06.24

Recenzente: *paraksts* Dr. biol. Ilva Liekniņa

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 03.06.24

Studiju metodiķe: Vīta Brusbārde      *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr.      , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: