

Latvijas Universitāte
Bioloģijas fakultāte
Molekulārās bioloģijas katedra

Bakteriofāga Enc34 replikācijas moduļa proteīnu ekspresija, attīrīšana un raksturošana

Maģistra darbs

Autore: Elīna Černooka

Stud. apl. Nr. ec11022

Darba vadītājs: BMC vad. pētnieks Dr. biol. Andris Kazāks

Recenzents: BMC pētnieks Dr. biol. Kalvis Brangulis

Katedras vadītājs: LU asoc. prof., BMC vad. pētnieks Dr. biol. Kaspars Tārs

Rīga 2016

Saturs

Saīsinājumi	4
Kopsavilkums	5
Summary	6
Ievads	7
1. Literatūras apskats	8
1.1. Bakteriofāgi	8
1.2. Bakteriofāgu dzīves cikli un DNS replikācijas mehānismi	11
1.3. Bakteriofāgu DNS replikācijas proteīni	16
1.4. <i>Enterobacter cancerogenus</i> bakteriofāgs Enc34 un tam radniecīgie fāgi	22
1.5. Bakteriofāgi kā antibakteriāli līdzekļi	25
2. Materiāli un metodes	27
2.1. Materiāli.....	27
2.1.1. Reaģenti	27
2.1.2. Šķīdumi.....	28
2.1.3. Aparatūra	30
2.1.4. Darbā izmantotie <i>E. coli</i> celmi	32
2.1.5. Barotnes	33
2.1.6. Enzīmi un to buferšķīdumi	33
2.1.7. Oligonukleotīdi un matricas DNS	33
2.1.8. Vektori	34
2.1.9. Citi reaktīvi.....	34
2.2. Metodes	35
2.2.1. Oligonukleotīdu kinēšana.....	35
2.2.2. DNS fragmentu amplifikācija ar PCR.....	35
2.2.3. Elektroforēze agarozes gēlā.....	36
2.2.4. PCR fragmenta DNS precipitācija.....	36
2.2.5. Vektora un PCR fragmenta DNS šķelšana ar <i>FastDigest</i> restriktāzēm	36
2.2.6. DNS izdalīšana no agarozes gēla ar GeneJET Gel Extraction kitu	36
2.2.7. DNS ligēšana	37
2.2.8. Plazmīdu transformācija <i>E. coli</i> šūnās.....	37

2.2.9. <i>E. coli</i> šūnu kultivēšana plazmīdu pavairošanai	38
2.2.10. Plazmīdu izdalīšana ar GeneJET Plasmid Miniprep kitu	38
2.2.11. Pozitīvo plazmīdu DNS klonu atlase ar <i>FastDigest</i> restriktāzēm	38
2.2.12. DNS sekvenēšana	39
2.2.13. ssDNS sintēze ar asimetrisko PCR.....	39
2.2.14. Bakteriofāga M13 ssDNS genoma izdalīšana	40
2.2.15. Transformēto <i>E. coli</i> šūnu kultivēšana ekspresijas apstākļos ar “lēno indukciju”	40
2.2.16. <i>E. coli</i> šūnu lizēšana ar ultraskaņu	41
2.2.17. Elektroforēze denaturējošā poliakrilamīda gēlā	41
2.2.18. Proteīnu attīrīšana ar HisTrap FF crude metālafinitātes kolonnu.....	41
2.2.19. Denaturētu proteīnu <i>refoldings</i> uz HisTrap FF crude kolonnas	42
2.2.20. Proteīnu attīrīšana ar MBPTrap HP afinitātes kolonnu	42
2.2.21. Proteīnu atbrīvošana no <i>His-tag</i> vai MBP ar rTEV proteāzi.....	42
2.2.22. Proteīnu attīrīšana ar augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju.....	43
2.2.23. Proteīnu kristalizēšana un rentgenstaru difrakcijas datu iegūšana	43
2.2.24. Proteīnu kristālu difrakcijas datu apstrāde	43
2.2.25. Proteīnu sekvenču bioinformātiska analīze	44
2.2.26. Proteīna-DNS saistības pārbaude ar elektroforētiskās kustības nobīdes analīzi	44
3. Rezultāti un diskusija	45
3.1. Bakteriofāga Enc34 replikācijas moduļa proteīni ar prognozējamām funkcijām	45
3.2. Bakteriofāga Enc34 proteīns ORF3.....	48
3.3. Bakteriofāga Enc34 proteīns ORF4.....	53
3.4. Bakteriofāga Enc34 proteīns ORF5.....	55
3.5. Bakteriofāga Enc34 proteīns ORF6.....	60
3.6. Bakteriofāga Enc34 DNS replikācijas proteīnu izpētes apkopojums	66
Secinājumi	67
Pateicības	68
Literatūras saraksts	69
Pielikumi	78

Saīsinājumi

Å	angstrēms (<i>Ångström</i>)
AEP	arheo-eikariotiskā pr aimāze
ATF	adenozīntrifosfāts
BLASTP	pamata lokālu salīdzinājumu meklēšanas rīks (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>) p roteīnu sekvencēm
bp	b āzu p āris
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
ds	divpavedienu (<i>double-stranded</i>)
FDA	ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
ICTV	Starptautiskā vīrusu taksonomijas komiteja (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozīds
kDa	k ilodaltons
MBP	maltozi saistošais proteīns (<i>maltose-binding protein</i>)
MWCO	molekulārā robežmasa (<i>molecular weight cut-off</i>)
OB <i>fold</i> s	oligonukleotīdu/oligosaharīdu saistīšanas (<i>oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold</i> s)
ORF	atvērtas lasīšanas rāmis (<i>open reading frame</i>)
PAAG	p oliakrilamīda g ēls
PCR	polimerāzes ķēdes reakcija (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	p roteīnu d atu b anka
PEG	p olietilēnglikols
Pfam	proteīnu dzimtu datubāze (<i>database of protein families</i>)
PSI-BLASTP	pozīcijas specifisku atkārtojumu (<i>Position-Specific Iterative</i>) BLASTP
PSSM	pozīcijas specifisku vērtējumu matrica (<i>position-specific scoring matrix</i>)
rmsd	vidējā kvadrātiskā novirze (<i>root-mean-square deviation</i>)
RNS	ribonukleīnskābe
SF	superdzimta (<i>superfamily</i>)
SSB	ssDNS saistošais proteīns (<i>ssDNA-binding protein</i>)
ss	vienpavediena (<i>single-stranded</i>)
Tris	t ris(hidroksimetil)aminometāns
VRR-NUC	vīrusu tipa replikācijas-reparācijas nukleāze (<i>nuclease</i>)

Kopsavilkums

Darbā tika veikta bakteriofāga Enc34 replikācijas moduļa proteīnu sekvenču analīze un hipotētisko proteīnu ORF3, ORF4, ORF5 un ORF6 eksperimentāla izpēte ar mērķi identificēt to funkcijas. Pētījumu rezultātā praimāzei ORF1 tika atklāts iepriekš neidentificēts helikāzes domēns un ORF8 tika re-annotēts kā resolvāze. Rekombinanti producēts ORF4 bija nešķīstošs, savukārt ORF3 un ORF5 – šķīstoši, un to sekmīga attīrīšana ļauj darbu turpināt ar proteīnu kristalizāciju. ORF6 un delēcijas variantam ORF6 Δ 21 tika noteiktas kristālstruktūras, kuru analīze kopā ar *in vitro* eksperimentiem parādīja, ka ORF6 ir ssDNS saistošais proteīns (SSB). Pētījumā pirmoreiz tika atklāta SSB C-terminālā reģiona nozīme ssDNS saistīšanas specifiskuma nodrošināšanai.

Darbs tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā Dr. biol. A. Kazāka vadībā.

Atslēgvārdi: bakteriofāgi, DNS replikācija, rekombinantu proteīnu ekspresija, proteīnu attīrīšana, rentgenstaru kristalogrāfija, ssDNS saistošie proteīni.

Summary

This study reports sequence analysis of bacteriophage Enc34 replication module proteins and experimental work on hypothetical proteins ORF3, ORF4, ORF5 and ORF6 to identify their function. During the study, a previously undetected helicase domain was found in the primase ORF1, and ORF8 was reannotated as resolvase. Recombinant ORF4 was insoluble, while ORF3 and ORF5 were soluble and successfully purified, allowing to proceed with their crystallization. Crystal structures of ORF6 and a deletion variant ORF6 Δ 21 were determined, which together with *in vitro* assays showed that ORF6 is a ssDNA-binding protein (SSB). This is the first study that demonstrates the role of the SSB C-terminal region for ssDNA binding specificity.

The work was conducted at the Latvian Biomedical Research and Study Centre under the supervision of Dr. biol. A. Kazāks.

Keywords: bacteriophages, DNA replication, recombinant protein expression, protein purification, X-ray crystallography, ssDNA-binding proteins.

Ievads

Bakteriofāgi (fāgi) ir visplašāk pārstāvētā vīrusu grupa un izplatītākie pašreplīcējošie “organismi” pasaules biosfērā ar būtisku ietekmi uz baktēriju ekoloģiju un evolūciju. Antibiotiku rezistences gēnu izplatība patogēno baktēriju populācijās rosinājusi interesi par fāgiem kā perspektīviem antibakteriāliem aģentiem medicīnā, lauksaimniecībā un pārtikas rūpniecībā. Bakteriofāgu izpētes neatņemama sastāvdaļa ir genomika: kopš pirmā DNS genoma sekvenču noteikšanas 1977. gadā fāgam Φ X174, turpmāko sekvenēšanas tehnoloģiju attīstības rezultātā pašlaik datubāzēs deponēti gandrīz 7000 fāgu genomu secību. Vairākums fāgu gēnu kodē proteīnus ar nezināmām funkcijām (t. s., hipotētiskos proteīnus), tādējādi bakteriofāgu sekvenču dati ir lielākais, bet vismazāk izpētītais ģenētiskās daudzveidības resurss.

dsDNS fāgu genomu modularitāte un relatīvā vienkāršība padara tos par nozīmīgām modeļsistēmām DNS metabolisma procesu molekulārai izpētei. Dažādiem bakteriofāgiem ir evolucionāri diverģenti DNS genoma replikācijas mehānismi, kas ir labi izpētīti tikai ļoti nelielam skaitam *modelfāgu*. Šī daudzveidīguma iemesls ir plašas variācijas un mozaicisms fāgu replikācijas proteīnu repertuāros. Bakteriofāgu replikācijas elementu sistemātiska izpēte ar genomikas, bioķīmijas un struktūrbioģijas metodēm ļauj prognozēt iepriekš neraksturotu proteīnu funkcijas, papildinot pašreizējos priekšstatus par dažādu bioloģisko sistēmu DNS replikācijas stratēģijām.

Šī pētījuma modeļsistēma ir *Enterobacter cancerogenus* bakteriofāgs Enc34, kas pieder *Siphoviridae* dzimtai un jaunizveidotai *Chi-līdzīgo* fāgu ģintij, kuru DNS replikācijas moduļa kodētie proteīni iepriekš nav pētīti. Darba ietvaros tika veikta Enc34 DNS replikācijas proteīnu sekvenču analīze un hipotētisko proteīnu eksperimentāla izpēte.

Darba mērķis ir identificēt *E. cancerogenus* fāga Enc34 DNS replikācijas proteīnu funkcijas, bagātinot fundamentālās zināšanas par Enc34 fāga replikācijas moduli, kā arī tam radniecīgo *Chi*- un *Nazgul-līdzīgo* fāgu replikācijas proteīnu homoloģiem.

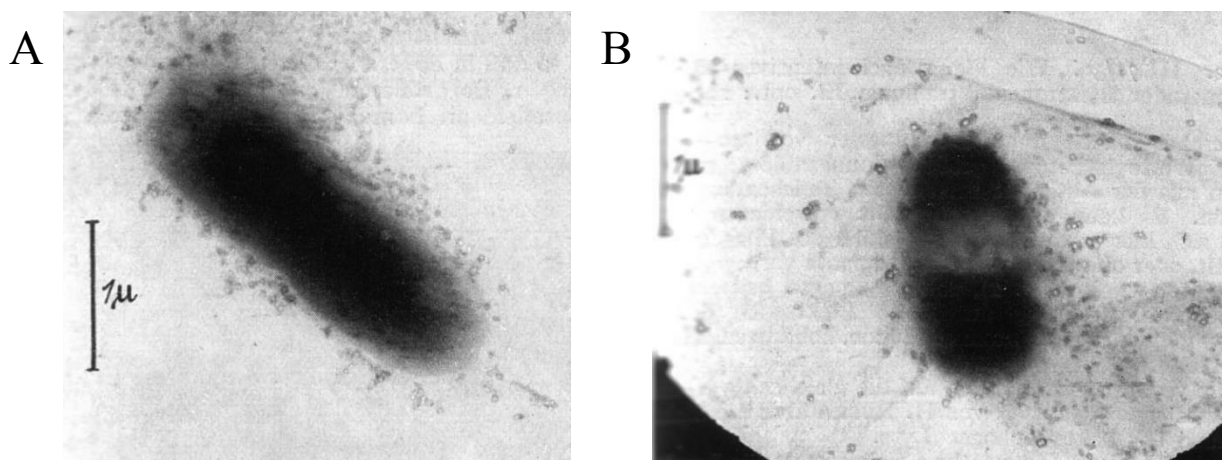
Darba uzdevumi:

- analizēt visu Enc34 replikācijas proteīnu sekvenču ar salīdzinošās proteomikas algoritmiem BLASTP, PSI-BLAST un HHpred;
- konstruēt plazmīdas, kas kodē Enc34 hipotētiskos proteīnus;
- veikt mērķa proteīnu ekspresiju un attīrīšanu;
- iegūt mērķa proteīnu kristālus struktūras noteikšanai.

1. Literatūras apskats

1.1. Bakteriofāgi

Bakteriofāgi jeb fāgi (grieķu val. “*phagein*” – “apēst”, “aprīt”) ir baktērijas inficējoši vīrusi (Snyder, Champness, 2007). Fāgi pirmoreiz identificēti 20. gadsimta sākumā divu zinātnieku savstarpēji neatkarīgos pētījumos (Monk *et al.*, 2010). 1915. gadā angļu bakteriologs Frederiks Tvorts (*Frederick Twort*) atklāj nezināmu antibakteriālu aģentu, kas spēj lizēt *Micrococcus* kolonijas, bet plašāku izpēti neturpina (Twort, 1915). Divus gadus vēlāk franču izcelsmes mikrobiologs Fēlikss d’Erels (*Félix d’Herelle*) izolē *Shigella* šūnas iznīcinošu faktoru – “dizentērijas nūjiņām antagonistisku mikrobu” – un ierosina, ka tas ir baktērijām parazitisks vīruss (d’Herelle, 1917). Derēls ir termina “bakteriofāgs” izveidotājs, kā arī fāgu terapijas pamatlicējs, eksperimentējot ar bakteriofāgu izmantošanu dizentērijas un holēras ārstēšanai (Calendar, 2006) (sīkāk par fāgu terapiju skat. apakšnodaļu 1.5.). Tiešs pierādījums bakteriofāgu eksistencei ir pirmie fāgu elektronmikroskopijas attēli, kas iegūti tikai 1940. gadā. Tie pārliecinoši parāda, ka bakterioloģiskais aģents ir vīrusa daļiņa, nevis baktēriju endogēni lītiskie enzīmi (Ackermann, 2011a).



1. attēls. Pirmie bakteriofāgu elektronmikroskopijas attēli. *Escherichia coli* fāgi adsorbējas uz šūnas virsmas (a) un lizē šūnapvalku (b) (pielāgots no Ruska, 1940).

Figure 1. The first electron micrographs of bacteriophages. *Escherichia coli* phages adsorb on the cell surface (a) and lyse the cell wall (b) (adapted from Ruska, 1940).

1959. gadā elektronmikroskopijā tika ieviesta negatīvās krāsošanas metode, kas revolucionizēja bakteriofāgu u.c. vīrusu izpēti. Negatīvi krāsoto attēlu augstā izšķirtspēja ļāva novērot un raksturot vīrusu daļiņu (virionu) morfoloģiju (Ackermann, 2009). Pēdējā uzskaitē elektronmikroskopiski izpētītajiem prokariotu vīrusiem veikta 2012. gadā. Tajā ziņots, ka morfoloģiski analizēti 6196 bakteriofāgi, turklāt jaunatklāto fāgu pieaugums ir konstants – apmēram 100 bakteriofāgu morfoloģisku raksturojumu gadā (Ackermann, Prangishvili, 2012).

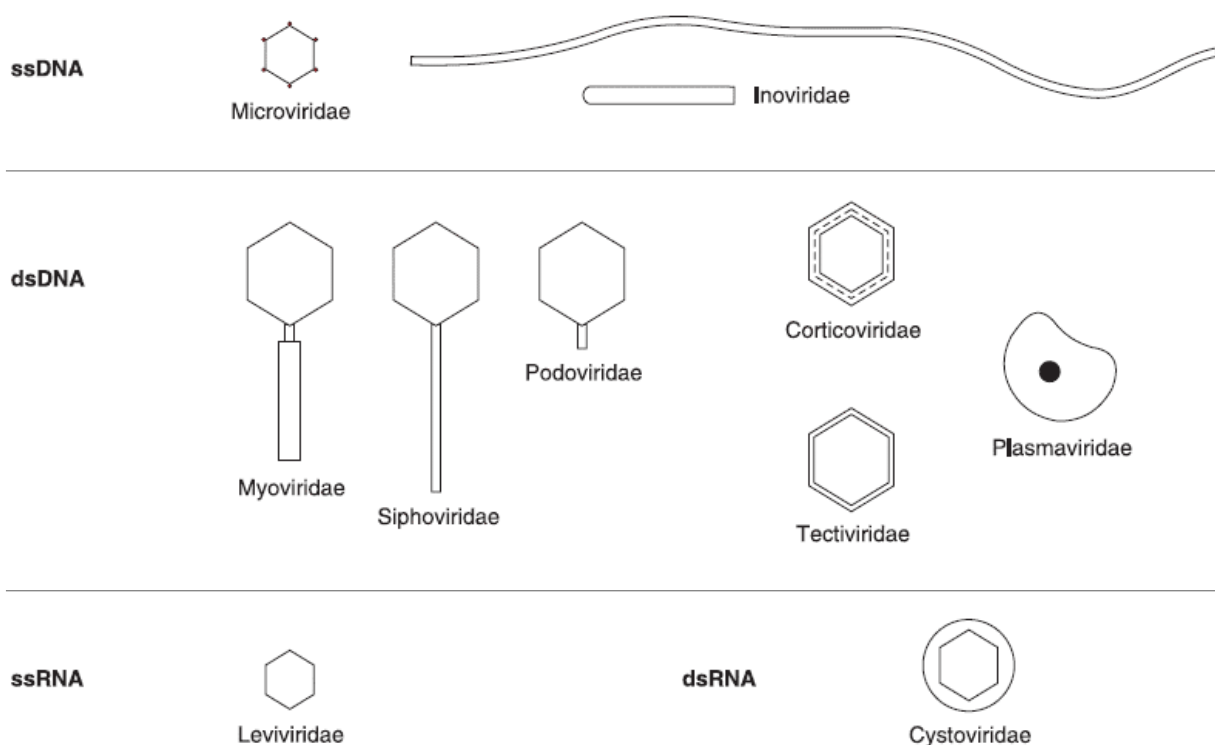
Kā eikariotu, tā prokariotu vīrusu virionu veido: (1) vienpavediena (ss; *single-stranded*) vai divpavedienu (ds; *double-stranded*) DNS vai RNS genoms un (2) proteīnu apvalks – kapsīda, kas aptver un aizsargā ģenētisko materiālu. Daļai vīrusu, t.sk., noteiktiem bakteriofāgiem, kapsīdu apņem no lipīdiem veidots ārējais apvalks (Calendar, 2006). Vīrusa nukleīnskābes īpašības un viriona morfoloģija ir galvenie kritēriji, uz kuriem balstīta bakteriofāgu taksonomiskā klasifikācija. Par vispārpieņemtas vīrusu klasifikācijas sistēmas izstrādi atbildīga Starptautiskā vīrusu taksonomijas komiteja (ICTV; *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (Ackermann, 2011b). Saskaņā ar ICTV ziņojumu 2014. gadā, šobrīd tiek atzīta 1 bakteriofāgu rinda, 11 dzimtas un 92 ģintis (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Bakteriofāgu dzimtu morfoloģiskās un genomiskās īpašības apkopotas 1. tabulā. *Sphaerolipoviridae* un *Tectiviridae* dzimtai pieder ne vien fāgi, bet arī arheobaktērijas inficējoši vīrusi (King *et al.*, 2011).

1. tabula. ICTV bakteriofāgu klasifikācija (pielāgota no King *et al.*, 2011).

Table 1. ICTV classification of bacteriophages (adapted from King *et al.*, 2011).

Rinda	Dzimta	Morfoloģija	Nukleīnskābe	Piemēri
<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>	Bez ārējā apvalka, ar kontraktilu asti	Lineāra dsDNS	T4
	<i>Siphoviridae</i>	Bez ārējā apvalka, ar nekontraktilu garu asti	Lineāra dsDNS	λ
	<i>Podoviridae</i>	Bez ārējā apvalka, ar nekontraktilu īsu asti	Lineāra dsDNS	T7
Nav piešķirta	<i>Corticoviridae</i>	Bez ārējā apvalka, izometriska	Cirkulāra dsDNS	PM2
	<i>Cystoviridae</i>	Ar ārējo apvalku, sfēriska	Segmentēta dsRNS	$\phi 6$
	<i>Inoviridae</i>	Bez ārējā apvalka, pavedienveida	Cirkulāra ssDNS	M13
	<i>Leviviridae</i>	Bez ārējā apvalka, izometriska	Lineāra ssRNS	Q β
	<i>Microviridae</i>	Bez ārējā apvalka, izometriska	Cirkulāra ssDNS	$\phi X174$
	<i>Plasmaviridae</i>	Ar ārējo apvalku, pleomorfa	Cirkulāra dsDNS	MVL2
	<i>Sphaerolipoviridae</i>	Bez ārējā apvalka, izometriska	Cirkulāra dsDNS	IN93
<i>Tectiviridae</i>	Bez ārējā apvalka, izometriska	Lineāra dsDNS	PRD1	

Pārsteidzošam vairumam – 96% – izolēto bakteriofāgu virions sastāv no: (1) ikosaedriskas galvas, kurā ietverta lineāra dsDNS un (2) cauruļveida astes, caur kuru vīrusa genoms tiek ievadīts baktērijas šūnā. Šie fāgi apvienoti *Caudovirales* (latīņu val. “*cauda*” – “aste”) rindā. Uz *Caudovirales* fāgu kopīgu evolucionāro izcelsmi norāda ne vien vīrusa daļiņas specifiskā arhitektūra, bet arī līdzības genoma organizācijā, kā arī proteīnu sekvenču un struktūru homoloģija (Veesler, Cambillau, 2011). Bakteriofāgu astes struktūrām ir trīs morfoloģiskie tipi, kas nosaka fāga piederību konkrētai dzimtai: kontraktīlas astes – *Myoviridae*, garas nekontraktīlas astes – *Siphoviridae* un īsas nekontraktīlas astes – *Podoviridae*. Vairāk nekā puse (~62%) no fāgiem ar astēm pieder *Siphoviridae* dzimtai. Izometriskie (daudzskaldņu), pavedienvēida un pleomorfi bakteriofāgi ir ievērojami retāki, kā arī daudzveidīgāki pēc morfoloģijas un nukleīnskābes veida, tādēļ tos klasificē astoņās mazās filoģenētiski neradnieciskās fāgu dzimtās (2. attēls).



2. attēls. Fāgu dzimtu shematisks attēlojums (nav parādīta *Sphaerolipoviridae* dzimta, kas izveidota un apstiprināta 2015. gadā) (pielāgots no Calendar, 2006).

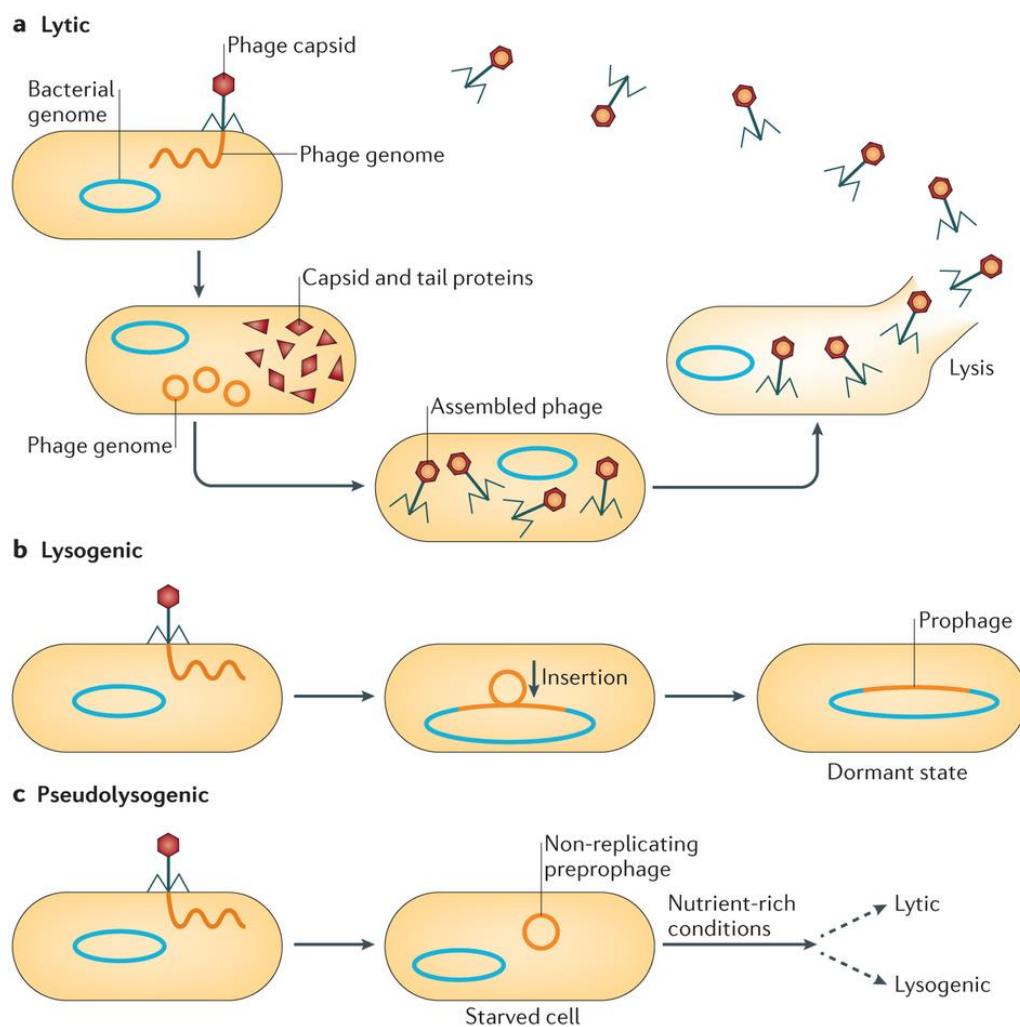
Figure 2. Schematic representation of phage families (*Sphaerolipoviridae* family is not shown, as it was created and approved in 2015) (adapted from Calendar, 2006).

Bakteriofāgi ir visplašāk pārstāvētā vīrusu grupa, un izplatītākie pašreplīcējošie “organismi” uz Zemes. Pašlaik precīzākais fāgu skaita novērtējums ir 10^{31} virionu pasaules biosfērā, kas pārstāv vairākus desmitus miljonu sugu (Keen, 2015). Bakteriofāgi mīt visos baktēriju apdzīvotajos sālsūdens, saldūdens un augsnes biotopos, kā arī dzīvnieku organismos mikrobioma sastāvā. Tie būtiski ietekmē baktēriju populāciju dinamiku un evolūciju (Clokie *et al.*, 2011). Bakteriofāgu izpētes integrāla sastāvdaļa ir genomika. Zīmīgi, ka pirmais sekvenētais DNS genoms ir bakteriofāga Φ X174 sekvenca, ko noteicis Frederiks Sangers ar kolēģiem 1977. gadā. Sekvenēšanas tehnoloģijām attīstoties, fāgu pilnu genomu skaits datubāzēs pieaudzis eksponenciāli, un šobrīd Nacionālā biotehnoloģijas informācijas centra (NCBI; *National Center for Biotechnology Information*) references sekvenču datubāzē deponēti vairāk nekā 6500 fāgu genomi (saskaņā ar RefSeq 72. izlaidumu) (Mihara *et al.*, 2016). Nozīmīgs bakteriofāgu sekvenču avots ir metagenomikas projekti un sekvenētie baktēriju genomi, kas satur profāgu DNS (sīkāk par fāgu dzīves ciklu skat. apakšnodaļu 1.2.). Vairākums fāgu gēnu kodē proteīnus ar nezināmām funkcijām, tādējādi bakteriofāgu sekvenču dati ir lielākais, bet vismazāk izpētītais ģenētiskās daudzveidības resurss. Bakteriofāgu ekoloģiskā nozīmīguma, kā arī terapeitiskā un biotehnoloģiskā pielietojuma apzināšanai nepieciešama fundamentālo zināšanu pilnveidošana ar salīdzinošās un funkcionālās (t. sk., strukturālās) genomikas integrētu pieeju (Hatfull, 2015).

1.2. Bakteriofāgu dzīves cikli un DNS replikācijas mehānismi

Bakteriofāgi ir obligāti iekššūnas parazīti, kas vairojas baktērijās divos atšķirīgos veidos – lītiskajā vai lizogēnajā ceļā (Reece *et al.*, 2014). Abos gadījumos infekcija sākas ar vīrusa adsorbciju uz baktērijas virsmas un fāga genoma ievadīšanu šūnā. Konkrētas sugas bakteriofāgi spēj inficēt šauru saimniekorganismu spektru – vienu vai dažas baktēriju sugas vai atsevišķus celmus vienas sugas ietvaros. Fāgu – baktēriju mijiedarbības specifiskuma iemesls ir viriona (vai tā struktūru, piemēram, astes šķiedru) spēja saistīt tikai noteiktu receptoru uz baktērijas šūnas virsmas, viciņām vai pili (Rakhuba *et al.*, 2010). Lītiskajā ciklā bakteriofāga nukleīnskābe pakļauj baktērijas “metabolisma mašīnēriju” (enzīmus, ribosomas, tRNS) vīrusa proteīnu sintēzei un genoma replikācijai, izmantojot šūnas ATF, aminoskābes un nukleotīdus. Vīrusa komponentu biosintēzei seko virionu pašsavākšanās, fāga enzīmu endolizīnu mediēta baktērijas šūnas sienas sagraušana un jaunizveidoto vīrusa daļiņu atbrīvošana apkārtējā vidē (Reece *et al.*, 2014) (3. attēls, a). Bakteriofāgus, kuri vairojas tikai lītiskajā ceļā, sauc par lītiskiem jeb virulentiem fāgiem.

Lizogēno jeb mēreno bakteriofāgu genoms spēj stabili integrēties baktērijas hromosomā un replicēties tās sastāvā kā latentā fāga forma – profāgs (3. attēls, b). Lizogēno stāvokli uztur integrētā genoma kodēti represorproteīni, kas inhibē pārējo virālo proteīnu transkripciju. Profāgu saturošais baktērijas genoms tiek nodots abām meitšūnām. Bakteriālās DNS bojājumi vides stresa ietekmē ierosina profāga “izšķelšanos” no hromosomas un lītiskā cikla uzsākšanu (Snyder, Champness, 2007). Alternatīvs bakteriofāgu dzīves cikls ir pseidolizogēnija, kurā vīrusa genoms ilgstoši pastāv ekstrahromosomālā stāvoklī kā preprofāgs. Tas notiek barības vielu trūkuma apstākļos, kad šūna nespēj nodrošināt fāga nukleīnskābes replikāciju vai proteīnu sintēzi. Baktērijas šūnas dalīšanās laikā preprofāgu pārmanto tikai viena no meitšūnām. Šūnas badam beidzoties, tiek iniciēts bakteriofāgu lītiskais vai lizogēnais cikls (3. attēls, c).



3. attēls. Fāgu dzīves cikli: lītiskais (a), lizogēnais (b) un pseidolizogēnais (c) (pielāgots no Feiner *et al.*, 2015).

Figure 3. Phage life cycles: lytic (a), lysogenic (b) and pseudolysogenic (c) (adapted from Feiner *et al.*, 2015).

Pretstatā eikariotu un prokariotu genoma replikācijai, kas strikti koordinēta ar šūnas dalīšanos, bakteriofāgu genoma replikācijas vienīgais mērķis ir iegūt lielāko vīrusa nukleīnskābes kopiju skaitu īsākajā laika intervālā (Snyder, Champness, 2007). Šī maģistra darba pētījumu modeļsistēma ir bakteriofāgs Enc34 ar dsDNS genomu (skat. apakšnodaļu 1.4.), tādēļ turpmāk tiks vispārīgi raksturoti tikai DNS fāgu replikācijas principi. Dažādiem bakteriofāgiem ir atšķirīgi un evolucionāri diverģenti DNS genoma replikācijas mehānismi. To daudzveidīgumu nosaka plašas variācijas un mozaīcisms fāgu replikācijas proteīnu repertuāros, turklāt nozīmīga loma ir arī saimniekorganisma kodētajiem replikācijas faktoriem. Bakteriofāgu DNS replikācijas secīgas norises un ar tām saistītie proteīni ir labi izpētīti tikai ļoti nelielam skaitam *modelfāgu*. Šīs zināšanas veido pašreizējo priekšstatu par vismaz pieciem atšķirīgiem fāgu replikācijas mehānismiem pēc DNS sintēzes iniciācijas veida (2. tabula). Tomēr līdzības iniciācijas etapos nekādā ziņā nav universāls rādītājs citu replikācijas soļu identiskumam vai bakteriofāgu un to replikācijas proteīnu tuvai radniecībai. Līdz ar to fāgu replikācijas mehānismu apkopojums ir sarežģīts uzdevums, un to detalizēts raksturojums, savstarpējs salīdzinājums un evolucionāro attiecību analīze ir apjomīgs temats ilgi gaidītai fundamentālai monogrāfijai, kuras tapšana atkarīga no jaunatklāto bakteriofāgu replikācijas elementu sistemātiskas izpētes ar genomikas, bioķīmijas un struktūrbioģijas metodēm (Weigel, Seitz, 2006).

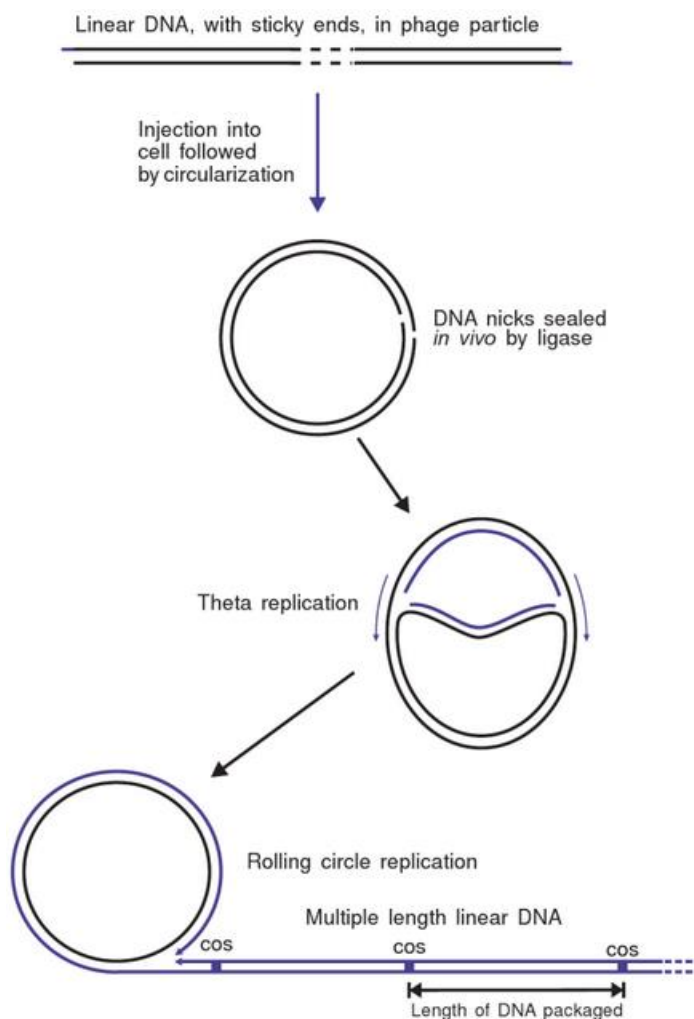
2. tabula. Fāgu DNS replikācijas mehānismi pēc DNS sintēzes iniciācijas veida (saskaņā ar Weigel, Seitz, 2006).

Table 2. Phage DNA replication mechanisms by initiation type (according to Weigel, Seitz, 2006).

Bakteriofāgi	Replikācijas mehānisms
φX174, fd, M13, P2, λ	Iniciācija ar DNS pārrāvumu: “ripojošā apļa” tipa DNS replikācija
λ, SPP1, N15	Iniciācija ar dsDNS denaturāciju: teta (θ) tipa DNS replikācija
φ29	Iniciācija lineāras dsDNS galos: proteīna <i>praimēta</i> DNS replikācija
T4, T7	DNS replikācija, ko iniciē transkripcija
Mu, T4	Rekombinācijas atkarīga DNS replikācija

Divi no vislabāk izpētītajiem bakteriofāgiem ir λ un T7. Abi pieder *Caudovirales* rindai un inficē *E. coli*, tiem ir līdzīgi genoma izmēri (atbilstoši 48,5 un 39,9 kbp), bet principiāli atšķirīgi DNS replikācijas mehānismi (Weigel, Seitz, 2006). Bakteriofāga λ genoms ir lineāra dsDNS ar komplementārām 12 nukleotīdu ssDNS pārkarēm abos 5' galos – *cos* saitēm (*cohesive end sites*). Lītiskās infekcijas agrīnajā fāzē λ genoms tiek ievadīts baktērijas šūnā, tam seko intramolekulāro *cos* saitu saistīšanās un *E. coli* ligāžu mediēta DNS pārrāvumu savienošana, izveidojot kovalenti

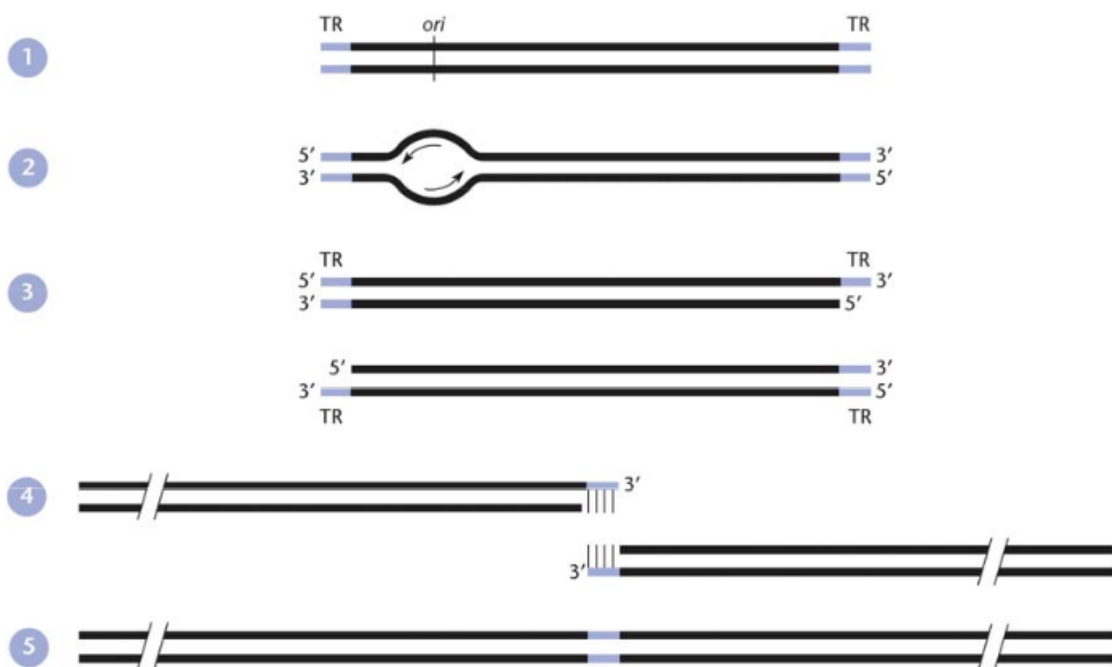
noslēgtu cirkulāru dsDNS molekulu. Fāga replikācijas iniciācijas proteīni saistās pie AT-bagātas *ori* (*origin of replication*) sekvenču, lokāli denaturē dsDNS un ierosina divvirzienu DNS replikāciju. Tās starpprodukts ir teta (θ) formas struktūra. Sekmīga replikācijas cikla rezultāts ir divas identiskas cirkulāras λ DNS molekulas (Lech, Brent, 2001). Vēlīnajā infekcijas fāzē DNS replikācija turpinās pēc “ripojošā apļa” principa, kuru iniciē pārrāvums vienā no dsDNS pavedieniem. Endonukleāze, kas atbildīga par šī pārrāvuma veidošanu, vēl joprojām nav identificēta (Casjens, Hendrix, 2015). Brīvā hidroksilgrupa DNS 3' galā kalpo kā praimeris gara DNS polimēra – konkatemēra (*concatemer*) – sintēzei, kas satur vairākas λ genoma kopijas (4. attēls). Fāga termināze veic konkatemēra šķelšanu pa *cos* saitēm, ģenerējot 5' pārkāres, un nodrošina lineāra monomēriskā genoma iepakojšanu viriona kapsīdā (Catalano, 2005).



4. attēls. Fāga λ DNS replikācija ar teta (θ) un “ripojošā apļa” mehānismu (pielāgots no Dale, Schantz, 2007).

Figure 4. Replication of phage λ DNA in theta (θ) and rolling circle mode (adapted from Dale, Schantz, 2007).

Bakteriofāga λ genoma sintēze atkarīga no saimniekšūnas DNS replikācijas mašīnērijas, savukārt T7 kodē pats savu RNS polimerāzi, DNS polimerāzi, ligāzi, un praimāzi-helikāzi. Turklāt T7 genoms visos replikācijas soļos saglabājas lineārs (Snyder, Champness, 2007). Paralēli T7 nukleīnskābes injekcijai šūnā, *E. coli* RNS polimerāze transkribē T7 agrīnos gēnus, t. sk., T7 RNS polimerāzi. Fāga RNS polimerāze saistās pie promotera *ori* saitā, veic dsDNS denaturāciju un RNS transkripciju. Sasniedzot AT-bagātu rajonu, RNS polimerāzi nomaina T7 DNS polimerāze, kas uzsāk vadošā (*leading*) DNS pavediena sintēzi no RNS transkripta 3' gala. T7 praimāze-helikāze sintezē RNS praimeri uz atpaliekošā (*lagging*) DNS pavediena, iniciējot divvirzienu DNS replikāciju (Acheson, 2011). T7 DNS polimerāze veic DNS sintēzi tikai 5'→3' virzienā un replikācijas uzsākšanai nepieciešams RNS praimeris, līdz ar to DNS molekulas 5' galu sintēze ir nepilnīga un notiek ģenētiskās informācijas zaudēšana. T7 fāga risinājums ir ~160 bp gari tiešie terminālie atkārtojumi, kuru 3' pārkāres spēj hibridizēties un tiek ligētas, veidojot konkatemēru (5. attēls). DNS pakošanas laikā sekvenču specifiska endonukleāze sašķeļ konkatemēru T7 genoma monomēros (Weigel, Seitz, 2006).

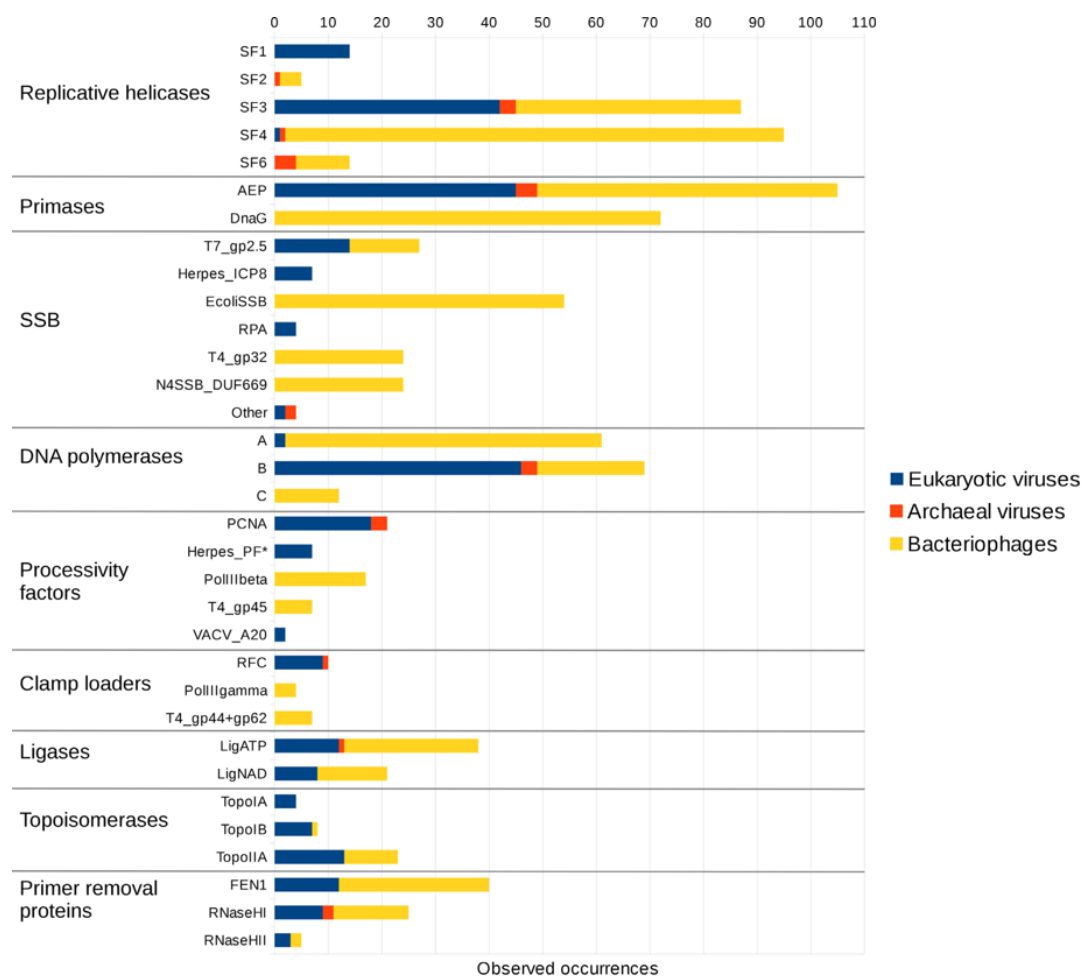


5. attēls. Fāga T7 DNS replikācija. Divvirzienu replikācija tiek iniciēta *ori* rajonā. Replīcēto DNS molekulu terminālie atkārtojumi (TR) hibridizējas, veidojot garus konkatemērus (pielāgots no Snyder, Champness, 2007).

Figure 5. Replication of phage T7 DNA. Replication is initiated bidirectionally at the origin (*ori*). The terminal repeats (TR) of replicated DNA molecules pair to produce long concatemers (adapted from Snyder, Champness, 2007).

1.3. Bakteriofāgu DNS replikācijas proteīni

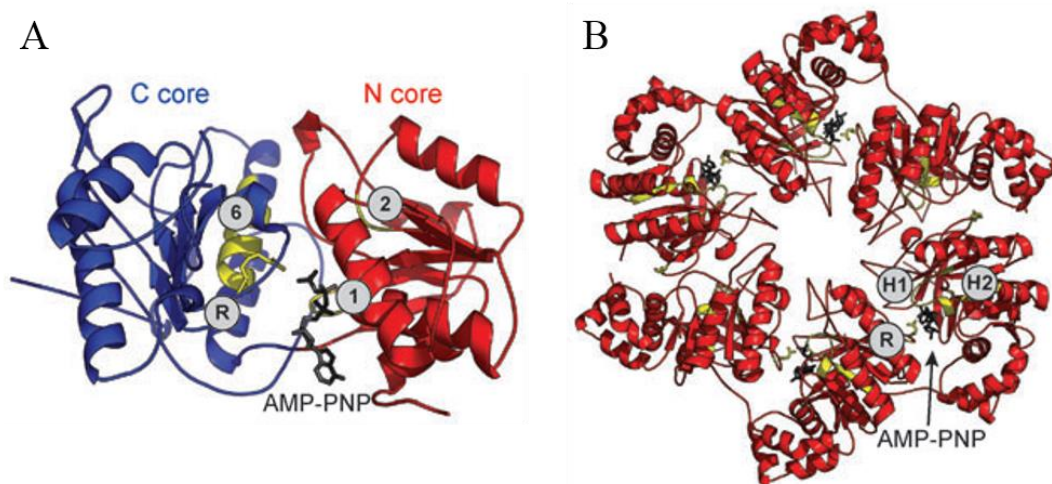
Bakteriofāgu genoma replikāciju nodrošina fāgu un to saimniekorganismu replikācijas proteīnu saskaņota darbība. Mazākie un genoma organizācijas ziņā vienkāršākie fāgi ir pilnībā atkarīgi no šūnas DNS replikācijas proteīniem. Vairumam dsDNS bakteriofāgu ir kompleksa genoma uzbūve ar daudziem DNS replikācijas gēniem (Hyman, Abedon, 2012). Šie gēni genomā atrodas secīgi viens aiz otra un veido t. s. replikācijas moduli (Weigel, Seitz, 2006). Galvenās plašāk pārstāvētās bakteriofāgu DNS replikācijas proteīnu grupas ir replikatīvās helikāzes, primāzes, ssDNS saistošie proteīni (SSB; *ssDNA binding proteins*), DNS polimerāzes un to palīgproteīni, ligāzes, topoizomerāzes un praimeru šķelšanas proteīni (6. attēls).



6. attēls. Vīrusu DNS replikācijas proteīnu dzimtu sadalījums. Stabiņu garums ir proporcionāls proteīnu dzimtu pārstāvju skaitam reprezentatīvā dsDNS vīrusu kopā (pielāgots no Kazlauskas *et al.*, 2016).

Figure 6. Distribution of viral DNA replication protein families. Bar lengths are proportional to the number of protein family members in the representative set of dsDNA viruses (adapted from Kazlauskas *et al.*, 2016).

Helikāzes ir motori proteīni, kas izmanto nukleozīdu trifosfātu (parasti ATF) hidrolīzes enerģiju, lai pārvietotos pa nukleīnskābes dubleksu un veiktu komplementāro pavedienu atdalīšanu. Helikāzes piedalās visos divpavedienu nukleīnskābju metabolisma procesos: DNS replikācijā, transkripcijā, rekombinācijā, reparācijā u.c. (Brüning *et al.*, 2014). Pēc sekvenču, struktūras un darbības mehānisma helikāzes klasificē sešās *superdzimtās* (SF; *superfamilies*). SF1 un SF2 helikāzes ir funkcionāli monomēri vai dimēri, kuru koru veido divi tandēmiski RecA *folda* atkārtojumi (7. attēls, a). SF3-6 enzīmi sastāv no sešiem RecA vai AAA+ domēniem, kas organizēti heksamēriskā gredzenveida struktūrā (7. attēls, b). Bakteriofāgu replikatīvās helikāzes pieder SF2, SF3, SF4 vai SF6. Vairākiem fāgiem (piemēram, T7 un P4) helikāzes domēns ir savienots ar praimāzi, veidojot himēru multifunkcionālu proteīnu (Kazlauskas *et al.*, 2016).

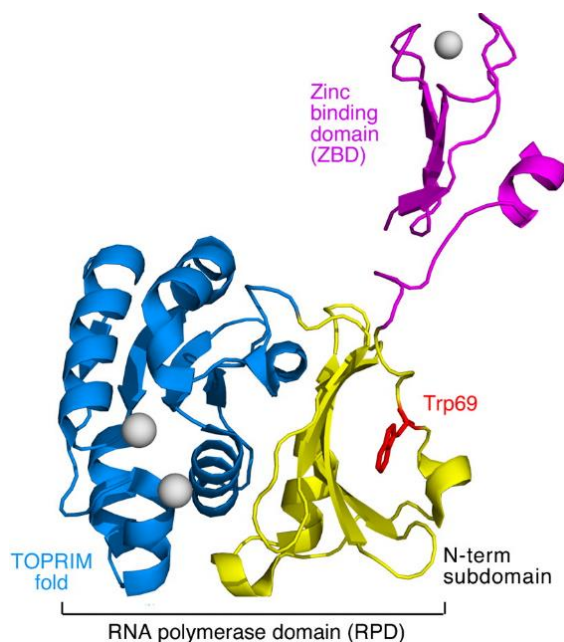


7. attēls. *S. aureus* SF1 helikāzes kora monomērs ar diviem RecA *folda* atkārtojumiem (a) un T7 fāga SF4 helikāze ar sešu RecA domēnu heksamērisku struktūru (b). AMP-PNP – nukleozīdu trifosfāta analogs; 1,2,6, R, H1, H2 – helikāzēm konservatīvi motīvi (pielāgots no Singleton *et al.*, 2007).

Figure 7. Monomeric core of SF1 helicase from *S. aureus*, composed of two RecA fold repeats (a) and SF4 helicase from phage T7 with a hexameric structure containing six RecA domains (b) AMP-PNP – a nucleoside triphosphate analogue; 1, 2, 6, R, H1, H2 – conserved helicase motifs (adapted from Singleton *et al.*, 2007).

Praimāzes ir DNS atkarīgas RNS polimerāzes, kas sintezē īsus oligoribonukleotīdus (praimerus) uz ssDNS matricas. DNS polimerāzēm nepieciešama praimeru 3' hidroksilgrupa DNS sintēzes uzsākšanai (Weigel, Seitz, 2006). Bakteriofāgu praimāzes ir bakteriālo DnaG vai arheo-eikariotisko praimāžu (AEP) homologi (Kazlauskas *et al.*, 2016). DnaG praimāzēm ir divi konservatīvi struktūras elementi: cinka saistīšanas domēns ar cinka pirkstu motīvu un RNS polimerāzes domēns ar topoizomerāzes-praimāzes (TOPRIM) *foldu* (8. attēls) (Zhu *et al.*, 2010).

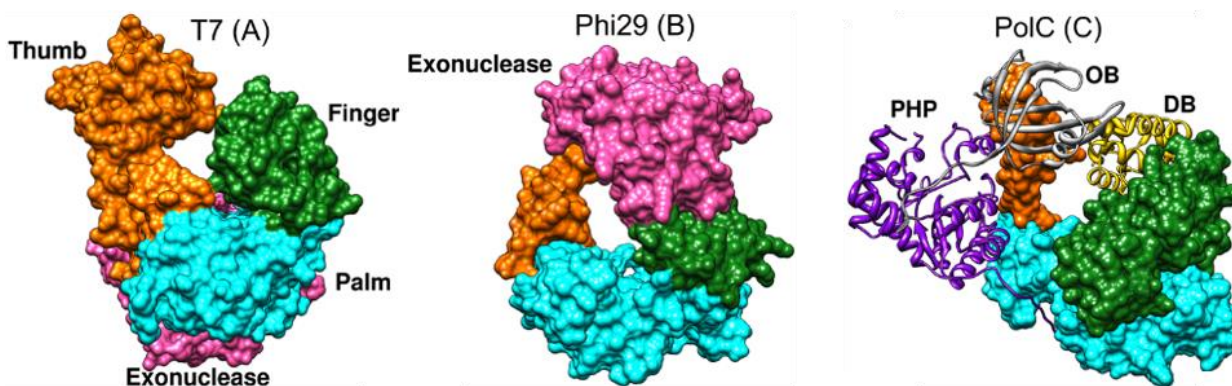
AEP katalītiskais domēns satur RNS atpazīšanas motīvu (RRM), bet šobrīd nav noteikta neviena fāgu AEP struktūra (Guilliam *et al.*, 2015).



8. attēls. Bakteriofāga T7 DnaG tipa primāze ar konservatīvu cinka saistīšanas domēnu (ZBD) un RNS polimerāzes domēnu (RPD), kas satur topoizomerāzes-primāzes (TOPRIM) *folda* subdomēnu (pielāgots no Zhu *et al.*, 2010).

Figure 8. DnaG type primase of bacteriophage T7, containing zinc binding domain (ZBD) and RNA polymerase domain (RPD) with a topoisomerase-primase (TOPRIM) fold subdomain (adapted from Zhu *et al.*, 2010).

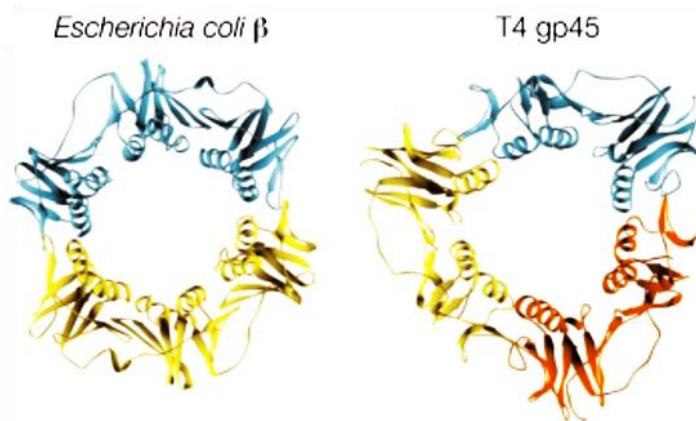
Bakteriofāgu replikatīvās DNS polimerāzes pieder A, B vai C DNS polimerāžu dzimtai, kas būtiski atšķiras sekvenču un struktūras līmenī (Kazlauskas *et al.*, 2016). Visu DNS polimerāžu uzbūve atbilst t. s. “labās plaukstas modelim”, pēc kura izšķir *pirkstu*, *delnas* un *īkšķa* subdomēnus. A un B dzimtas DNS polimerāzes papildus satur domēnu ar 3’–5’ eksonukleāzes aktivitāti replikācijas kļūdu labošanai, bet C grupas DNS polimerāzēm ir polimerāzes-histidinolfosfāta (PHP), oligonukleotīdu/oligosaharīdu saistīšanas (OB; *oligonucleotide/oligosaccharide binding*) un dupleksu saistīšanas (DB; *duplex binding*) domēni (9. attēls). dsDNS bakteriofāgu sekvenču bioinformātiska izpēte atklāj vairākas sakarības starp genoma izmēru un DNS polimerāžu veidu: (1) vairumā genomu, kas mazāki par 40 kbp, polimerāzes gēnu nav; neliela daļa kodē specifiskas B dzimtas polimerāzes, kas DNS sintēzes uzsākšanai izmanto *praimerproteīnu* hidroksilgrupas, (2) fāgiem ar 40-140 kbp garu genomu raksturīgas A dzimtas polimerāzes, (3) fāgi ar genomu virs 140 kbp kodē galvenokārt B dzimtas RNS praimera atkarīgas DNS polimerāzes, (4) C dzimtas polimerāzes ir retāk sastopamas (parasti genomos >70 kbp) (Kazlauskas, Venclovas, 2011).



9. attēls. A (fāga T7), B (fāga Phi29) un C (*G. kaustophilus*) dzimtas DNS polimerāžu domēnu un subdomēnu organizācija. Pirkstu subdomēni – zaļi, delnas – zilzaļi, īkšķa – oranži, eksonukleāzes domēni – rozā. Ar lentveida reprezentāciju attēloti C dzimtas polimerāžu PHP (polimerāzes-histidinolfosfāta), OB (oligonukleotīdu/oligosaharīdu saistīšanas) un DB (duplexu saistīšanas) domēni (pielāgots no Wu *et al.*, 2014).

Figure 9. Domain and subdomain organization of the A (phage T7), B (phage Phi29) and C (*G. kaustophilus*) family DNA polymerases. Finger subdomains – green, palm – cyan, thumb – orange, exonuclease domains – pink. Indicated in ribbon representation are the PHP (polymerase-histidinol phosphate), OB (oligonucleotide/oligosaccharide-binding) and DB (duplex-binding) domains of the C family polymerases (adapted from Wu *et al.*, 2014).

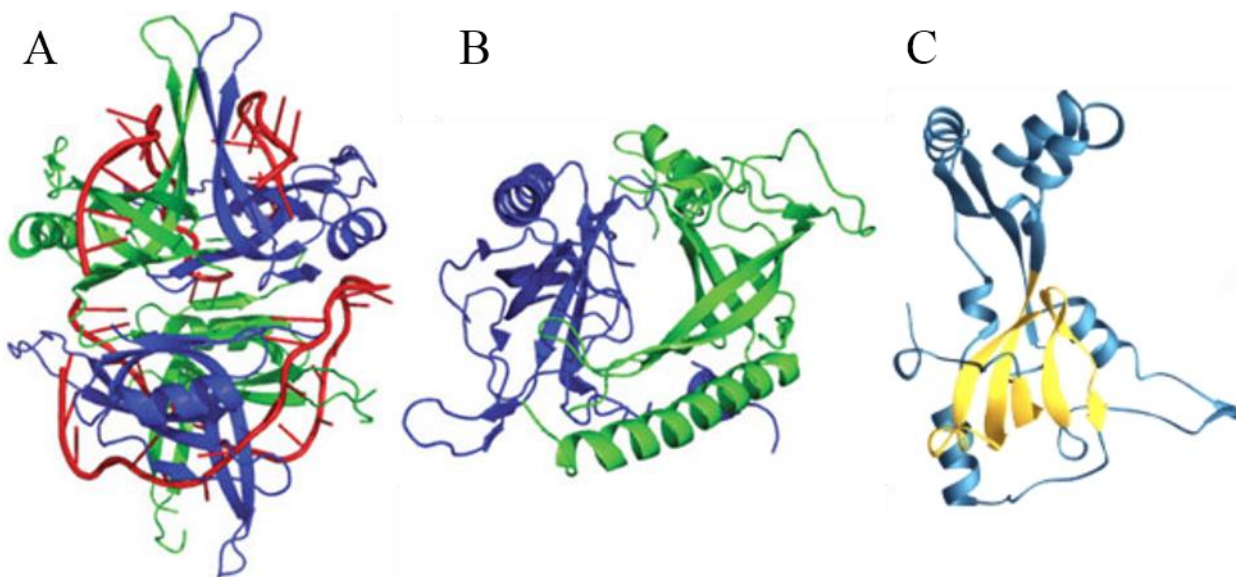
Proteīnus, kuri nodrošina DNS polimerāzes stabilu asociāciju ar DNS matricu, sauc par procesivitātes faktoriem jeb DNS *skavu* proteīniem (*DNA clamps*). Tiem ir gredzenveida struktūra (10. attēls), kuras atvēršanu un uznešanu uz DNS pavediena veic *skavu lādētājproteīnu* (*clamp loader*) pentamēriski kompleksi (Hedglin *et al.*, 2013). Fāgu kodētie procesivitātes faktori un to *lādētājproteīni* ir *E. coli* vai bakteriofāga T4 attiecīgo proteīnu homologi (Kazlauskas *et al.*, 2016).



10. attēls. Procesivitātes faktoru struktūras. *E. coli* DNS *skavu* proteīnam β ir homodimēra uzbūve (pa kreisi), bet T4 fāga proteīns gp45 ir homotrimērs (pa labi) (pielāgots no Hingorani, O'Donnell, 2000).

Figure 10. Structures of processivity factors. *E. coli* β clamp has a homodimeric composition (left), whereas the gp45 protein of phage T4 is a homotrimer (right) (adapted from Hingorani, O'Donnell, 2000).

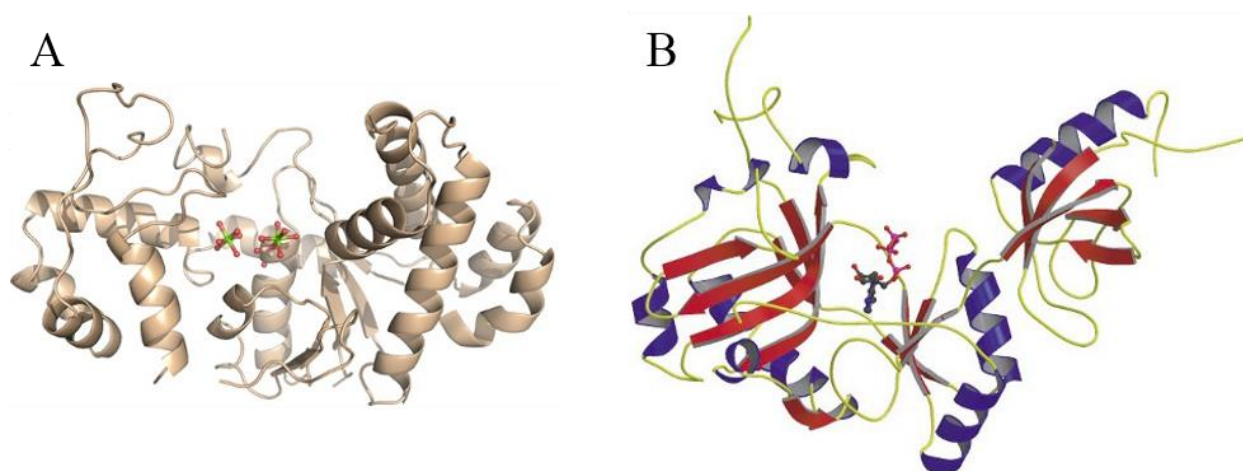
SSB proteīni kavē komplementāro DNS pavedienu hibridizāciju DNS replikācijas laikā, pasargā DNS vienpavediena reģionus no nukleolītiskas degradācijas un novērš sekundāro struktūru veidošanos, nodrošinot netraucētu DNS replikācijas, reparācijas un rekombinācijas norisi. Papildus DNS saistīšanas aktivitātei, SSB tieši mijiedarbojas ar citiem DNS metabolisma proteīniem un koordinē to darbību (Marceau, 2012). Visbiežāk ssDNS saistīšanas funkciju veic viens vai vairāki OB *folda* domēni. Minimāls OB *folda* veidots no piecu virkņu β mucas (β barrel), kuras galu noslēdz α spirāle (Theobald *et al.*, 2003). Pēc sekvenču un struktūras homoloģijas bakteriofāgu SSB pieder galvenokārt *E. coli* SSB, fāga T7 proteīna gp2.5 vai T4 proteīna gp32 SSB grupai (Kazlauskas *et al.*, 2016). *E. coli* SSB ir homotetramērs (11. attēls, a), bet T7 gp2.5 – homodimērs (11. attēls, b), tomēr abu proteīnu monomēriem ir līdzīga uzbūve ar N-terminālu OB *folda* domēnu un nestrukturētu, negatīvi lādētu C-terminālo segmentu (Marintcheva *et al.*, 2008). Fāga T4 gp32 ir funkcionāls monomērs (11. attēls, c), kas sastāv no N-termināla domēna ssDNS kooperatīvas saistības nodrošināšanai, skābajām aminoskābēm bagāta C-termināla domēna un OB *folda* kora ar iestarpinātu cinka pirkstu motīvu (Shokri *et al.*, 2009).



11. attēls. Ar ssDNS saistīts *E. coli* SSB homotetramērs (a), fāga T7 gp2.5 homodimērs (b). Atsevišķi monomēri – zili vai zaļi, ssDNS – sarkana (pielāgots no Marceau, 2012). Fāga T4 gp32 – monomērisks SSB (c), OB *folda* domēns – dzeltens (pielāgots no Shamoo, 2002).

Figure 11. *E. coli* SSB homotetramer bound to ssDNA (a), phage T7 gp2.5 homodimer (b). Single monomers are colored in either blue or green, ssDNA – red (adapted from Marceau, 2012). Phage T4 gp32 – a monomeric SSB (c). OB-fold domain – yellow (adapted from Shamoo, 2002).

Pretstatā vadošā DNS pavediena nepārtrauktai sintēzei 5'→3' virzienā, atpaliekošais pavediens veidojas no diskrētiem DNS segmentiem – Okazaki fragmentiem. To procesēšanu un vienlaidus DNS pavediena izveidošanu nodrošina praimeru šķelšanas proteīnu un ligāžu koordinēta darbība (Balakrishnan, Bambara, 2013). Bakteriofāgu nukleāzes, kas veic RNS praimeru aizvākšanu, ir *flap* endonukleāžu (FEN) vai ribonukleāzes H (RNāzes H) homologi, bet fragmentu savienošānu katalizē ATF vai NAD⁺ atkarīgas DNS ligāzes (Kazlauskas *et al.*, 2016). Strukturāli izpētīta ir T4 fāga 5'–3' FEN eksonukleāze (kļūdaini saukta arī par RNāzi H), kuras aktīvajā centrā notiek divu magnija jonu katalizēta RNS praimeru šķelšana (Yang, 2011) (12. attēls, a), un T7 DNS ligāze ar N-terminālu adenilācijas subdomēnu, kas saista kofaktoru – ATF, un C-terminālu OB *folda* subdomēnu (Martin, MacNeill, 2002) (12. attēls, b).



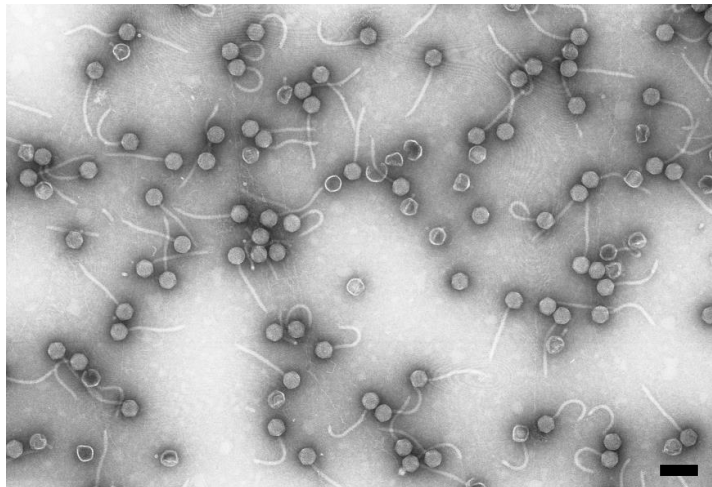
12. attēls. T4 fāga FEN eksonukleāze ar diviem hidratētiem magnija joniem (zaļi) enzīma aktīvajā centrā (a) (pielāgots no Mueser *et al.*, 2010). T7 fāga DNS ligāze kompleksā ar ATF (b) (pielāgots no Martin, MacNeill, 2002).

Figure 12. Phage T4 FEN exonuclease, shown with two hydrated magnesium ions (green) in the active site (a) (adapted from Mueser *et al.*, 2010). Phage T7 DNA ligase complexed with ATP (b) (adapted from Martin, MacNeill, 2002).

Nedaudzi bakteriofāgi ar lieliem genomiem (>130 kbp) kodē topoizomerāzes, kas pieder galvenokārt IIA tipa DNS topoizomerāžu klasei (Kazlauskas *et al.*, 2016). Šie enzīmi atrisina DNS mezglu struktūras, atdala saķēdētas cirkulāras DNS molekulas un regulē DNS superspiralizāciju, ieviešot un no jauna savienojot dsDNS pārrāvumus ATF atkarīgā ceļā. T4 fāga IIA topoizomerāze ir trīs polipeptīdu – gp39, 52 un 60 – heteroheksamērs (Forterre *et al.*, 2007), tomēr šo proteīnu un citu fāgu topoizomerāžu struktūras pašlaik nav zināmas.

1.4. *Enterobacter cancerogenus* bakteriofāgs Enc34 un tam radniecīgie fāgi

Bakteriofāgs Enc34 ir virulents *Siphoviridae* dzimtas vīruss ar ikosaedrisku galvu apmēram 60 nm diametrā un garu nektraktīlu asti (13. attēls). Tas izolēts no *Enterobacter cancerogenus* (syn. *Enterobacter taylorae*) (Kazāks *et al.*, 2012), bet ar zemāku lītisko aktivitāti inficē arī *Hafnia alvei* (nepublicēti dati). *E. cancerogenus* ir Gram-negatīva, fakultatīvi anaeroba *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērija, kas galvenokārt tiek izolēta no augu materiāla un ir saistīta ar fitopatogenitāti (Abbott, 1999). Metagenomikas pētījumi parāda, ka *E. cancerogenus* ir cilvēka mikrobioma simbionts (Graessler *et al.*, 2012). Atsevišķos klīniskajos gadījumos *E. cancerogenus* identificēta kā oportūnistisku kaulu un brūču infekciju (Garazzino *et al.*, 2005), urīnceļu iekaisuma un bakterēmijas (Rubinstien *et al.*, 1993), kā arī pneimonijas (Demir *et al.*, 2014) izraisītāja. Infekciju ārstēšanu ar antibiotiku terapiju apgrūtina AmpC un plaša spektra β-laktamāžu producējošu baktēriju prevalence *Enterobacter* ģintī. Šie enzīmi nodrošina daudzu sugu, t. sk., *E. cancerogenus*, rezistenci pret vairumu cefalosporīnu un penicilīnu (Demir *et al.*, 2014).



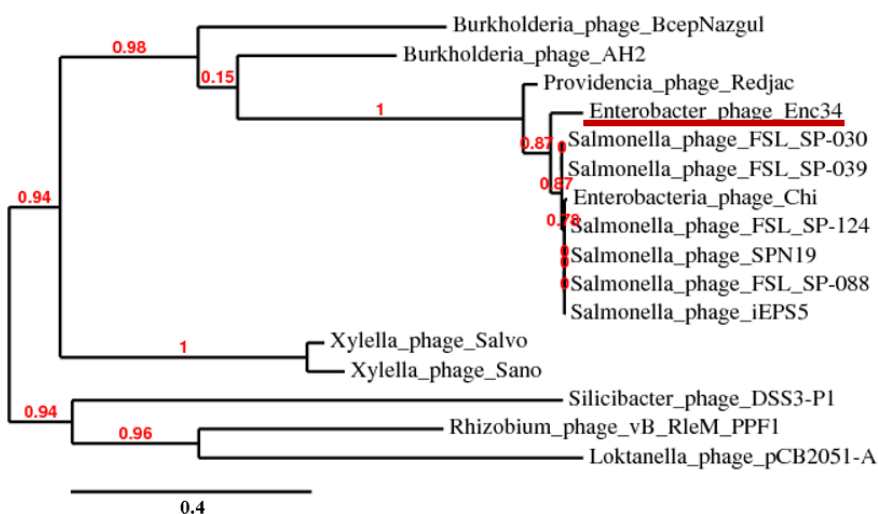
13. attēls. *Enterobacter cancerogenus* fāga Enc34 morfoloģija (caurstarojošā elektronmikroskopija). Marķieris – 100 nm. Attēls: Dr. biol. V. Ose, nepublicēti dati.

Figure 13. Morphology of *Enterobacter cancerogenus* phage Enc34 (transmission electron microscopy). Scale bar – 100 nm. Image: Dr. biol. V. Ose, unpublished data.

Fāga Enc34 genomu veido 60,364 kbp lineāra dsDNS ar 80 atvērtas lasīšanas rāmjiem (*open reading frames*, ORFs). Genoms organizēts četros funkcionālos moduļos ar gēniem, kas atbild par (1) DNS replikāciju un pakošanu, (2) galvas un astes morfoģenēzi, (3) saimniekšūnas līzi un (4) DNS regulāciju un modifikāciju. Vairums Enc34 kodēto proteīnu anotēti kā hipotētiski, un to

funkcijas nav zināmas. Pēc aminoskābju sekvenču homoloģijas DNS replikācijas un pakošanas modulī konstatēti DNS praimāzi, DNS polimerāzi, DNS helikāzi un termināzes kompleksu kodējoši gēni; galvas un astes morfoģenēzes modulī ietilpst gēni, kas kodē galvas-astes konektoru, portālproteīnu, prokapsīdas proteāzi, sastatņu (*scaffolding*) proteīnu, mažoro kapsīdas proteīnu un viriona galvu un asti veidojošos proteīnus; saimniekšūnas līzes modulī kodēts endolizīns, holīns un proteīni Rz un Rz1 (Kazāks *et al.*, 2012).

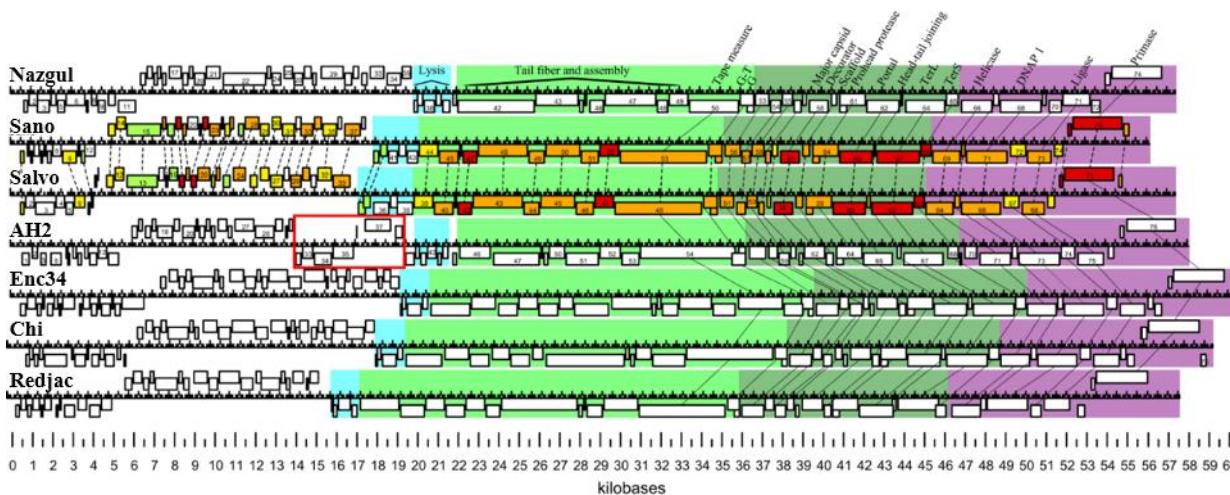
Fāga Enc34 genoma analīze atklāj būtisku homoloģiju (73-74% identitāte 33-47% pārklājumā) ar sekvencēm no vairākiem *Salmonella* bakteriofāgiem: 35 (GenBank No. KR296689), 37 (GenBank No. KR296691) (Karpe *et al.*, 2016), FSL SP-124 (GenBank No. KC139515), FSL SP-088 (GenBank No. KC139512), FSL SP-030 (GenBank No. KC139519), FSL SP-039 (GenBank No. KC139514) (Switt *et al.*, 2013) Chi (GenBank No. KM458633) (Hendrix *et al.*, 2015), iEPS5 (GenBank No. KC677662) (Choi *et al.*, 2013) un SPN19 (GenBank No. JN871591) (Shin *et al.*, 2012); kā arī līdzību ar *Providencia* fāgu Redjac (GenBank No. JX296113) (Onmus-Leone *et al.*, 2013). Bakteriofāgu radniecību uzskatāmi ilustrē mažoro kapsīdas proteīnu filoģenētiska analīze (14. attēls). Pamatojoties uz līdzībām genoma izmēros, gēnu klāstā un izkārtojumā, kā arī homoloģiskām proteīnu sekvencēm, Hendrix *et al.*, 2015, ierosina šos bakteriofāgus apvienot *Chi*-līdzīgo fāgu ģintī. *Salmonella* fāgs Chi (χ) ir jaunizveidotā taksona pirmais izolāts (atklāts 1936. gadā) un labāk raksturotais pārstāvis.



14. attēls. Mažoro kapsīdas proteīnu filoģenētiskais koks bakteriofāgam Enc34 (pasvītrots ar sarkanu) radniecīgu fāgu grupā (Ryu *et al.*, 2013, ICTV taksonomiskā pieteikuma anketa).

Figure 14. Phylogenetic tree of the major capsid proteins in a group of phages related to bacteriophage Enc34 (underlined in red) (Ryu *et al.*, 2013, ICTV taxonomic proposal form).

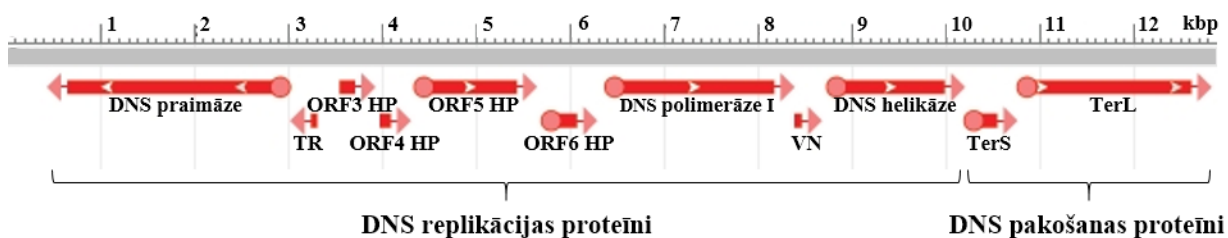
Enterobakērijas inficējošo *Chi*-līdzīgo fāgu tuvākie zināmie radnieki ir *Burkholderia* bakteriofāgi BcepNazgul un AH2 un *Xylella* baktēriju vīrusi Salvo un Sano, par ko liecina proteīnu sekvenču homoloģija, kā arī fāgu genomu sintēnija – atsevišķu gēnu un to bloku analogs izkārtojums (15. attēls). Šo radniecīgo bakteriofāgu kopu ieteikts apvienot augstākā taksonomiskajā vienībā – *Nazgul*-līdzīgo fāgu tipā (Ahern *et al.*, 2014).



15. attēls. *Nazgul*-līdzīgo fāgu sintēnija. Gēni parādīti ar taisnstūriem, homoloģi fāgu gēni savienoti ar nepārtrauktām līnijām. Funkcionālie moduļi attēloti atšķirīgās krāsās: līzes modulis – gaiši zils, astes morfoģenēzes modulis – gaiši zaļš, galvas morfoģenēzes modulis – tumši zaļš, DNS metabolisma modulis – violets (Ahern *et al.*, 2014).

Figure 15. Synteny of *Nazgul*-like phages. Genes are shown as boxes, homologous phage genes are connected by solid lines. Functional modules are represented by different colors: lysis module – light blue, tail morphogenesis module – light green, head morphogenesis module – dark green, DNA metabolism module – violet (Ahern *et al.*, 2014).

Maģistra darba pētījumam izvēlēti Enc34 fāga DNS replikācijas proteīni, kuri kodēti apmēram 10 kbp segmentā DNS replikācijas un pakošanas modulī (16. attēls). Šos proteīnus iespējams iedalīt trīs grupās: (1) proteīni ar konservatīviem domēniem, datu bāzēs detektētām homoloģijām un prognozējamām funkcijām (DNS praimāze, transkripcijas regulators, DNS polimerāze, helikāze un VRR-NUC domēnu saturošs proteīns), (2) hipotētiski proteīni ar konservatīviem domēniem, kuru funkcijas bakteriofāgu DNS replikācijā nav zināmas (ORF5 un ORF6) un (3) hipotētiski proteīni ar zemu sekvenču homoloģiju un nezināmu funkciju (ORF3 un ORF4). Šī darba ietvaros tika veikta visu Enc34 fāga DNS replikācijas proteīnu vispārīga raksturošana un hipotētisko proteīnu bioinformātiska un eksperimentāla izpēte ar mērķi identificēt to funkcijas, bagātinot fundamentālās zināšanas ne vien par Enc34 fāga replikācijas moduli, bet arī tam radniecīgo *Chi*- un *Nazgul*-līdzīgo fāgu replikācijas proteīnu homoloģiem.



16. attēls. Bakteriofāga Enc34 DNS replikācijas un pakošanas modulis. TR – transkripcijas regulators, HP – hipotētisks proteīns, VN – VRR-NUC domēnu saturošs proteīns, TerS – termināzes mazā subvienība, TerL – termināzes lielā subvienība (veidots saskaņā ar GenBank No. JQ340774).

Figure 16. DNA replication and packaging module of bacteriophage Enc34. TR – transcriptional regulator, HP – hypothetical protein, VN – VRR-NUC domain protein, TerS – terminase small subunit, TerL – terminase large subunit (created according to GenBank No. JQ340774).

1.5. Bakteriofāgi kā antibakteriāli līdzekļi

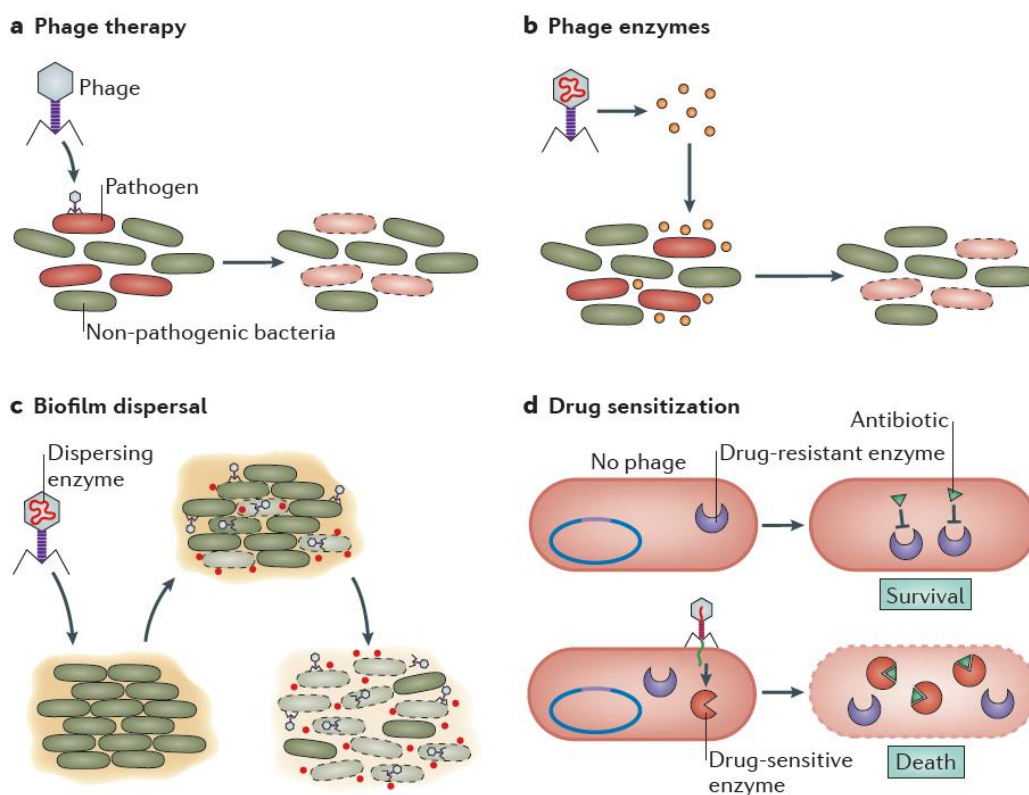
Antibiotiku rezistences gēnu straujā izplatība patogēno baktēriju populācijās rosinājusi interesi par lītiskajiem bakteriofāgiem kā dabiskiem terapeitiskiem aģentiem medicīnā, veterinārijā, lauksaimniecībā, kā arī pārtikas industrijā (Kutter *et al.*, 2010). Nozīmīga fāgu terapijas priekšrocība ir bakteriolītiskā efekta specifiskums – tiek iznīcināts tikai patogēns, nesagraujot organisma mikrobiomu (Viertel *et al.*, 2014) (17. attēls, a). Bakteriofāgiem, atšķirībā no ķīmiskiem preparātiem, piemīt pašregulatīva spēja savairoties mērķa patogēnu klātbūtnē, turklāt tie sasniedz infekcijas izraisītāju arī audos ar apgrūtinātu piekļuvi (piemēram, smadzenēs un kaulaudos) (Abedon *et al.*, 2011). Fāgu rezistences ierobežošanai un terapeitiskās efektivitātes paaugstināšanai izmanto t. s. “fāgu kokteiļus” – patogēnam lītisku dažādu bakteriofāgu kombināciju (Schmerer *et al.*, 2014). Pašlaik norit divu fāgu preparātu klīniska izpēte, trešā – tiks uzsākta drīzumā (3. tabula).

3. tabula. “Bakteriofāgu kokteiļi” klīniskajos pētījumos (veidots saskaņā ar Kingwell, 2015).

Table 3. “Phage cocktails” in clinical trials (created according to Kingwell, 2015).

Preparāts	Uzņēmums	Ārstēšanas mērķis	Progress
Phagoburn	Pherecydes Pharma	Apdegumu infekcijas ar <i>Escherichia coli</i> un <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I/II fāzes klīniskā izpēte
AB-SA01	AmpliPhi Biosciences	Hronisks bakteriāls sinusīts (<i>Staphylococcus aureus</i>)	I fāzes klīniskā izpēte
TP-102	TechnoPhage	Hroniskas čūlas (<i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>)	FDA atļauja I fāzei

Jau vairākus gadus komerciāli pieejami “fāgu kokteiļu” līdzekļi *Listeria monocytogenes* biokontrolei pārtikas produktos (Mahony *et al.*, 2012). Papildus fāgu terapijai attīstās arī citas inovatīvas fāgu tehnoloģijas, piemēram, bakteriofāgu endolizīnu (peptidoglikāna hidrolāžu) pielietojums Gram-pozitīvo baktēriju apkaršanai vai to kombinēta izmantošana kopā ar spanīniem (šūnas iekšējās un ārējās membrānas sapludinošiem proteīniem) Gram-negatīvo baktēriju iznīcināšanai (Roach, Donovan, 2015) (17. attēls, b). Bakteriofāgu kodētie polisaharīdu depolimerizācijas enzīmi spēj sagraut baktēriju bioplēves (17. attēls, c), samazinot to virulenci un veicinot imūnsistēmas piekļuvi un patogēna aizvākšanu (Drulis-Kawa *et al.*, 2012). Modificēti bakteriofāgi var tikt izmantoti kā antibiotiku efektivitāti uzlabojoši līdzekļi (17. attēls, d). “Principa pierādīšanas” pētījumā, Edgar *et al.*, 2012, streptomicīna rezistentas *E. coli* šūnas inficē ar lizogēnu fāgu, kas nes antibiotikas sensitivitātes gēnu, un novēro streptomicīna uzņēmības atjaunošanos.



17. attēls. Uz fāgiem balstītas antimikrobiālās pieejas. Fāgu saimniekšūnas specifiskumu izmanto fāgu terapijā (a), un noteiktus fāgu enzīmus var pielietot baktēriju lizēšanai (b) vai bioplēvju noārdīšanai (c), turklāt fāgi var kalpot kā sensitivitātes gēnu piegādes sistēmas antibiotiku rezistentās baktēriju šūnās (d) (pielāgots no Salmond, Fineran, 2015).

Figure 17. Phage-inspired antimicrobial approaches. The host-specificity is explored in phage therapy (a), and isolated phage enzymes can be used for bacteria lysis (b) or disruption of biofilms (c), furthermore phages can be employed to deliver antibiotic sensitivity genes in resistant bacteria cells (d) (adapted from Salmond, Fineran, 2015).

2. Materiāli un metodes

2.1. Materiāli

2.1.1. Reāgenti

Agarozē, TopVision – Fermentas, Lietuva

Akrilamīds – Prolabo, Beļģija

Amonija citrāts (di-bāzisks) – AppliChem, Vācija

Amonija persulfāts – Sigma, ASV

β-merkaptotēnols – Prolabo, Beļģija

Citronskābe – AppliChem, Vācija

Ditiotreitols (DTT) – Fermentas, Lietuva

Etanols (EtOH) – Jaunpagasts Plus, Latvija

Etilēndiaminotetraacetāts (EDTA) – Sigma, ASV

Etīdija bromīds (EtBr) – AppliChem, Vācija

Glicerols – Sigma, ASV

Glicīns – Stanlab, Polija

Guanidīna hidrohlorīds (GuHCl) – Sigma, ASV

Hloroforms – Bárta a Cihlár, Čehija

Formamīds, Hi-Di – Applied Biosystems, ASV

Imidazols – Aldrich, Vācija

Izopropanols – Stanchem, Polija

Izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozīds (IPTG) – Fermentas, Lietuva

Kālija dihidrogēnfosfāts (KH₂PO₄) – AppliChem, Vācija

Kumāsī briljanzilais G-250 – Serva, Vācija

Ledus etiķskābe – Stanchem, Polija

Maltoze – Sigma, ASV

N,N'-metilēn-bis-akrilamīds – Sigma, ASV

N,N,N',N'-tetrametiletilēndiamīns (TEMED) – AppliChem, Vācija

Nātrija acetāts – Alfa Aesar, Vācija

Nātrija dodecilsulfāts (SDS) – Serva, Vācija

Nātrija hidroksīds (NaOH) – Lach-Ner, Čehija
Nātrija hlorīds (NaCl) – Prolabo, Beļģija
Rauga ekstrakts – Difco, ASV
Sālsskābe (HCl) – Stanlab, Polija
Tetrabromofenolsulfonftaleīns (bromfenolzilais) – Merck, Vācija
Trihloretiķskābe (TCA) – AppliChem, Vācija
Triptons – Difco, ASV
Tris(hidroksimetil)aminometāns (Tris) – Prolabo, Beļģija
Urīnviela – Fluka, Vācija

2.1.2. Šķīdumi

1 M amonija citrāts (di-bāzisks)
10% amonija persulfāts
1 M citrāts
1 M DTT
125 mM, 500 mM EDTA
20%, 50%, 70%, 96% EtOH
10 mg/mL EtBr
Fenola šķīdums, stabilizēts – AppliChem, Vācija
80% glicerīns
2 M imidazols
100 mM IPTG
1M KH₂PO₄
3 M nātrija acetāts pH 5,2
5 M NaCl
50% w/v polietilēnglikols (PEG) 3350, 6000, 8000 – Molecular Dimensions, ASV
10% SDS
50% TCA
1 M Tris-HCl pH 6,8
1 M Tris-HCl pH 8,0
1,25 M Tris-HCl pH 6,8

1,875 M Tris-HCl pH 8,8

8 M urīnviela

TE buferšķīdums: 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1mM EDTA.

Lizēšanas (līzes) buferšķīdums: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 300 mM NaCl.

HisTrap FF crude kolonnas eluēšanas buferšķīdums I: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl 20 mM imidazols.

HisTrap FF crude kolonnas eluēšanas buferšķīdums II: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 300 mM NaCl 300 mM imidazols.

MPBTrap HP eluēšanas buferšķīdums: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM maltoze.

Šķīdumi elektroforēzei agarozes gēlā:

50x TAE buferšķīdums: 242 g Tris, 57,1 mL ledus etiķskābes, 100 mL 500 mM EDTA pH 8,0, līdz 1 L destilēta ūdens (dH₂O). Elektroforēzei lieto 1x TAE buferšķīdumu.

1% agarozes gēls ar EtBr: 1 g agaroze, 2 mL 50x TAE buferšķīdums, 6 µL EtBr šķīduma (10 mg/mL), līdz 100 mL dH₂O.

Šķīdumi elektroforēzei poliakrilamīda gēlā (PAAG):

PAAG elektroforēzes 10x buferšķīdums: 30,3 g Tris, 144,2 g glicīns, 10,0 g SDS, līdz 1 L dH₂O. Elektroforēzei lieto 1x buferšķīdumu.

30% poliakrilamīda pamatšķīdums: 29,1 g akrilamīds, 0,9 g N,N'-metilēn-bis-akrilamīds, līdz 100 mL dH₂O.

5% akrilamīda koncentrējošais šķīdums 2 gēliem: 0,8 mL 30% akrilamīda pamatšķīduma, 3,6 mL dH₂O, 0,5 mL 1,25 M Tris-HCl pH 6,8, 0,05 mL 10% SDS; tieši pirms lietošanas pievieno 50 µL 10% amonija persulfāta un 5 µL TEMED.

15% akrilamīda sadalošais šķīdums 2 gēliem: 5 mL 30% akrilamīda pamatšķīduma, 2,9 mL dH₂O, 2 mL 1,875 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 mL 10% SDS; tieši pirms lietošanas pievieno 100 µL 10% amonija persulfāta un 7,5 µL TEMED.

Laemmli paraugu uznešanas buferšķīdums: 6 mL 1 M Tris-HCl pH 6,8, 2 g SDS, 5 mL β-merkaptotetanolis, 4 mg bromfenolzilais, 10 mL 80% glicerīns, līdz 100 mL dH₂O.

PAAG fiksēšanas šķīdums: 50% EtOH šķīdums.

Kumasī zilā šķīdums PAAG krāsošanai: 0,8 g Kumasī briljantzilais G-250, 10 mL 50% TCA, 41,7 mL 96% EtOH, līdz 200 mL dH₂O.

2.1.3. Aparatūra

Afinitātes kolonnas:

- HisTrap FF crude (1 mL) – GE Healthcare, Zviedrija
- MBPTrap HP (1 mL) – GE Healthcare, Zviedrija

Agarozes gēlu fotografēšanas iekārta:

- C-80 Epi Illumination UV Darkroom – UVP Cambridge, Lielbritānija

Biociklizators:

- Thermal Cycler Biocycler TC-S – BIOSAN, Latvija

Centrifūgas:

- Centrifuge 5415 R – Eppendorf AG, Vācija
- Centrifuge 5810 R – Eppendorf AG, Vācija
- Janetzki K26 – VEB MLW Zentrifugenbau Engelsdorf, Vācija

Elektroforēzes iekārtas:

- HU6 – Roth Karlsruhe, Lielbritānija
- Mighty Small II For 8x9cm Cells – Amersham Biosciences, ASV

Elektroforēzes iekārtu strāvas avoti:

- Electrophoresis Power Supply EPS 301 – Amersham Biosciences, ASV
- Mini Electrophoresis Power Supply E143 – Consort, Beļģija

Elektroniskie svāri:

- KERN EW420-3NM – Kern & Sohn GmbH, Vācija

Hromatogrāfijas kolonnas:

- HiTrap Desalting (5 mL) – GE Healthcare, Zviedrija
- HiPrep DEAE FF (20 mL) – GE Healthcare, Zviedrija
- MonoQ 5/50 GL (1 mL) – GE Healthcare, Zviedrija
- Superdex 200 10/300 GL (20 mL) – GE Healthcare, Zviedrija

Hromatogrāfijas sistēma:

- ÄKTA FPLC augstas izšķirtspējas proteīnu šķīduma hromatogrāfs – Amersham Biosciences, Zviedrija

Kelvinators:

- Ultra Freeze – Heto, Turcija

Kratītājs gēlu atkrāsošanai:

- Shaker PS-4 – Labotek, Latvija

Kristalizācijas robots:

- Freedom EVO – Tecan, Šveice

Ledusskapji:

- Snaigē, Lietuva

Magnētiskais maisītājs:

- Labmixer Magneticstirrer – Labotek, Latvija

Mikroskops

- Leica 110/120 – Leitz Wetzlar, Vācija

pH-metrs:

- pH meter AD 1405 – Adrona, Latvija

Pipetes:

- 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL regulējamās – Gilson, Francija
- Masterpette, 5 mL regulējamā – LMS Consult GmbH & Co., Vācija

Spektrofotometri:

- Калориметр фотоэлектрический КФК-2МП – Аналит-Нева, Krievija
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – NanoDrop Products, ASV

Šūnu kultivēšanas iekārta:

- Infors CH-4103 Bottmingen – Infors AG, Šveice

Termobloks:

- Thermo Block TDB-120 – BIOSAN, Latvija

Termostats:

- TCH 100 – Laboratorní Přístroje Praha, Čehija

Ultraskaņas dezintegrators:

- Soniprep 150 – MSE, Lielbritānija

Ūdens termostats:

- Thermostat U10 – Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Vācija

Vortekss iekārtas:

- Disruptor Genie™ – Scientific Industries, ASV
- V-01/3 – Labotek, Latvija

Citi materiāli:

Cimdi:

- Nitrila cimdi – Klinion Protection, Nīderlande

Kristalizācijas plates:

- 96-well MRC Crystallisation Plate – Molecular Dimensions, ASV

Kristalizācijas plašu uzlīmes:

- ClearVue Sheets – Molecular Dimensions, ASV

Pipešu uzgaļi

- 10 µL – Deltalab, Spānija
- 250 µL – Sarstedt, Vācija
- 1000 µL – Biosigma, Itālija
- 10 mL – Sarstedt, Vācija

Proteīnu koncentratori:

- Vivaspin 500 (3 000 MWCO) – Sartorius Stedim, Vācija
- Vivaspin 500 (10 000 MWCO) – Sartorius Stedim, Vācija

Šļirces:

- 5 mL, 10 mL – Chirana, Slovākija

Stobriņi:

- 1,5 mL centrifugēšanas stobriņi – Biosigma, Itālija
- 2,0 mL centrifugēšanas stobriņi – Biosigma, Itālija
- 3,5 mL stobriņi ar vāciņu – Sarstedt, Vācija
- 12 mL stobriņi – Sarstedt, Vācija
- 50 mL stobriņi – Sarstedt, Vācija

Stikla trauki un Petri plates

2.1.4. Darbā izmantotie *E. coli* celmi

E. coli **BL21(DE3)**: *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*

E. coli **XL1-Blue**: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*

2.1.5. Barotnes

LB šķidrā barotne: 10 g/L triptons, 5 g/L rauga ekstrakts, 10 g/L NaCl. Selektīvai barotnei pievieno ampicilīnu 50 µg/mL.

LB agarizētā barotne: Uz 1 L LB šķidrās barotnes pievieno 15 g Bako-agara. Selektīvai barotnei pievieno ampicilīnu 100 µg/mL.

2x TY šķidrā barotne: 16 g/L triptons, 10 g/L rauga ekstrakts, 5 g/L NaCl. Selektīvai barotnei pievieno ampicilīnu 50 µg/mL.

2.1.6. Enzīmi un to buferšķīdumi

FastDigest (FD) restriktāzes (*Bam*HI, *Bsp*TI, *Eco*RI, *Nco*I, *Stu*I, *Xba*I), 10x FD buferšķīdums – Thermo Scientific, Lietuva

Pfu DNS polimerāze, 10x *Pfu* buferšķīdums ar MgSO₄ – Fermentas, Lietuva

rTEV proteāze – produkciju un attīrīšanu veica BMC darbiniece S. Koteloviča pēc Tropea *et al.*, 2009, protokola

Taq DNS polimerāze, 10x *Taq* buferšķīdums – Fermentas, Lietuva

T4 DNS ligāze, 10x DNS ligāzes buferšķīdums – Fermentas, Lietuva

T4 polinukleotīdu kināze (PNK), 10x PNK buferšķīdums A – Fermentas, Lietuva

2.1.7. Oligonukleotīdi un matricas DNS

Oligonukleotīdi fāga Enc34 gēnu amplifikācijai un klonēšanai – sintezēti Metabion, Vācijā

Enc_ORF3_Fw	5'-CTCACAAGGTATCTTAGAAACTATC-3'
Enc_ORF3_Rv	5'-GTGCTTAAGTTAAACTTCTTCTTCTTCGCCTG-3'
Enc_ORF3nat_Fw	5'-TTACATGTCACAAGGTATCTTAGAAAC-3'
Enc_ORF4_Fw	5'-CAAAAAATTTCTTAAATTCAGCGTTATG-3'
Enc_ORF4_Rv	5'-GTGCTTAAGTTACGAGTACCTTTTGACGGC-3'
Enc_ORF5_Fw	5'-CCGAGAATTCGGATTTGGCAATC-3'
Enc_ORF5_Rv	5'-GTGCTTAAGTTACACTTCGTCGTCATCTTCG-3'

pETDuet-1 inserta reģiona sekvenēšanas oligonukleotīdi – Novagen, Vācija

pET Upstream	5'-ATGCGTCCGGCGTAGA-3'
DuetDOWN1	5'-GATTATGCGGCCGTGTACAA-3'

Fāga Enc34 genomiskā DNS – no laboratorijas kolekcijas

No pETDuet-1 atvasinātas plazmīdas pETDt_Enc_HisORF6 un pETDt_Enc_HisORF6del, kas tika konstruētas bakalaura darba ietvaros

2.1.8. Vektori

pETDuet-1 – Novagen, Vācija

pETDt_MalE – no laboratorijas kolekcijas

2.1.9. Citi reaktīvi

DNS uznešanas buferšķīdums paraugu analīzei agarozes gēlā:

- 6x Mass Loading Dye Solution – Fermentas, Lietuva

Molekulmasas marķieris DNS elektroforēzei agarozes gēlā:

- GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder – Fermentas, Lietuva

Molekulmasas marķieris proteīnu elektroforēzei PAAG:

- Unstained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas, Lietuva

Kits DNS izdalīšanai no agarozes gēla:

- GeneJET Gel Extraction Kit – Thermo scientific, Lietuva

Kits plazmīdu izdalīšanai no *E. coli* šūnām:

- GeneJET Plasmid Miniprep Kit – Thermo scientific, Lietuva

Kristalizācijas šķīdumu kiti:

- JCSG-plus HT-96 – Molecular Dimensions, ASV
- PACT premier HT-96 – Molecular Dimensions, ASV

Sekvenēšanas maisījums:

- BigDye Terminator v3.1 – Applied Biosystems, ASV

2.2. Metodes

2.2.1. Oligonukleotīdu kinēšana

- Pagatavo kinēšanas maisījumu:
 - 50 pmol – oligonukleotīds;
 - 2 μL – 10x PNK buferšķīdums A;
 - 2 μL – 10 mM ATF;
 - 1 μL – T4 polinukleotīdkināze (10 u/ μL);
 - pievieno dH₂O līdz 20 μL .
- Reakcijas maisījumu īsi vorteksē un inkubē 20 minūtes +37°C temperatūrā un 10 minūtes +75°C temperatūrā.
- Kinēto oligonukleotīdu turpmāk izmanto PCR vai uzglabā -20°C temperatūrā.

2.2.2. DNS fragmentu amplifikācija ar PCR

- Sagatavo PCR reakcijas maisījumu:
 - 1 μL – DNS matrica;
 - 50 pmol – tiešais oligonukleotīds;
 - 50 pmol – reversais oligonukleotīds;
 - 1 μL – 10 mM dNTP maisījums;
 - 5 μL – 10x *Pfu* buferšķīdums ar MgSO₄;
 - 1 μL – *Pfu* polimerāze;
 - pievieno dH₂O līdz 50 μL .
- PCR maisījumu īsi vorteksē un ievieto biociklizatorā, iestatot *Pfu* programmu ar sešiem reakcijas soļiem, no kuriem 2. – 4. tiek atkārtots 30 reizes:
 1. 3 min +95°C temperatūrā;
 2. 0,5 min +95°C temperatūrā;
 3. 0,5 min +55°C temperatūrā;
 4. 2 min +72°C temperatūrā (~1000 bp garam fragmentam);
 5. 7 min +72°C temperatūrā;
 6. līdz parauga izņemšanai +4°C temperatūrā.
- PCR produktu pārbauda agarozes gēlā.
- Amplificēto DNS attīra ar precipitāciju.

2.2.3. Elektroforēze agarozes gēlā

- Sagatavo 1% agarozes gēlu ar EtBr 1x TAE buferšķīdumā.
- Gēlu izkausē +100°C temperatūrā, nedaudz atdzesē un lej elektroforēzes iekārtas karietē.
- Analizējamajam paraugam pievieno 6x DNS uznešanas buferšķīdumu, resuspendē.
- Gēla bedrītēs ienes marķieri un sagatavotos paraugus.
- Veic elektroforēzi pie 80 V 40-50 min.
- DNS vizualizē UV gaismā.

2.2.4. PCR fragmenta DNS precipitācija

- Paraugam pievieno 1/10 tilpuma 3 M nātrija acetāta pH 5,2 un 3 tilpumus 96% EtOH.
- Precipitācijas maisījumu inkubē ledus vannā 15 min.
- Paraugu centrifugē 15 min pie 13 000×g. Supernatantu nolej.
- Nogulsnes skalo ar 200 μL 70% EtOH.
- Paraugu centrifugē 5 min pie 13 000×g. Supernatantu nolej.
- Nogulsnes žāvē termoblokā 30 min +37°C temperatūrā.
- DNS izšķīdina 50 μL dH₂O.

2.2.5. Vektora un PCR fragmenta DNS šķelšana ar *FastDigest* restriktāzēm

- Pagatavo šķelšanas maisījumu:
 - 1-5 μg – DNS;
 - 2 μL – restriktāze(s) (10 u/μL);
 - 8 μL – 10x FD buferšķīdums;
 - pievieno dH₂O līdz 80 μL.
- Šķelšanas maisījumu inkubē 30 min +37°C temperatūrā.
- Šķelto DNS analizē agarozes gēlā.

2.2.6. DNS izdališana no agarozes gēla ar GeneJET Gel Extraction kitu

Visus centrifugācijas soļus veic 1 min pie 13 000×g.

- Zonu ar nepieciešamo DNS izgriez un nosver.
- Gēlam pievieno saistīšanas buferšķīdumu attiecībā 1 μL buferšķīduma uz 1 mg gēla.
- Gēlu izkausē, karsējot 10 min +60°C temperatūrā.
- Iegūto šķīdumu ienes GeneJET attīrīšanas kolonnā. Centrifugē, caurplūdes frakciju izlej.

- Kolonnā iepilda 700 μL mazgāšanas buferšķīduma. Centrifugē, caurplūdes frakciju izlej.
- Atkārtoti centrifugē tukšu kolonnu, lai pilnībā atbrīvotos no mazgāšanas buferšķīduma.
- Kolonnu ievieto jaunā 1,5 mL stobriņā. Membrānas centrā uznes 50 μL eluēšanas buferšķīduma.
- Kolonnu centrifugē attīrītas DNS eluēšanai.
- DNS eluācijas frakciju pārbauda agarozes gēlā.
- Izdalīto mērķa DNS izmanto turpmākām manipulācijām vai uzglabā -20°C temperatūrā.

2.2.7. DNS ligēšana

- Sagatavo ligēšanas maisījumu ar kopējo tilpumu 10 μL :
 - 20-100 ng/ μL – sašķeltas vektors;
 - 20-100 ng/ μL – sašķeltas DNS fragments;
 - 1 μL – 10x DNS ligāzes buferšķīdums;
 - 1 μL – T4 DNS ligāze.
- Ligēšanas maisījumu īsi vorteksē un inkubē 20-30 min istabas temperatūrā.
- Maisījumu transformē *E. coli* XL-1 blue šūnās.

2.2.8. Plazmīdu transformācija *E. coli* šūnās

- Stobriņu ar sasaldētām *E. coli* kompetentajām šūnām atkausē ledus vannā.
- Ligēšanas maisījumam (vai 1 μL ar pārbaudītu plazmīdu retransformācijas gadījumā) pievieno 100 μL šūnu un inkubē ledus vannā 10 min.
- Ūdens termostatā veic siltuma šoku $+42^{\circ}\text{C}$ temperatūrā: ar PEG pagatavotām šūnām – 2 min, sintēzes kompetentām šūnām – 35 s.
- Šūnas inkubē ledus vannā 2 min.
- Šūnām pievieno 900 μL LB šķidrās barotnes un inkubē 1 h $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūrā uz kratītāja ar iestatītiem 60 apgr./min.
- 100 μL šūnu kultūras izsēj uz Petri plates ar selektīvu (ampicilīnu saturošu) LB agarizētu barotni.
- Šūnu suspensiju koncentrē, centrifugējot 2 min pie $6800\times g$. 800 μL supernatanta nolej, 100 μL resuspendē un izsēj uz otras Petri plates.
- Petri plates inkubē termostatā ~ 16 h $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūrā.

2.2.9. *E. coli* šūnu kultivēšana plazmīdu pavairošanai

- Atsevišķas kolonijas no Petri plates pārnes uz mēģenēm, kurās iepildīti 4 mL ar selektīvu LB šķidro barotni.
- Mēģenes ievieto kratītājā pie 140-160 apgr./min un inkubē ~16 h +37°C temperatūrā.
- Šūnu suspensiju iepilda 1,5 mL stobriņos un centrifugē 2 min pie 6800×g. Supernatantu nolej.

2.2.10. Plazmīdu izdalīšana ar GeneJET Plasmid Miniprep kitu

Visus centrifugēšanas soļus veic pie 13 000×g.

- Savāktajām šūnām pievieno 250 µL resuspendēšanas buferšķīduma un vorteksē līdz maisījums kļūvis homogēns.
- Suspensijai pievieno 250 µL lizēšanas buferšķīduma, stobriņus invertē 6 reizes.
- Lizātam pievieno 350 µL neitralizācijas buferšķīduma, stobriņus invertē 6 reizes.
- Stobriņu saturu centrifugē 5 min.
- Supernatantu pārnes GeneJET kolonnā. Centrifugē 1 min, caurplūdes frakciju izlej.
- Kolonnā iepilda 500 µL mazgāšanas šķīduma. Centrifugē 1 min, caurplūdes frakciju izlej. Šo soli atkārto.
- Tukšu kolonnu centrifugē papildus 1 min, lai pilnībā atbrīvotos no mazgāšanas šķīduma.
- Kolonnu ievieto jaunā 1,5 mL stobriņā. Membrānas centrā uznes 50 µL eluēšanas šķīduma. Inkubē 2 min. Centrifugē 2 min plazmīdas DNS eluēšanai.
- Attīrīto plazmīdu izmanto turpmākām manipulācijām vai uzglabā -20°C temperatūrā.

2.2.11. Pozitīvo plazmīdu DNS klonu atlase ar *FastDigest* restriktāzēm

- Pagatavo šķelšanas maisījumu:
 - 2 µL – plazmīdas DNS;
 - 0,5 µL – restriktāze(s) (10 u/µL);
 - 2 µL – 10x FD buferšķīdums;
 - pievieno dH₂O līdz 20 µL.
- Šķelšanas maisījumu inkubē 15 min +37°C temperatūrā.
- DNS šķelšanu analizē agarozes gēlā.

2.2.12. DNS sekvenēšana

- Pagatavo sekvenēšanas maisījumu:
 - 5 pmol – sekvenēšanas oligonukleotīds;
 - 1 μL – DNS matrica (50-500 ng/μL);
 - 1 μL – BigDye v3.1 terminatoru maisījums;
 - 3,5 μL – 5x BigDye sekvenēšanas buferšķīdums;
 - pievieno dH₂O līdz 20 μL.
- Sekvenēšanas maisījumu īsi vorteksē un ievieto biociklizatorā, iestatot sekvenēšanas režīmu ar sešiem reakcijas soļiem, no kuriem 2. – 4. tiek atkārtots 30 reizes:
 1. 3 min +96°C temperatūrā;
 2. 10 s +96°C temperatūrā;
 3. 5 s +50°C temperatūrā;
 4. 4 min +60°C temperatūrā;
 5. 5 min +72°C temperatūrā;
 6. līdz parauga izņemšanai +4°C temperatūrā.
- PCR produkta precipitācijai un attīrīšanai pievieno 5 μL 125 mM EDTA un 70 μL 96% EtOH, maisījumu vorteksē un inkubē 15 min istabas temperatūrā.
- Paraugu centrifugē 10 min pie 16 000×g. Supernatantu nolej.
- Nogulsnes skalo ar 250 μL 70% EtOH.
- Paraugu centrifugē 3 min pie 16 000×g. Supernatantu nolej.
- Nogulsnes žāvē termoblokā 7 min +65°C temperatūrā.
- Precipitēto DNS izšķīdina 11 μL Hi-Di formamīda.
- Paraugu karsē 5 min +95°C temperatūrā un atdzesē, ievietojot ledus vannā.
- Iegūto maisījumu pārnes sekvenēšanas stobriņā un ievieto sekvenēšanas iekārtā.

2.2.13. ssDNS sintēze ar asimetrisko PCR

- Sagatavo reakcijas maisījumu:
 - 1 μL – DNS matrica;
 - 50 pmol – tiešais oligonukleotīds;
 - 0,5 pmol – reversais oligonukleotīds;
 - 1 μL – 10 mM dNTP maisījums;
 - 5 μL – 25 mM MgCl₂

- 5 μL – 10x *Taq* buferšķīdums;
- 1 μL – *Taq* polimerāze;
- pievieno dH₂O līdz 50 μL .
- Maisījumu īsi vorteksē un ievieto biociklizatorā, iestatot *Taq* programmu ar sešiem reakcijas soļiem, no kuriem 2. – 4. tiek atkārtots 60 reizes:
 1. 1 min +95°C temperatūrā;
 2. 0,5 min +94°C temperatūrā;
 3. 0,5 min +55°C temperatūrā;
 4. 1 min +72°C temperatūrā;
 5. 10 min +72°C temperatūrā;
 6. līdz parauga izņemšanai +4°C temperatūrā.
- Asimetriskā PCR produktu pārbauda agarozes gēlā.

2.2.14. Bakteriofāga M13 ssDNS genoma izdalīšana

Vīrusu producēja un daļēji attīrīja Dr. biol. A. Dišlers.

- Ar PEG izgulsnētas fāga daļiņas (no ~600 mL *E. coli* lizāta) resuspendē 500 μL TE buferšķīduma.
- Suspensijai pievieno 500 μL fenola šķīduma, vorteksē 15-20 s.
- Maisījumu centrifugē 5 min pie 16 000×g istabas temperatūrā.
- Virsējo šķīduma fāzi pārnes jaunā stobriņā. Ekstrakciju atkārtoti ar 500 μL hloroforma.
- Šķīdumam pievieno 55 μL 3 M nātrija acetāta pH 5,2 un 1250 μL 96% EtOH un inkubē 20 min -70°C temperatūrā.
- Maisījumu centrifugē 10 min pie 16 000×g +4°C temperatūrā, supernatantu nolej.
- Nogulsnes skalo ar 500 μL ledus auksta 70% EtOH, centrifugē 10 min pie 16 000×g +4°C temperatūrā, supernatantu nolej. Šo soli atkārtoti vēlreiz.
- Nogulsnes žāvē termostatā 30 min +37°C temperatūrā.
- DNS izšķīdina 100 μL TE buferšķīduma un pārbauda agarozes gēlā.

2.2.15. Transformēto *E. coli* šūnu kultivēšana ekspresijas apstākļos ar “lēno indukciju”

- Atsevišķas kolonijas no Petri plates pārnes uz mēģenēm, kurās iepildīti 5 mL ar selektīvu LB šķīdros barotni. Nepieciešamo koloniju skaitu aprēķina tā, lai sējmateriāls veidotu ne vairāk kā 10% no kopējā ekspresijas kultūras tilpuma.

- Sējmateriālu inkubē termostatā ~16 h +37°C temperatūrā bez aerācijas.
- 2 L Erlenmeijera kolbā(s) ielej 400 mL selektīvas 2x TY šķidrās barotnes un iepilda 40 mL iegūtā sējmateriāla.
- Šūnu kultūras inkubē +25°C temperatūrā pie 200 apgr./min līdz šūnu optiskais blīvums sasniedz 0,6-0,8 (aptuveni 3-4 h).
- Ekspresiju *E. coli* BL21(DE3) šūnās inducē ar 0,01 mM IPTG. Kultivēšanas temperatūru pazemina līdz +22°C. Šūnas turpina kultivēt vēl ~16 h.
- Šūnu kultūru centrifugē 15 min +4°C temperatūrā pie 5000×g. Supernatantu nolej.
- Šūnas nekavējoties lizē vai uzglabā -20°C temperatūrā.

2.2.16. *E. coli* šūnu lizēšana ar ultraskaņu

- ~1 g šūnu ievieto 50 mL stobriņā un resuspendē 6 mL lizēšanas buferšķīduma.
- Šūnu suspensiju inkubē 30 min ledus vannā un pārnes uz 12 mL stobriņu, kuru ievieto vārglāzē ar ledus ūdeni.
- Šūnas apstrādā ar ultraskaņu 20 s, atdzesē – 40 s. Šo procesu atkārto 10 reizes.
- Lizātu frakcionē, centrifugējot 35 min +4°C temperatūrā pie 13 000×g.

2.2.17. Elektroforēze denaturējošā poliakrilamīda gēlā

- Paraugiem pievieno Laemmli buferšķīdumu:
 - 2 optiskajām vienībām *E. coli* šūnu pievieno 200 µL Laemmli buferšķīduma;
 - mērķa proteīnu attīrīšanas frakcijām – tilpuma attiecībā 1:1.
- Maisījumu vorteksē un karsē 8 min +100°C temperatūrā.
- Gēla bedrītēs ienes 5 µL marķiera un 6 vai 10 µL parauga (atkarībā no bedrīšu izmēra).
- Elektroforēzi veic pie 190 V, līdz Laemmli krāsviela sasniedz gēla apakšu.
- Gēlu fiksē ar 50% EtOH, inkubējot uz kratītāja vismaz 20 min
- Gēlu krāso ar Kumasī zilā šķīdumu, inkubējot uz kratītāja 15 min.
- Gēlu atkrāso ūdenī.

2.2.18. Proteīnu attīrīšana ar HisTrap FF crude metālafinitātes kolonnu

Visus šķīdumus kolonnā ievada manuāli ar šļirci.

- Kolonnu skalo ar 5 mL dH₂O un līdzsvaro ar 5 mL lizēšanas buferšķīduma.
- Cauri kolonnai izlaiž šūnu lizāta šķīstošo frakciju ar ātrumu ~1 mL/min.

- Kolonnu skalo ar 2 mL lizēšanas buferšķīduma.
- Pie kolonnas saistītos proteīnus vispirms eluē ar 2 mL kolonnas eluēšanas buferšķīduma I, turpinot ar 2 mL kolonnas eluēšanas buferšķīduma II.
- Kolonnu skalo ar 5 mL dH₂O un 5 mL 20% EtOH, uzglabā +4°C temperatūrā.

2.2.19. Denaturētu proteīnu *refoldings* uz HisTrap FF crude kolonnas

Visus šķīdumus kolonnā ievada manuāli ar šļirci.

- Kolonnu skalo ar 5 mL dH₂O un līdzsvaro ar 5 mL lizēšanas buferšķīduma, kuram pievienots denaturējošs aģents (4 M vai 8 M urīnviela vai 6 M GuHCl).
- Cauri kolonnai izlaiž šūnu lizāta nešķīstošās frakcijas urīnvielas/GuHCl ekstraktu ar ātrumu ~1 mL/min.
- Kolonnu skalo ar 2 mL lizēšanas buferšķīduma ar urīnvielu/GuHCl.
- Proteīnus eluē ar 2 mL kolonnas eluēšanas buferšķīduma I ar urīnvielu/GuHCl.
- Kolonnu skalo ar 2 mL lizēšanas buferšķīduma bez urīnvielas/GuHCl.
- Proteīnus eluē ar 2 mL kolonnas eluēšanas buferšķīduma II bez urīnvielas/GuHCl. Mērķa proteīna detekcija caurplūdes frakcijā liecina par *refoldinga* sekmīgumu.
- Kolonnu skalo ar 2 mL lizēšanas buferšķīduma ar urīnvielu/GuHCl.
- Proteīnus eluē ar 2 mL kolonnas eluēšanas buferšķīduma II ar urīnvielu/GuHCl.
- Kolonnu skalo ar 2 mL lizēšanas buferšķīduma bez urīnvielas/GuHCl.
- Kolonnu skalo ar 5 mL dH₂O un 5 mL 20% EtOH, uzglabā +4°C temperatūrā.

2.2.20. Proteīnu attīrīšana ar MBPTrap HP afinitātes kolonnu

Visus šķīdumus kolonnā ievada manuāli ar šļirci.

- Kolonnu skalo ar 5 mL dH₂O un līdzsvaro ar 5 mL lizēšanas buferšķīduma.
- Cauri kolonnai izlaiž šūnu lizāta šķīstošo frakciju ar ātrumu ~1 mL/min.
- Kolonnu skalo ar 5 mL lizēšanas buferšķīduma.
- Pie kolonnas saistītos proteīnus eluē ar 5 mL kolonnas eluēšanas buferšķīduma.
- Kolonnu skalo ar 5 mL dH₂O un 5 mL 20% EtOH, uzglabā +4°C temperatūrā.

2.2.21. Proteīnu atbrīvošana no His-tag vai MBP ar rTEV proteāzi

- Ar HisTrap FF crude vai MBPTrap HP attīrītam proteīnam pievieno 1 mM DTT un 100 μL rTEV proteāzes (ar koncentrāciju ~2 mg/mL).
- Inkubē pa nakti +4°C temperatūrā.

2.2.22. Proteīnu attīrīšana ar augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju

ÄKTA FPLC sistēma tika izmantota saskaņā ar lietošanas instrukciju “ÄKTA FPLC System Manual (2003)”. Darbā izmantotās kolonnas un to parametri apkopoti 4. tabulā.

4. tabula. Mērķa proteīnu attīrīšanā un izpētē pielietoto hromatogrāfijas kolonnu parametri.

Table 4. Specifications of chromatography columns employed for the target protein purification and investigation.

Kolonna	Frakcionēšanas kritērijs	Tilpums	Plūsmas ātrums	Frakciju izmērs
HiTrap Desalting	Proteīna	5 mL	2,0 mL/min	Savāc manuāli
Superdex 200 10/300 GL	molekulmasa	20 mL	0,5 mL/min	1 mL
HiPrep DEAE FF	Proteīna virsmas	20 mL	4,0 mL/min	3 mL
MonoQ 5/50 GL	lādiņš	1 mL	1,0 ml/min	1 mL

2.2.23. Proteīnu kristalizēšana un rentgenstaru difrakcijas datu iegūšana

- Kristalizācijas pārbaudi veic ar Tecan Freedom Evo kristalizācijas robotu, izmantojot kristalizācijas šķīdumu kitus.
- Kristalizācijas plati noslēdz, un reakciju bedrītes vēlāk izskata, izmantojot gaismas mikroskopu.
- Izvēlētos kristālus paņem ar speciālu cilpiņu, iemērc krioprotekcijas šķīdumā (kristalizēšanas apstākļos ar pievienotu ~30% glicerīnu) un sasaldē šķidrā slāpekļī.
- Proteīnu kristālu difrakcijas datus ievāca Dr. biol. K. Tārs MAX-Lab sinhrotronā Lundā, Zviedrijā.

2.2.24. Proteīnu kristālu difrakcijas datu apstrāde

Difrakcijas datu apstrādei tika izmantota programmatūra CCP4 (*Collaborative Computational Project No. 4*) (Winn *et al.*, 2011).

- Difrakcijas attēlus indeksē ar programmu Mosflm (Leslie, Powell, 2007).
- Datus mērogo ar programmu Scala (Evans, 2006).
- Molekulāro aizvietošanu veic ar programmu Molrep (Vagin, Teplyakov, 2010).
- Fāzu uzlabošanai izmanto programmu Refmac (Murshudov *et al.*, 1997).
- Struktūru manuāli uzlabo ar programmu Coot (Emsley, Cowtan, 2004), ar vairākiem sekojošiem Refmac cikliem.
- Struktūru validē ar programmu Coot.

- Struktūras vizualizēšanai, izpētei un attēlu veidošanai izmanto programmu PyMOL (DeLano, 2002).

2.2.25. Proteīnu sekvenču bioinformātiska analīze

- Līdzīgas proteīnu un atsevišķu domēnu sekvences tika detektētas ar algoritmiem BLASTP un PSI-BLAST, salīdzinot ar RefSeq datubāzē deponētajām sekvencēm (Altschul *et al.*, 2005).
- Identificēto domēnu funkcionālās nozīmes izpētei tika izmantota konsevarīvo domēnu datubāzes informācija (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).
- Uz sekvences sekundārās struktūras prognozi balstītas homoloģijas tika noteiktas ar algoritmu HHpred, salīdzinot ar proteīnu datu bankā (PDB) deponēto struktūru sekvencēm (Hildebrand *et al.*, 2009).
- Konservatīvi aminoskābju atlikumi tika identificēti ar ConSurf serveri (Ashkenazy *et al.*, 2016).

2.2.26. Proteīna-DNS saistības pārbaude ar elektroforētiskās kustības nobīdes analīzi

Metode turpmāk ir apzīmēta ar vispārpieņemtu saīsinājumu EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*).

- Izvēlētās DNS koncentrāciju nosaka spektrofotometriski.
- Mērķa proteīnu koncentrē ar 10 kDa molekulasmasu ierobežojošu proteīnu koncentratoru līdz 5000 molārajam pārkumam (pret DNS).
- Sagatavo koncentrēta proteīna divkārtu atšķaidījumu sēriju.
- Jaunā stobriņā pārnes 5 μ L no katra proteīnu atšķaidījuma, pievieno 5 μ L DNS, resuspendē pipetējot.
- Maisījumu inkubē 20 min istabas temperatūrā un pārbauda agarozes gēlā.

3. Rezultāti un diskusija

3.1. Bakteriofāga Enc34 replikācijas moduļa proteīni ar prognozējamām funkcijām

Salīdzinot Enc34 replikācijas moduļa kodētos proteīnus ar sekvenču datubāzēm, iespējams prognozēt piecu proteīnu funkcionālo nozīmi (5. tabula). Šie proteīni uzrāda augstu sekvenču līdzību (68-77% identitāte 98-100% pārklājumā) ar vairāku radniecisku *Chi-līdzīgo Salmonella* fāgu kodētiem proteīniem, kas liecina par Enc34 fāga un *Chi-līdzīgo* vīrusu replikācijas gēnu relatīvi nesenu diverģenci no kopīga senča. Saskaņā ar fāgu modulāras evolūcijas teoriju, pārmantojamības un mainības pamatvienība ir tieši funkcionāli saistītu gēnu modulis (Hendrix *et al.*, 2000). Uz enterobaktēriju *Chi-līdzīgo* fāgu nesenu evolucionāru diverģenci norāda arī būtiskas homoloģijas strukturālo proteīnu modulī (Lee *et al.*, 2013).

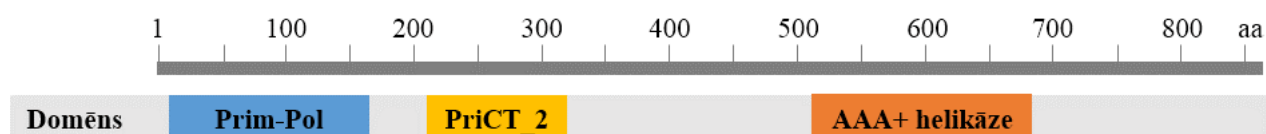
5. tabula. Enc34 DNS replikācijas proteīnu BLASTP analīze. Funkcionāli anotēti ORF izcelti ar dzeltenu krāsojumu, HP – hipotētisks proteīns.

Table 5. BLASTP analysis of Enc34 DNA replication proteins. Functionally annotated ORFs are highlighted in yellow, HP – hypothetical protein.

Enc34 ORF	Anotētā funkcija	Augstākā(-s) BLASTP homoloģija(-s)	Aminoskābju sekvenču identitāte (%)	Homoloģā proteīna GenBank No.
ORF1	DNS praimāze	<i>Salmonella</i> fāga iEPS5 praimāze <i>Salmonella</i> fāga BP12C praimāze	626/864 (72)	AGO15226 AIT13799
ORF2	Transkripcijas regulators	<i>Salmonella</i> fāga Chi transkripcijas regulators	72/93 (77)	AIU37932
ORF3	HP	<i>Providencia</i> fāga Redjac HP	67/124 (57)	AFU62990
ORF4	HP	<i>Salmonella</i> fāga FSL SP-030 HP <i>Salmonella</i> fāga BP12C HP <i>Salmonella</i> fāga FSL Chi HP	42/99 (42)	AGF87918 AIT13796 AIU37934
ORF5	HP	<i>Salmonella</i> fāga FSL SP-124 HP <i>Salmonella</i> fāga BP12C HP <i>Salmonella</i> fāga iEPS5 HP	311/434 (71)	AGF88050 AIT13795 AGO15222
ORF6	HP	<i>Salmonella</i> fāga FSL SP-099 HP <i>Salmonella</i> fāga SPN19 HP <i>Salmonella</i> fāga FSL SP-088 HP	166/187 (89)	AGF89722 AEZ66137 AGF87824
ORF7	DNS polimerāze I	<i>Salmonella</i> fāga FSL SP-088 DNS polimerāze I	509/680 (75)	AGF87823
ORF8	VRR-NUC domēnu saturošs proteīns	<i>Salmonella</i> fāga FSL SP-030 HP	64/94 (68)	AGF88269
ORF9	DNS helikāze	<i>Salmonella</i> fāga SPN19 SNF domēnu saturošs proteīns	354/491 (72)	AEZ66134

Enc34 fāga ORF1 praimāzes analīze atklāj divus konservatīvus struktūras elementus: Prim-Pol domēnu ar antiparalēlu β -plākšņu koru (Pfam ID: PF09250) un α -spirāļu veidotu PriCT_2 domēnu (Pfam ID: PF08707). Šo domēnu klātbūtne liecina par proteīna piederību diverģentai arheo-eikariotisko praimāžu (AEP) dzimtai, kura pārstāvēta arhebaktēriju un retāk baktēriju plazmīdās, kā arī bakteriofāgu genomos (Iyer *et al.*, 2005). Prim-Pol domēnam piemīt gan DNS polimerāzes, gan praimāzes aktivitāte, kas norāda uz senu izcelsmi no agrīnas DNS replikāzes ar apvienotu sintēzes iniciācijas un elongācijas funkciju (Lipps *et al.*, 2004). PriCT_2 ir AEP C-gala domēns, kas nodrošina replikācijas iniciācijas sekvences atpazīšanu un saistīšanu. Asociācijā ar DNS helikāzi Prim-Pol AEP veido kompleksu DNS replikācijas uzsākšanai (Iyer *et al.*, 2005).

Enc34 Prim-Pol ir lokalizēts proteīna N-galā, tam seko PriCT_2 domēns, bet turpmākais C-terminālais segments satur neraksturotu ~550 aminoskābju garu sekvenci. Analīze ar augstas sensitivitātes HHpred algoritmu C-terminālajā reģionā pārliecinoši identificē helikāzes domēnu, kas homologisks ar cilvēka papilomas vīrusa (HPV), adeno-asociētā vīrusa (AAV) un vairāku prokariotu AAA+ *folda* helikāzēm (18. attēls). Radnieciskie HPV un AAV proteīni ir heksamēriskas SF3 helikāzes (Abbate *et al.*, 2004, James *et al.*, 2003). C-termināla helikāzes domēna atklāšana ORF1 sekvencē ir nedaudz pārsteidzoša, tādēļ ka replikatīvās DNS helikāzes funkcija līdz šim anotēta Enc34 ORF9, tomēr multifunkcionāli praimāzes-helikāzes proteīni, it īpaši AEP un SF3 helikāžu kombinācijā, ir izplatīti dsDNS fāgu grupā (Kazlauskas *et al.*, 2016).



18. attēls. Enc34 ORF1 kodētās praimāzes-helikāzes Prim-Pol, PriCT_2 un AAA+ *folda* helikāzes domēnu atrašanās vieta proteīna aminoskābju (aa) secībā.

Figure 18. Location of Prim-Pol, PriCT_2 and AAA+ fold helicase domains in the amino acid (aa) sequence of the Enc34 ORF1 encoded primase-helicase.

Fāga ORF2 kodē XRE dzimtas proteīnu ar cro/C1 tipa spirāles-pagrieziena-spirāles motīva domēnu (Pfam ID: PF13443), kas veic sekvences specifisku DNS saistīšanu un transkripcijas regulāciju. Cro/C1 tipa transkripcijas regulatori ir identificējami daudzos bakteriofāgu un prokariotu genomos, tomēr to specifiskās funkcijas virulentu fāgu replikācijā nav pētītas. Enc34 fāga ORF2 neuzrāda sekvences homologiju ar nevienu no labi raksturotiem XRE proteīniem.

Analīze ar HHpred atklāj attālu, bet statistiski būtisku (E vērtība = $4,3E-11$, p -vērtība = $1,2E-15$) līdzību ar *E. coli* transkripcijas represoru CytR (Moody *et al.*, 2011), kas ļauj spekulēt par Enc34 transkripcijas regulatora lomu saimniekšūnas gēnu ekspresijas inhibīcijā, tomēr precīzai funkcijas pierādīšanai nepieciešama proteīna eksperimentāla izpēte.

Enc34 replikācijas moduļa ORF7 proteīns ir A dzimtas DNS polimerāze I, kas raksturīga vairumam fāgu ar 40-140 kbp dsDNS genomu (Kazlauskas *et al.*, 2016). Enzīms veidots no polimerāzes un 3'-5' eksonukleāzes domēna (PSSM ID: 176479). *E. coli* A dzimtas DNS polimerāzei I piemīt arī 5'-3' eksonukleāzes aktivitāte, kas nepieciešama RNS praimeru aizvākšanai (Cooper, 2000), bet Enc34 DNS polimerāzei šāds domēns netiek prognozēts. Tādējādi Enc34 ORF7 funkcionāli ir analogs *E. coli* polimerāzes Klenova fragmentam, ko apstiprina arī ar HHpred detektēta abu proteīnu pilna garuma sekvences homologija. Līdz ar to RNS praimeru šķelšanu veic vai nu atsevišķs Enc34 kodēts proteīns, vai saimniekšūnas nukleāzes.

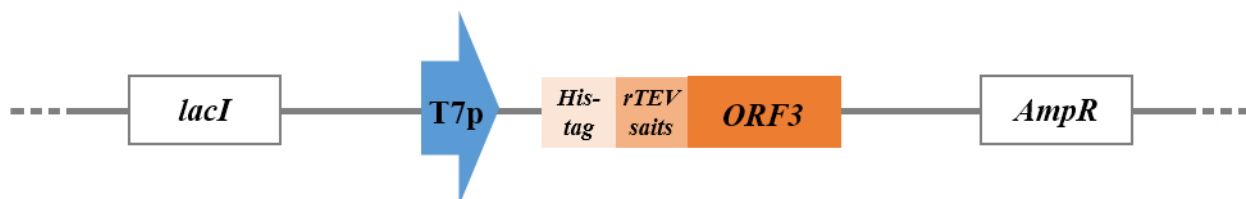
Bakteriofāga ORF8 proteīns ir DNS endonukleāze ar vīrusu tipa replikācijas-reparācijas nukleāzes (VRR-NUC) domēnu. VRR-NUC kodējošās sekvences sākotnēji tika identificētas vairāku bakteriofāgu genomos, termināzes un DNS replikācijas proteīnu gēnu tuvumā, kā tas novērojams arī Enc34 ORF8 gadījumā. Līdzīgi proteīni ir atklāti arī prokariotu un eikariotu proteomos (Iyer *et al.*, 2006). Pašlaik strukturāla un funkcionāla izpēte ir veikta VRR-NUC domēna proteīniem no *Psychrobacter* sp. (PDB ID: 4QBL), *Streptococcus* fāga P9 (PDB ID: 4QBO) un *Salmonella* fāga SETP3 (PDB ID: 4QBN). Šie enzīmi ir funkcionāli dimēri, kas ar augstu afinitāti saista un šķeļ sazarotas, "+" veida DNS struktūras – Holideja savienojumus (*Holliday junctions*), atjaunojot DNS linearitāti (Pennell *et al.*, 2014). Holideja savienojumi veidojas DNS rekombinācijas un reparācijas procesā, un tos šķeļošās nukleāzes sauc par resolvāzēm (Aravind *et al.*, 2000). Ar HHpred tika noskaidrots, ka ORF8 viennozīmīgi ir izpētīto VRR-NUC proteīnu homologs, turklāt BLASTP analīze uzrāda būtisku sekvences līdzību ar resolvāzēm no *Burkholderia* fāga AH2 un *Xylella* vīrusiem Sano un Salvo (ar 44-47% identitāti).

Enc34 ORF9 helikāzi veido (1) N-termināls DEXDc domēns (PSSM ID: 238005) ar ATF un magnija jonu saistīšanas saitēm un (2) C-termināls HELICc domēns (PSSM ID: 238034) ATF un nukleotīdu saistīšanas funkcijai. Šo struktūras elementu klātbūtne ļauj identificēt ORF9 kā SF2 helikāzi, kas pieder DEAD-veida DNS vai RNS helikāžu grupai. Saskaņā ar to, ka Enc34 replikatīvo helikāzi kodē ORF1 un dsDNS bakteriofāgiem nav zināmas RNS helikāzes, ORF9 acīmredzot ir papildus DNS helikāze, kas iesaistīta Enc34 DNS replikācijas, rekombinācijas vai

reparācijas procesos. Papildus DNS helikāžu būtiska funkcija ir replikāzes ceļā esošo proteīnu atbrīvošana no DNS pavediena, nodrošinot DNS replikācijas nepārtrauktību (Brüning *et al.*, 2014).

3.2. Bakteriofāga Enc34 proteīns ORF3

Sākotnēji ORF3 izpētei tika izveidota no pETDuet-1 atvasināta rekombinanta plazmīda pETDt_Enc_HisORF3 (2. pielikums, a) – ar *His-tag* iezīmēta ORF3 (HisORF3) proteīna ekspresijai (19. attēls). ORF3 gēns tika amplificēts no fāga genomiskās DNS, izmantojot kinētu tiešo oligonukleotīdu un reverso oligonukleotīdu, kas sekvencē ievieš *Bsp*TI šķelšanas saiti. Ar *Bsp*TI šķelts ORF3 PCR fragments tika ligēts *His-tag* un tā atšķelšanas sekvenci kodējošā vektorā, kas iegūts no bakalaura darba ietvaros veidotās plazmīdas pETDt_Enc_HisORF6 (2. pielikums, g). Proti, ar *Stu*I un *Bsp*TI izšķēlot ORF6 gēnu, vektorā tika saglabāta rTEV proteāzes šķelšanas vietas sekvence un izveidoti atbilstoši saiti ORF3 gēna klonēšanai. ORF3 saturošas plazmīdas tika atlasītas ar *Bam*HI un *Bsp*TI restrikcijas analīzi. Vektorā klonētās un GenBank datubāzē deponētās ORF3 sekvenču identitāte tika apstiprināta ar sekvenēšanu.

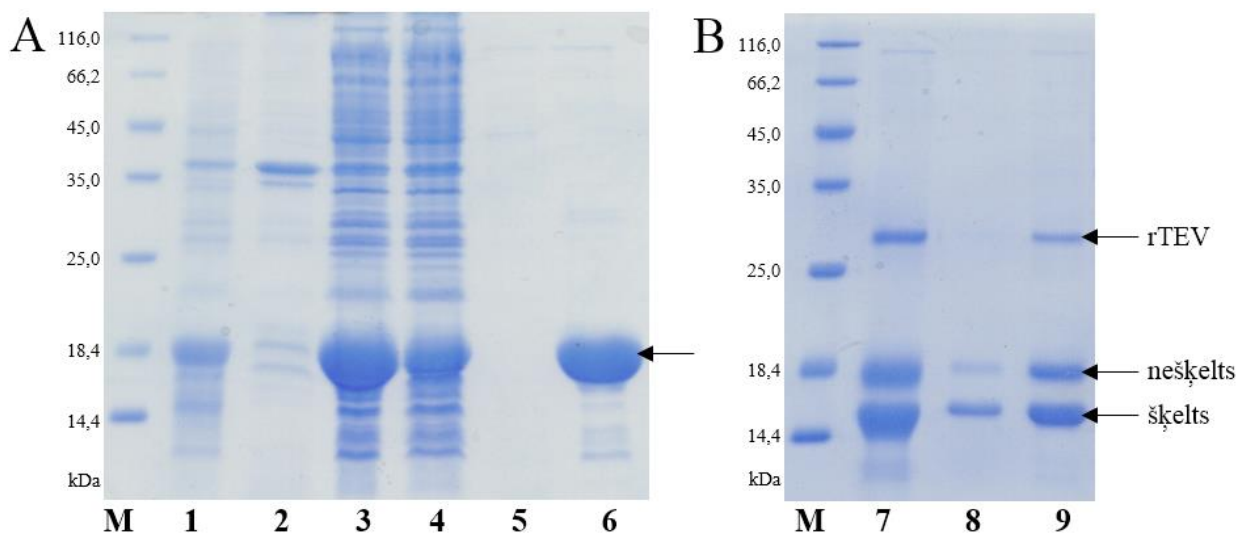


19. attēls. pETDt_Enc_HisORF3 plazmīdas elementu shematiskais attēlojums (mērogs netiek ievērots). Rekombinantā plazmīda paredzēta T7 promotera (T7p) kontrolētai ar *His-tag* iezīmēta ORF3 proteīna ekspresijai. *lacI* – laktozes operona represora gēns, *AmpR* – ampicilīna rezistences gēns.

Figure 19. A schematic representation of pET_Enc_HisORF3 plasmid components (not to scale). The recombinant plasmid allows for T7 promoter-controlled expression of *His-tagged* ORF3 protein. *lacI* – lactose operon repressor gene, *AmpR* – ampicillin resistance gene.

Veicot sākotnēju ekspresiju analītiskā 100 mL ekspresijas šūnu kultūrā, tika noskaidrots, ka HisORF3 proteīnam ir augsts sintēzes līmenis. Pēc lizēšanas ar ultraskaņu un frakcionēšanas tas identificējams galvenokārt šūnu lizāta šķīstošajā frakcijā, no kuras mērķa proteīns tika attīrīts ar HisTrap FF crude metālafinitātes kolonnu (20. attēls, a). Taču turpmākā HisORF3 attīrīšana bija

nesekmīga, jo pēc šķelšanas ar rTEV proteāzi nebija iespējams atdalīt *His-tag* nesaturošo proteīnu no nesašķeltā (20. attēls, b), kas liecināja par šķeltā un nešķeltā proteīna ko-agregāciju. Turklāt rTEV šķelšanas reakcija notika ar zemu efektivitāti, kuru nebija iespējams būtiski uzlabot ar ilgāku inkubācijas laiku vai papildus proteāzes pievienošanu.

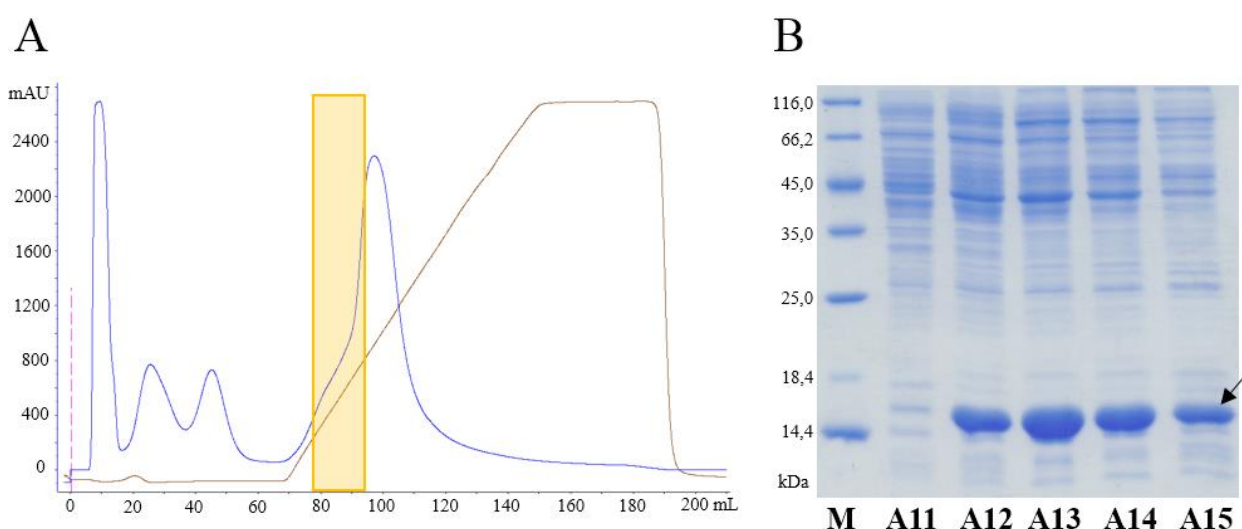


20. attēls. HisORF3 proteīna (15,3 kDa) sākotnējās (a) un pēcšķelšanas (b) attīrīšanas analīze ar Kumasī krāsotā PAAG. M – marķieris, 1 – HisORF3 producējošo šūnu lizāts, 2 – lizāta nogulsnes, 3 – lizāta supernatants, 4 – HisTrap caurplūdes frakcija (CF), 5 – eluācijas buferšķīduma I CF, 6 – eluācijas buferšķīduma II CF, 7 – ar rTEV šķelts proteīns, 8 – pēcšķelšanas HisTrap CF, 9 – pie kolonnas saistīto proteīnu frakcija. Ar bultiņām norādīts nešķelts un šķelts ORF3 proteīns un rTEV proteāze.

Figure 20. Coomassie-stained PAAG analysis of the initial (a) and rTEV protease-treatment (b) stages in the purification of the HisORF3 protein (15,3 kDa). M – marker, 1 – lysate of HisORF3 producing cells, 2 – cell debris, 3 – supernatant from the lysate, 4 – HisTrap flow-through (FT), 5 – FT of elution buffer solution I, 6 – FT of elution buffer solution II, 7 – protein after treatment with rTEV, 8 – post-cleavage HisTrap FT, 9 – column-bound protein fraction. The location of uncleaved and cleaved ORF3 protein and rTEV protease is indicated by arrows.

Tā kā *His-tag* iezīme neatviegloja proteīna attīrīšanu, turpmākajiem pētījumiem tika izveidota jauna plazmīda neiezīmēta (natīva) ORF3 ekspresijai – pETDt_Enc_ORF3nat (2. pielikums, b). Tās konstruēšanai ORF3 gēns tika amplificēts no bakteriofāga genomiskās sekvences ar oligonukleotīdiem, kas satur restrikcijas enzīmu *PscI* un *BspTI* atpazīšanas vietas. Vektors klonēšanai tika iegūts no pETDt_Enc_HisORF6, plazmīdu šķeļot ar restriktāzi *NcoI*, kas veido ar *PscI* savietojamas pārkāres, un *BspTI*. ORF3 sekvenci saturošie kloni tika identificēti ar *XbaI* un *BspTI* restrikcijas analīzi un sekvenēti inserta sekvences atbilstības pārbaudīšanai.

ORF3nat proteīns tika producēts 400 mL kultūrā, iegūstot apmēram 3 g ekspresijas šūnu. No tām ~1 g tika resuspendēts 6 mL 20 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl šķīdumā un lizēts ar ultraskaņu, ar sekojošu lizāta šķīstošās un nešķīstošās frakcijas atdalīšanu centrifugējot. ORF3nat proteīna produkcija un šķīdība bija līdzīga kā HisORF3 (nav parādīts). Proteīna attīrīšana no šūnu lizāta tika uzsākta ar anjonu apmaiņas hromatogrāfiju, izmantojot HiPrep DEAE kolonnu, no kuras piesaistīto proteīnu maisījums tika eluēts ar 100 mM – 1 M NaCl gradientu (21. attēls, a). Svarīgi piebilst, ka ORF3nat proteīnam nav UV gaismas absorbcijas īpašību pie 280 nm viļņu garuma, jo tas nesatur tirozīna vai triptofāna atlikumus. Šī iemesla dēļ proteīna identifikācijai nepieciešama visu iegūto frakciju pārbaude PAAG. ORF3nat tika detektēts frakcijās A12-A15 (21. attēls, b).

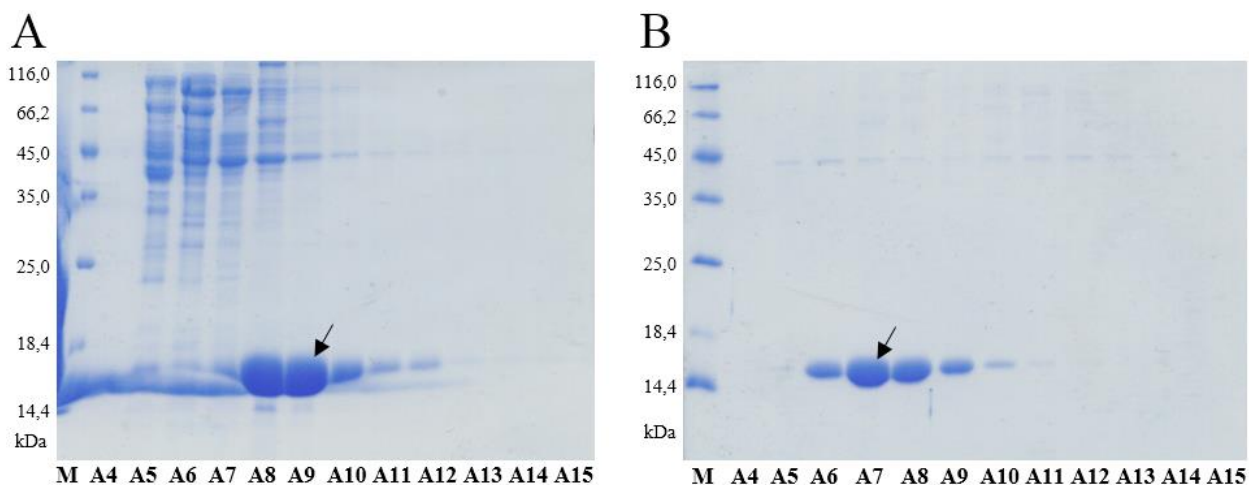


21. attēls. ORF3nat proteīna attīrīšana ar HiPrep DEAE anjonu apmaiņas kolonnu. Attēlota hromatogramma (a) un frakciju analīze ar Kumasī krāsotā PAAG (b). Ar zilu līkni attēlota absorbcija pie 280 nm, ar brūnu – konduktivitāte, kas atbilst sāls koncentrācijai, ar dzeltenu taisnstūri attēlots A12-A15 frakcijām atbilstošais reģions. Ar bultiņu norādīta ORF3nat atrašanās vieta gēlā.

Figure 21. Purification of ORF3nat protein on a HiPrep DEAE anion-exchange column. Figure shows chromatogram (a) and fraction analysis in Coomassie-stained PAAG (b). Absorption at 280 nm is represented as a blue line, conductivity (salt concentration) as a brown line and the area corresponding to fractions A11-A15 is highlighted by a yellow rectangle. The position of ORF3nat in the gel is indicated by an arrow.

Iegūto frakciju analīze PAAG liecināja, ka šāds sākotnējais attīrīšanas solis ļauj ORF3nat daļēji, tomēr efektīvi atdalīt no citu šķīstošo proteīnu piemaisījuma. Mērķa proteīnu saturošās frakcijas A12-A14 tika apvienotas un atsāļotas ar HiTrap Desalting gēlfiltrācijas kolonnu līdz 20 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl. Attīrīšana tika turpināta ar stipru anjonu apmaiņas kolonnu

MonoQ 100 mM – 1 M NaCl gradientā un visu iegūto frakciju pārbaudi PAAG (22. attēls, a). Lielākais ORF3nat proteīna daudzums tika konstatēts frakcijās A8 un A9, no kurām pēdējā proteīns bija ievērojami tīrāks. A9 frakcija tika izmantota turpmākai mērķa proteīna attīrīšanai ar Superdex 200 gēlfiltrācijas kolonnu, ar kuru ORF3nat tika attīrīts līdz kristalizācijai pietiekamai homogenitātei (22. attēls, b).



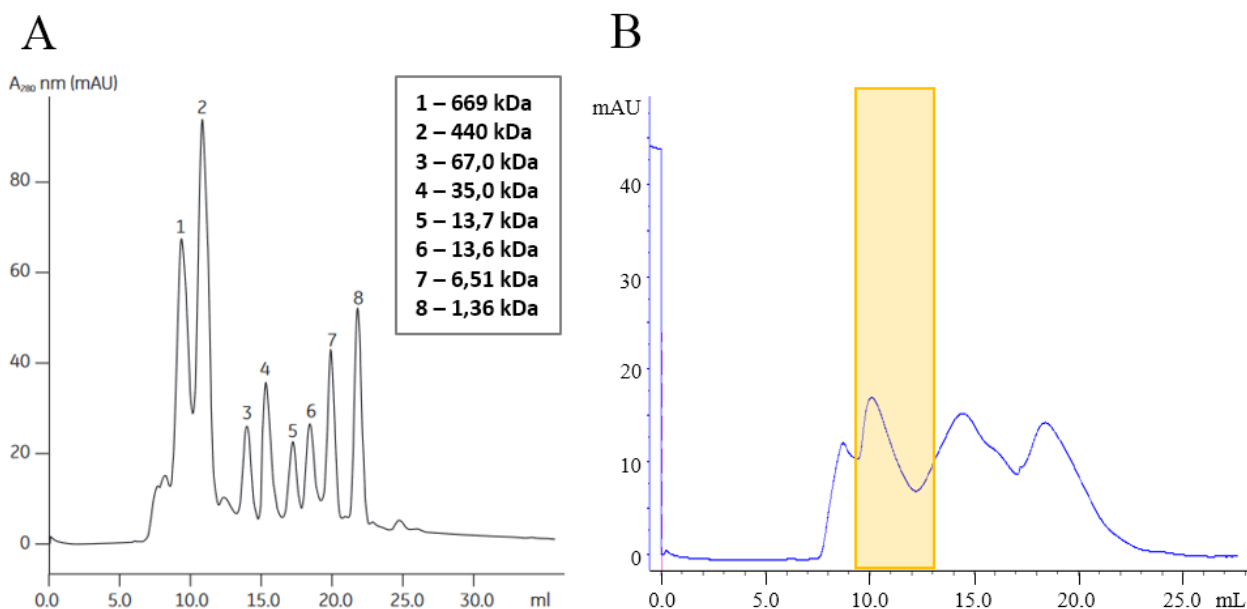
22. attēls. Frakciju analīze Kumasī krāsotā PAAG pēc ORF3nat proteīna attīrīšanas uz MonoQ (a) un Superdex 200 (b) kolonnām. Bultiņas norāda uz ORF3nat proteīnu.

Figure 22. Fraction analysis in Coomassie-stained PAAG after ORF3nat purification on MonoQ (a) and Superdex 200 (b) columns. The arrows indicate ORF3nat in the gels.

Tā kā ORF3nat koncentrāciju nav iespējams noteikt spektrofotometriski, tā tika novērtēta vizuāli pēc zonas izmēra PAAG kā apmēram 2 mg/mL gēlfiltrācijas frakcijā A7. Mērķa proteīns tika koncentrēts ar 3 kDa molekulmasu ierobežojošu proteīnu koncentratoru līdz ~10 mg/mL un atkārtoti analizēts PAAG, koncentrācijas aptuvenai novērtēšanai (nav parādīts). Ar koncentrēto proteīnu tika veikti kristalizēšanas mēģinājumi, izmantojot JCSG-plus HT-96, kā arī PACT premier HT-96 kristalizācijas šķīdumu kitu, tomēr pagaidām proteīna kristālus nav izdevies iegūt. Turpmāk plānots veikt ORF3nat kristalizācijas izpēti ar kitiem Structure Screen 1 & 2 HT-96, MIDAS HT-96 un Morpheus HT-96.

Zināmu interesi izraisa gēlfiltrācijas hromatogrāfijā gūtais novērojums, ka ORF3nat proteīns 20 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl šķīdumā, tātad fizioloģiskajai sāls koncentrācijai tuvos apstākļos, pastāv augsti oligomerizētā, bet ne agregētā formā. ORF3nat monomēra molekulmasa ir 13,0 kDa, savukārt no Superdex 200 kolonnas tas eluējas plašā molekulmasu diapazonā (pēc

kolonnas kalibrācijas līknes 23. attēlā, a) ar vismaz pentamērisku multimerizāciju (23. attēls, b). Vairākām DNS replikācijas proteīnu grupām raksturīga oligomēru uzbūve, un no tām labāk izpētītās ir helikāzes, procesivitātes faktori un DNS *skavu lādētājproteīni*, tomēr sekvenču līdzība ar šo grupu pārstāvjiem netika atklāta.



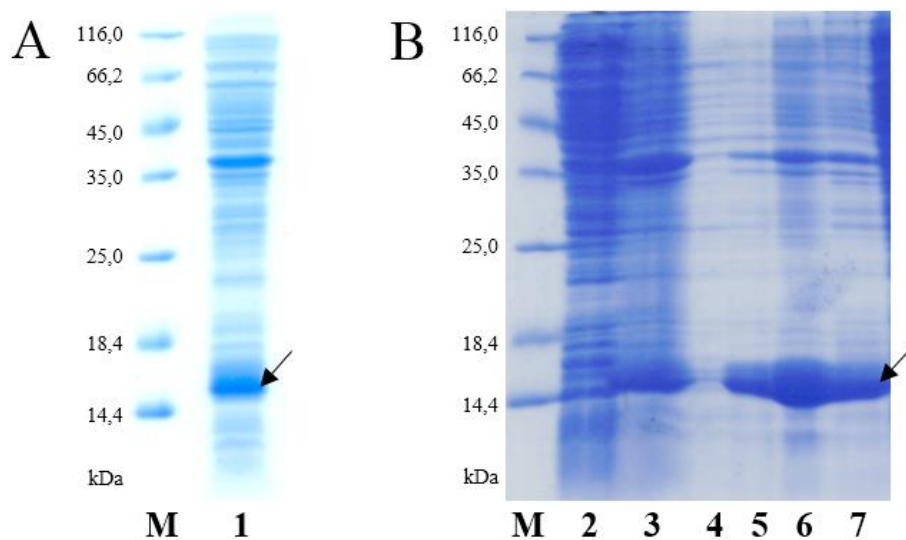
23. attēls. Superdex 200 kolonnas kalibrācijas līkne (a) un ORF3nat gēlfiltrācijas hromatogramma (b), kurā ar zilu līkni parādīta absorbcija pie 280 nm un ar dzeltenu taisnstūri izcelts A6-A9 frakcijām atbilstošais reģions.

Figure 23. Calibration curve of the Superdex 200 column (a) and gel filtration chromatogram of ORF3nat protein (b), in which protein absorption curve is shown in blue and the region of ORF3nat elution fractions A6-A9 is highlighted by a yellow rectangle.

ORF3 proteīna PSI-BLAST analīze uzrāda attālu homoloģiju (26% sekvenču identitāte 68% pārklājumā) ar *Pseudoalteromonas* fāga B8b proteīnu RecT – ssDNS saistošu un hibridizējošu proteīnu ar iespējamām funkcijām homologajā rekombinācijā un DNS reparācijā (Lara *et al.*, 2015). Savukārt *E. coli* profāga Rac kodētais RecT ir pētīts elektronmikropiski, parādot, ka šķīdumā tas veido gredzenveida oligomērus no septiņiem vai astoņiem RecT proteīna monomēriem (Thresher *et al.*, 1995). Lai gan vilinoši spekulēt par ORF3 iespējamo lomu DNS rekombinācijā, pašreizējie dati nav pietiekami secinājumu izdarīšanai par ORF3 proteīna funkcijām.

3.3. Bakteriofāga Enc34 proteīns ORF4

Ar *His-tag* iezīmēta ORF4 (HisORF4) ekspresijai tika konstruēta rekombinanta plazmīda pETDt_Enc_HisORF4 (2. pielikums, c) tāpat kā aprakstīts iepriekš HisORF3 gadījumā. Ar izveidoto plazmīdu transformētas ekspresijas šūnas tika kultivētas proteīna produkcijai analītiskā 100 mL tilpumā, sekojoši veicot to lizēšanu. HisORF4 proteīnam tika konstatēts samērā augsts sintēzes līmenis (24. attēls, a), tomēr tas izrādījās nešķīstošs. Tāpēc nogulsnes pēc lizāta centrifugēšanas tika šķīdinātas denaturējošos apstākļos – pakāpeniski ar 2 M, 4 M un 8 M urīnvielu saturošu līzes buferšķīdumu, un ekstrakcijas paraugi tika analizēti PAAG (24. attēls, b).

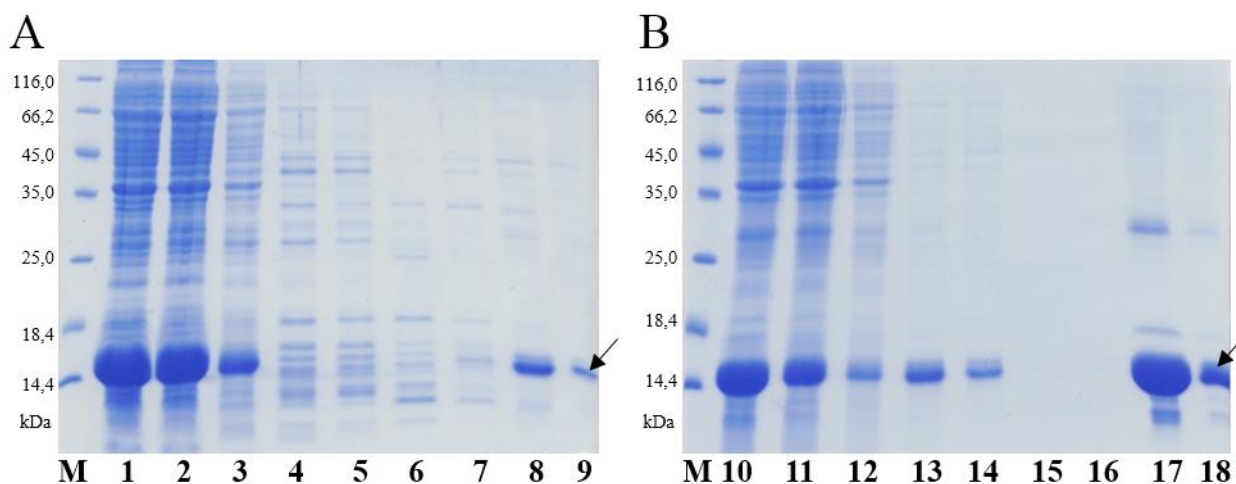


24. attēls. HisORF4 proteīna (14,3 kDa) produkcija (a) un ekstrakcija no lizāta nogulsnēm (b), kas analizēta ar Kumasī krāsotā PAAG. M – marķieris, 1 – HisORF4 producējošo šūnu lizāts, 2 – lizāta supernatants, 3 – lizāta nogulsnes, 4 – nogulšņu 2 M urīnvielas ekstrakts, 5 – nogulšņu 4 M urīnvielas ekstrakts, 6 – nogulšņu 8 M urīnvielas ekstrakts, 7 – lizāta nogulšņu saturs ekstrakcijas procesa beigās. Bultiņas norāda uz HisORF4 proteīnu.

Figure 24. Production (a) and extraction (b) of the HisORF4 protein (14,3 kDa), analysed by Coomassie-stained PAAG. M – marker, 1 – lysate of HisORF4 producing cells, 2 – supernatant from the lysate, 3 – cell debris, 4 – 2 M urea extract from debris, 5 – 4 M urea extract from debris, 6 – 8 M urea extract of debris, 7 – contents of insoluble debris at the end of the extraction process. The arrow indicates HisORF4 protein.

Lai gan 8 M urīnvielas ekstraktā ir lielāks mērķa proteīna daudzums, HisORF4 šķīdināšanai pietiek ar vājāk denaturējošu 4 M urīnvielas koncentrāciju. Turpmākai izpētei tika iegūti vēl ~3 g ekspresijas šūnu, no kurām ~1 g tika lizēts un frakcionēts tāpat kā iepriekš. Lizāta nogulsnes tika šķīdinātas 4 M urīnvielā, un iegūtais ekstrakts tika izmantots HisORF4 attīrīšanas un *refoldinga*

eksperimentam ar HisTrap FF crude kolonnu. Caurplūdes frakciju vizualizācija PAAG parādīja, ka lielākā daļa mērķa proteīna pie kolonnas nepiesaistās (25. attēls, a). Acīmredzot HisORF4 agregātu daļēja denaturācija 4 M urīnvielas buferšķīdumā nenodrošina histidīnu iezīmes eksponēšanu uz proteīnu virsmas, tādēļ kolonnas caurplūdes frakcijai tika pievienota urīnviela līdz 8 M koncentrācijai, lai atkārtotu *refoldinga* procedūru augsti denaturējošos apstākļos. Visas frakcijas tika analizētas PAAG tāpat kā iepriekš, tomēr, lai arī HisORF4 nedaudz labāk saistījās pie kolonnas, *refoldings* nendenaturējošos apstākļos nenotika (25. attēls, b).



25. attēls. HisORF4 *refoldinga* analīze ar Kumasī krāsotā PAAG pēc nešķīstoša proteīna denaturācijas ar 4 M (a) un 8 M (b) urīnvielu. M – marķieris, 1, 10 – nogulšņu urīnvielas ekstrakts, 2, 11 – HisTrap CF, 3, 12 – līzes buferšķīduma ar urīnvielu CF, 4, 13 – eluācijas buferšķīduma I ar urīnvielu CF, 5, 14 – līzes buferšķīduma bez urīnvielas CF, 6, 15 – eluācijas buferšķīduma II bez urīnvielas CF (*refoldinga* frakcija), 7, 16 – līzes buferšķīduma ar urīnvielu CF, 8, 17 – eluācijas buferšķīduma II ar urīnvielu CF, 9, 18 – kolonnas skalošanas frakcija ar līzes buferšķīdumu. Bultiņas norāda uz HisORF4 proteīnu.

Figure 25. HisORF4 refolding analysis by Coomassie-stained PAAG after denaturation of the insoluble protein with 4 M (a) and 8 M (b) urea. M – marker, 1, 10 – urea extract from debris, 2, 11 – HisTrap FT, 3, 12 – FT of lysis buffer solution with urea, 4, 13 – FT of elution buffer solution I with urea, 5, 14 – FT of lysis buffer solution without urea, 6, 15 – FT of elution buffer solution II without urea (the refolding fraction), 7, 16 – FT of lysis buffer solution with urea, 8, 17 – FT of elution buffer solution II with urea, 9, 18 – column wash fraction with lysis buffer solution. The arrows point to HisORF4 protein.

Turpinot darbu, augstas imidazola koncentrācijas eluācijas frakcija ar 8 M urīnvielu (25. attēls, 17. celiņš) tika dializēta pret 20 mM Tris-HCl pH 8,0 300 mM NaCl, taču nendenaturējošos apstākļos mērķa proteīns veidoja nogulsnes. *Refoldinga* eksperimenti tika atkārtoti, līdzīgi kā aprakstīts iepriekš, denaturācijai izmantojot 6 M guanidīna hidrochlorīdu (GuHCl), tomēr HisORF4

refoldings netika panākts un renaturācija ar dialīzi bija nesekmīga arī šajā gadījumā (nav parādīts). Turpmākie eksperimenti tiks vērsti uz ORF4 proteīna šķīdības uzlabošanu. Šim nolūkam tiks veikta (1) ar maltozes saistošo proteīnu (MBP) sapludināta ORF4 izveide un/vai (2) ORF4 proteīna koekspresija ar molekulārajiem šaperoniem. Ja izdosies iegūt pietiekamu šķīstoša proteīna daudzumu, tiks veikta tā attīršana un kristalizācijas pārbaude.

ORF4 sekvenču analīze ar BLASTP uzrāda homoloģiju ar *Chi-līdzīgo Salmonella* fāgu hipotētiskajiem proteīniem un ļoti attālu līdzību starp ORF4 C-terminālo ~100 aminoskābju segmentu un *Pseudolabrys* sp. metiltransferāzes (MTāzes) domēnu, lai gan pilna garuma sekvenču identitāte ir tikai 38%. MTāžu gēni identificēti ir vairāku lītisko un lizogēno bakteriofāgu (t. sk., enterobaktēriju vīrusu) genomos. Šie enzīmi nodrošina fāga DNS aizsardzību pret saimniekšūnas restrikcijas endonukleāzēm (Murphy *et al.*, 2013). Atsevišķiem *Lactococcus lactis* fāgiem tie lokalizēti tieši DNS replikācijas modulī (Murphy *et al.*, 2014). Tomēr ORF4 proteīna gadījumā sekvenču līdzība nav pietiekami pārlicinoša proteīna funkcijas prognozēšanai.

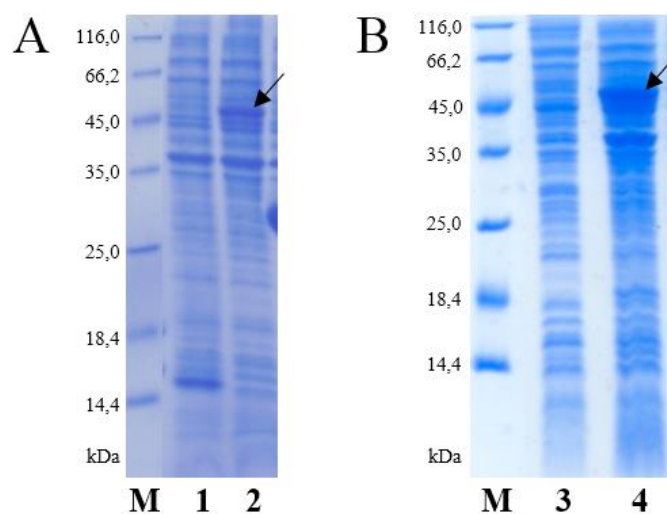
3.4. Bakteriofāga Enc34 proteīns ORF5

Uzsākot maģistra darba pētījumus, GenBank datubāzē ORF5 tika anotēts kā hipotētisks proteīns ar nezināmas funkcijas konservatīvu domēnu DUF2800. Taču saskaņā ar pēdējo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) konservatīvo domēnu datubāzes atjauninājumu, DUF2800 ir ieguvis funkcionālu anotāciju – ar CRISPR/Cas sistēmu asociēta proteīna Cas4 domēns (PSSM ID: 275638) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Cas4 proteīni ir ssDNS eksonukleāzes ar RecB *foldu* un dzelzs-sēra klāsteri, kuru koordinē četri konservatīvi cisteīna atlikumi (Zhang *et al.*, 2012). Enc34 ORF5 proteīna aminoskābju analīzē ar ConSurf serveri kā atbilstošie konservatīvie atlikumi tika atklāti Cys23, Cys239, Cys242 un Cys248. Šobrīd strukturāli ir izpētīti divi Cas4 proteīni no baktērijām *Pyrobaculum calidifontis* (PDB No. 4R5Q; Lemak *et al.*, 2014) un *Sulfolobus solfataricus* (PDB No. 4IC1; Lemak *et al.*, 2013), turklāt abu proteīnu sekvenču uzrāda būtisku homoloģiju ar bakteriofāga Enc34 ORF5 analīzē ar programmu HHpred. *P. calidifontis* Cas4 nukleāze ir monomērs, bet *S. solfataricus* proteīna kristālstruktūrai ir dekamēriska gredzenveida uzbūve no pieciem cieši saistītiem dimēriem (Lemak *et al.*, 2013).

Klāsterēti regulāri iestarpināti īsi palindromiskie atkārtojumi (CRISPR; *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) un ar tiem asociētie proteīni (Cas) ir nesen atklātas

prokariotu adaptīvās imūnsistēmas komponenti. To darbība pasargā šūnu no sveša ģenētiskā materiāla – bakteriofāgiem un plazmīdām, šķēļot invazīvo DNS atkārtotas infekcijas gadījumā sekvenču specifiskā veidā (Wiedenheft *et al.*, 2012). Cas4 proteīna loma ir svešās DNS šķelšana, sekmējot tās fragmentu iekļaušanu CRISPR reģionā turpmākai sekvenču atpazīšanai. Līdz šim raksturots tikai viens bakteriofāgu kodēts Cas4 proteīns no *Campylobacter jejuni* inficējoša vīrusa. Pētījuma autori parāda, ka fāga Cas4 darbības rezultātā *C. jejuni* CRISPR lokusā tiek integrētas saimniekorganisma sekvenču un ierosina diskusiju par bakteriofāgu izraisītu “autoimunitāti” (Hooton *et al.*, 2016). Tomēr ORF5 funkcijas saistīšana ar CRISPR/Cas mehānismu bez strukturāliem pierādījumiem būtu pārsteidzīga, jo DNS eksonukleāzes ir iesaistītas dažādos DNS metabolisma procesos, galvenokārt, homologajā rekombinācijā dsDNS pārrāvumu labošanai.

Proteīna ORF5 pētījumiem *in vitro* pēc iepriekš aprakstītas klonēšanas shēmas tika izveidota plazmīda pETDt_Enc_HisORF5 (2. pielikums, d), ar kura transformētas ekspresijas šūnas tika kultivētas ar *His-tag* iezīmēta ORF5 (HisORF5) ieguvei. Ar šūnu lizāta pārbaudi PAAG tika noskaidrots, ka mērķa proteīnam ir vidēji augsts sintēzes līmenis (26. attēls, a), taču pēc frakcionēšanas tas atrodas nešķīstošajā frakcijā (26. attēls, b).



26. attēls. HisORF5 proteīna (52,1 kDa) produkcijas (a) un šķīdības pārbaude (b) ar Kumasī krāsotā PAAG. M – marķieris, 1 – par negatīvo kontroli izmantots HisORF4 producējošu šūnu lizāts, 2 – HisORF5 producējošu šūnu lizāts, 3 – lizāta supernatants, 4 – lizāta nogulsnes. Bultiņas norāda uz mērķa proteīnu.

Figure 26. Coomassie-stained PAAG analysis of production (a) and solubility (b) of the HisORF5 (52,1 kDa) protein. M – marker, 1 – lysate of HisORF4-producing cells as a negative control, 2 – lysate of HisORF5-producing cells, 3 – supernatant of the lysate, 4 – cell debris. The arrows point to the target protein.

Lizāta nogulšņu šķīdināšanas eksperimentos tika izpētīts, ka efektīvai HisORF5 ekstrakcijai nepieciešams 6M GuHCl (nav parādīts). Tāpat kā HisORF4 gadījumā, darbs tika turpināts ar mērķa proteīna *refoldinga* analīzi: (1) ~1 g ekspresijas šūnu tika lizēts un frakcionēts, (2) iegūtās nogulsnes tika resuspendētas līzes buferšķīdumā ar 1 M urīnvielu vieglāk ekstrahējamo proteīnu atdalīšanai, un (3) nešķīstošā frakcija tika ekstrahēta ar 6 M GuHCl, proteīnu ekstraktu tālāk izmantojot *refoldinga* eksperimentam. Iegūto frakciju analīze PAAG parāda, ka neliela daļa mērķa proteīna saglabājas šķīstošajā frakcijā pēc denaturējošu apstākļu novēršanas (27. attēls). Turpmākajos pētījumos tika veikta renaturētā HisORF5 analītiska gēlfiltrācija, novērojot, ka HisORF5 pastāv augsti oligomerizētā vai, iespējams, agregētā formā (nav parādīts, bet raksturots turpmāk).

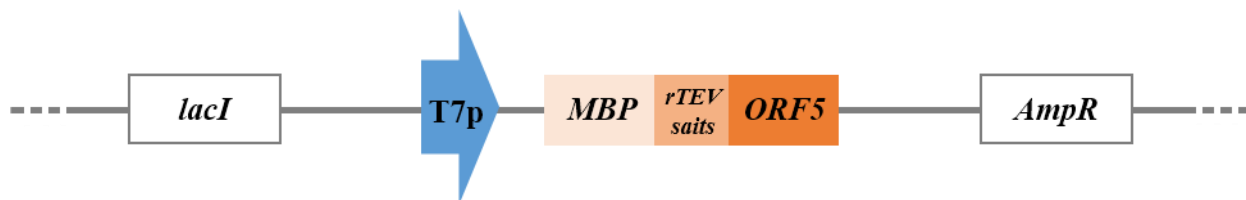


27. attēls. HisORF5 proteīna *refoldinga* analīze ar Kumasī krāsotā PAAG pēc nešķīstoša proteīna denaturācijas ar 6 M GuHCl. M – marķieris, 1 – šūnu lizāta supernatants, 2 – lizāta nogulsnes, 3 – nogulšņu 1 M urīnvielas ekstrakts, 4 – HisTrap CF, 5 – līzes buferšķīduma ar GuHCl CF, 6 - eluācijas buferšķīduma I ar GuHCl CF, 7 – līzes buferšķīduma CF, 8 – eluācijas buferšķīduma II CF, 9 – līzes buferšķīduma ar GuHCl CF, 10 – eluācijas buferšķīduma II ar GuHCl CF, 11 – kolonnas skalošanas frakcija ar līzes buferšķīdumu. Bultiņa norāda uz renaturētu HisORF5 proteīnu.

Figure 27. Coomassie-stained PAAG analysis of HisORF5 refolding after denaturation of the insoluble protein with 6 M GuHCl. M – marker, 1 – cell lysate supernatant, 2 – debris, 3 – 1 M urea extract from debris, 4 – HisTrap FT, 5 – FT of lysis buffer solution with GuHCl, 6 – FT of elution buffer solution I with GuHCl, 7 – FT of lysis buffer solution, 8 – FT of elution buffer solution II, 9 – FT of lysis buffer solution with GuHCl, 10 – FT of elution buffer solution II with GuHCl, 11 – column wash fraction with lysis buffer solution. The arrow points to the refolded HisORF5 protein.

Paralēli darbam ar HisORF5 tika izveidota plazmīda pETDt_Enc_MBP-ORF5 (28. attēls; 2. pielikums, e), kura kodē ar MBP sapludinātu ORF5 proteīnu (MBP-ORF5). Tās konstrukcijai tāpat kā iepriekš amplificēts ORF5 fragments tika šķelts ar restriktāzēm *StuI* un *BspTI* un klonēts

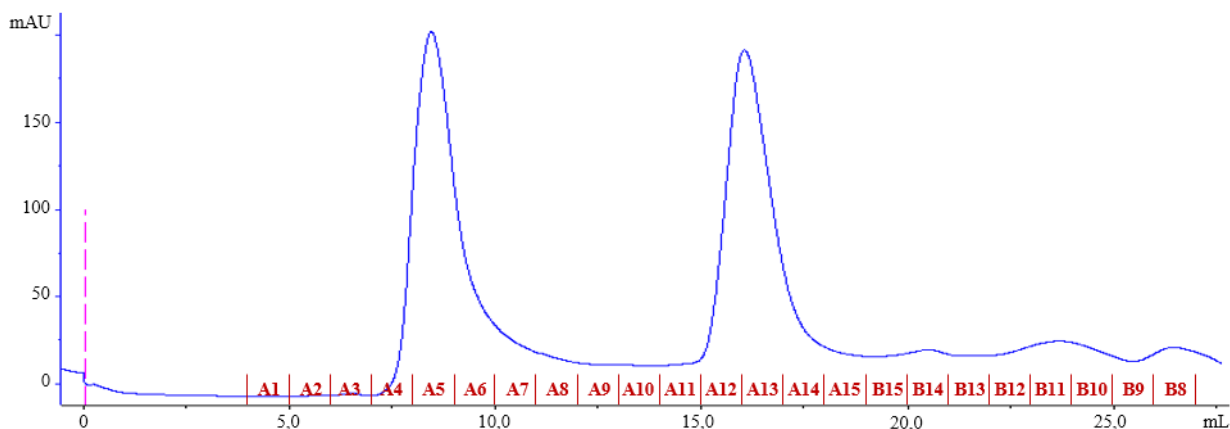
atbilstoši šķeltā vektorā pETDt_MalE (no laboratorijas kolekcijas), kas satur MBP un rTEV proteāzes šķelšanas sekvenci (2. pielikums, f).



28. attēls. pETDt_Enc_MBP-ORF5 plazmīdas elementu shematiskais attēlojums (mērogs netiek ievērots). Rekombinantā plazmīda paredzēta T7 promotera (T7p) kontrolētai ar maltozi saistošo proteīnu (MBP) sapludināta ORF5 ekspresijai. *lacI* – laktozes operona represora gēns, *AmpR* – ampicilīna rezistences gēns.

Figure 28. Schematic representation of pET_Enc_MBP-ORF5 plasmid components (not to scale). The recombinant plasmid allows for T7 promoter-controlled expression of ORF5 protein fused with the maltose binding protein (MBP). *lacI* – lactose operon repressor gene, *AmpR* – ampicillin resistance gene.

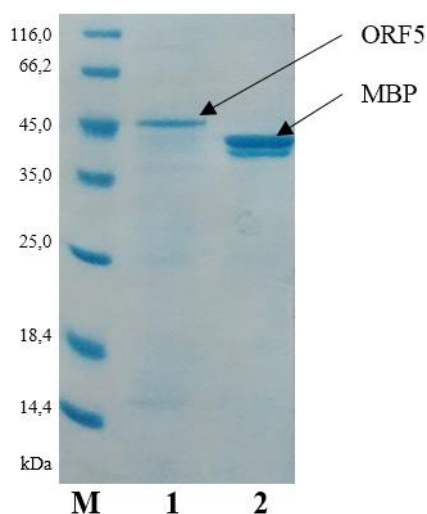
Veicot MBP-ORF5 ekspresijas šūnu lizātu analīzi PAAG, tika noskaidrots, ka mērķa proteīns ir šķīstošs. Pēc lizāta šķīstošās frakcijas attīrīšanas ar MBP saistošu afinitātes kolonnu MBPTrap HP sapludinātais proteīns tika šķelts ar rTEV proteāzi. Turpmākā attīrīšana tika veikta ar gēlfiltrāciju, novērojot divus gandrīz vienāda augstuma absorbcijas pīķus, kas pēc Superdex 200 kolonnas kalibrācijas līknes (skat. 23. attēlu, a) atbilst apmēram 500-600 kDa un 30-40 kDa molekulmasas reģionam (29. attēls).



29. attēls. MBP un ORF5 proteīna maisījuma gēlfiltrācijas hromatogramma. Ar zilu līkni attēlota proteīnu absorbcija.

Figure 29. Gelfiltration chromatogram of MBP and ORF5 protein mixture. Curve in blue represents protein absorption.

Absorbcijas maksimumiem atbilstošo frakciju – A5 un A13 – pārbaudē ar PAAG tika noskaidrots, ka pirmā satur attīrītu ORF5, bet otrā – MBP (30. attēls). Tāpat kā iepriekš tika novērots HisORF5 gadījumā, arī no MBP atšķeltais ORF5 proteīns ir augsti oligomerizēts/agregēts. Tomēr sekmīga abu proteīnu atdalīšana pēc sapludināta MBP-ORF5 šķelšanas ir iespējama norāde tam, ka mērķa proteīns neveido šķīstošus agregātus, bet var būt funkcionāls oligomērs, līdzīgi kā tiek novērots homologam proteīnam no *S. solfataricus* ar gredzenveida dekamēru ceturtējo struktūru (Lemak *et al.*, 2013). Šī hipotēze tiks pārbaudīta ar ORF5 proteīna struktūras elektronmikroskopisku izpēti.



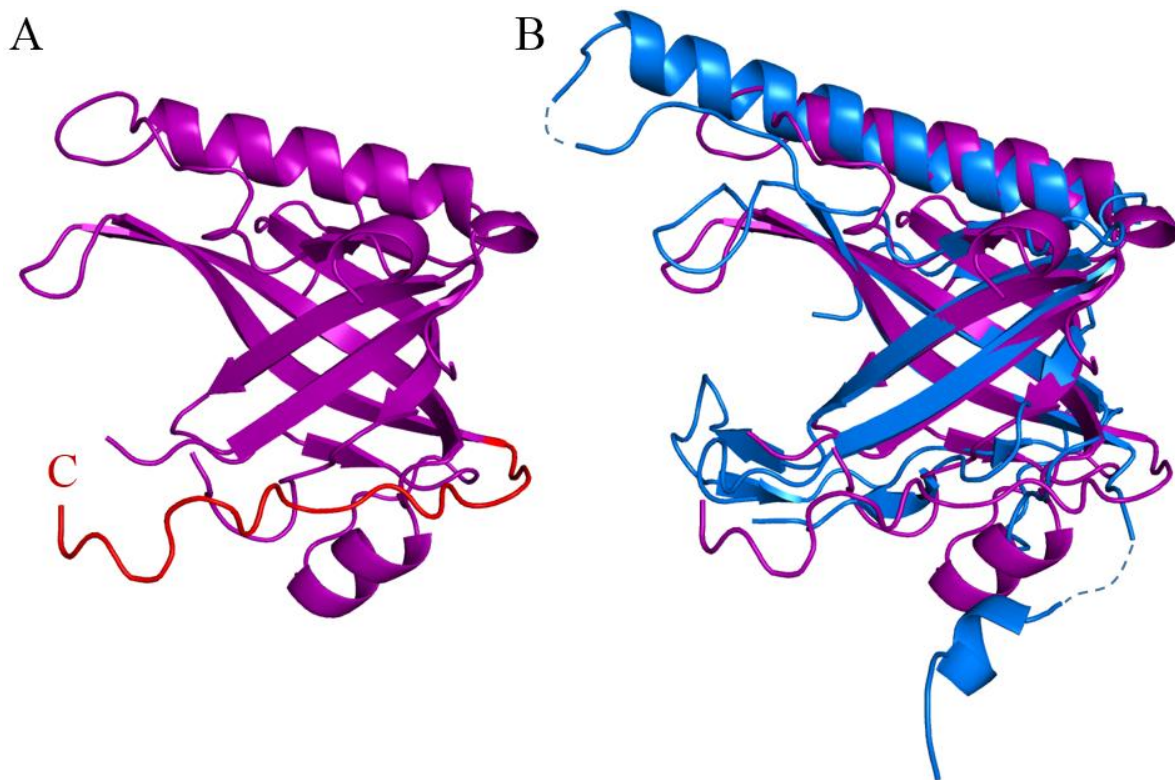
30. attēls. MBP-ORF5 pēcšķelšanas maisījuma gēlfiltrācijas frakciju analīze ar Kumaši krāsotā PAAG. M – marķieris, 1 – frakcija A5, 2 – frakcija A13. Bultiņas norāda uz ORF5 (50,0 kDa) un MBP (40,3 kDa).

Figure 30. Coomassie-stained PAAG analysis of selected fractions from MBP-ORF5 post-cleavage mixture gelfiltration. M – marker, 1 – fraction A5, 2 – fraction A13. The arrows point to ORF5 (50,0 kDa) and MBP (40,3 kDa).

Abas pārbaudītās ORF5 izolēšanas metodes – *refoldings* un ekspresija sapludināta proteīna veidā – ļauj iegūt nelielu šķīstošā proteīna daudzumu, taču nedaudz efektīvāka, kā arī mazāk laikietilpīga ir MBP-ORF5 ekspresijas un attīrīšanas platforma, jo sākotnēji tiek iegūts šķīstošs proteīns. Ja elektronmikroskopijas rezultāti liecinās, ka ORF5 pastāv strukturāli organizētu oligomēru veidā, darbs tiks turpināts ar preparatīvu mērķa proteīna attīrīšanu kristalizācijas eksperimentiem.

3.5. Bakteriofāga Enc34 proteīns ORF6

Bakalaura darba ietvaros tika noteikta ORF6 proteīna kristālstruktūra un veikta tās detalizēta analīze. Proteīna monomēru veido N-termināls OB *folda* domēns un nestrukturēts, negatīvi lādēts C-terminālais segments (31. attēls, a). Neraugoties uz zemu sekvenču līdzību, strukturāla homoloģija pārlicinoši parāda, ka ORF6 proteīns pieder T7 fāga gp2.5 SSB grupai (31. attēls, b).



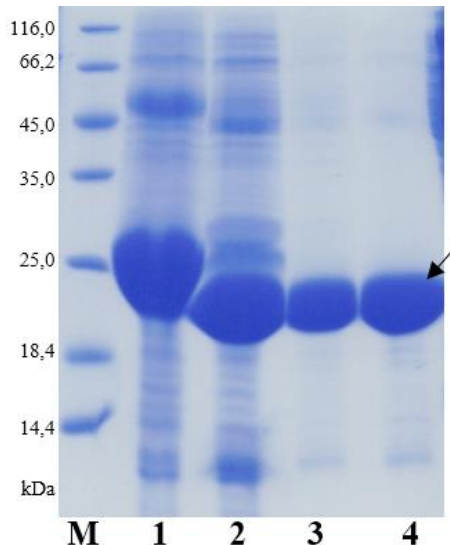
31. attēls. Enc34 ORF6 proteīna kristālstruktūra (a) un tās superimpozīcija ar T7 gp2.5 (b). ORF6 – violets, attēlā pa kreisi ar sarkanu izcelts proteīna C-terminālais reģions, gp2.5 – zils. Attēli veidoti ar PyMOL (DeLano, 2002).

Figure 31. Crystal structure of the Enc34 ORF6 protein (a) and its superimposition onto the gp2.5 protein from phage T7 (b). ORF6 is shown in purple, with the C-terminal region in red in the left panel, and the T7 gp2.5 protein in blue. The figures were created using PyMol (DeLano, 2002).

Pamatojoties uz T7 gp2.5 mutāģenēzes eksperimentiem, šim proteīnam ir identificēti vairāki DNS saistībai obligāti nepieciešami aminoskābju atlikumi un izveidots teorētisks ssDNS saistīšanas modelis (Hyland *et al.*, 2003), tomēr proteīna-DNS kompleksa struktūra tā apstiprināšanai un/vai pilnveidošanai vēl joprojām nav noteikta. Līdz ar to par turpmāko prioritāti

ORF6 pētījumos tika izvirzīta šī proteīna struktūras noskaidrošana kompleksā ar ssDNS oligonukleotīdu, tomēr sākotnējie kokkristalizācijas mēģinājumi bija nesekmīgi. T7 gp2.5, kā arī *E. coli* SSB gadījumā ir zināms, ka proteīna C-terminālais segments mijiedarbojas ar OB *folda* domēnu ssDNS saistībai konkurējošā veidā (Marintcheva *et al.*, 2008; Shishmarev *et al.*, 2014). Homoloģija ar gp2.5 ļauj prognozēt līdzīgu ORF6 proteīna C-terminālā segmenta mijiedarbību ar šī proteīna ssDNS saistīšanas virsmu, tādēļ kristalizācijas eksperimentiem tika izveidots mutants proteīns ORF6 Δ 21 ar 21 aminoskābes delēciju no sekvenču C gala fleksiblā reģiona.

Visiem eksperimentiem mērķa proteīns tika izolēts pēc pārbaudītas shēmas, kas piemērota gan ORF6 Δ 21, gan ORF6 proteīna efektīvai attīrīšanai: (1) producēšana ar atbilstošajām plazmīdām (2. pielikums, g un h) transformētās ekspresijas šūnās, (2) attīrīšana no šūnu lizāta šķīstošās frakcijas ar HisTrap FF crude, (3) šķelšana ar rTEV proteāzi, (4) imidazola atdalīšana no preparāta ar HiTrap Desalting kolonnu, (5) atkārtota attīrīšana ar metālafinitātes kolonnu, (6) mērķa proteīnu saturošās frakcijas buferšķīduma nomaina uz 20 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl, un (7) MonoQ jonapmaiņas hromatogrāfija 100 mM – 1 M NaCl gradientā, attīrīšanas soļu norisi pārbaudot PAAG (32. attēls). Ar šādu metodiku no 1 g ekspresijas šūnu iespējams iegūt 4-5 mg augsti attīrīta mērķa proteīna.



32. attēls. ORF6 Δ 21 proteīna attīrīšanas analīze ar Kumasī krāsotā PAAG. M – marķieris, 1 – no HisTrap eluēts HisORF6 Δ 21, 2 – ar rTEV proteāzi šķelts proteīns, 3 – pēcšķelšanas HisTrap CF, 4 – ar MonoQ attīrīts proteīns. Bultiņa norāda uz mērķa proteīnu.

Figure 32. Purification analysis of ORF6 Δ 21 protein by Coomassie-stained PAAG. M – marker, 1 – HisORF6 Δ 21 eluted from HisTrap, 2 – protein cleaved by rTEV protease, 3 – HisTrap FT post-cleavage, 4 – protein purified by MonoQ. The arrow points to the target protein.

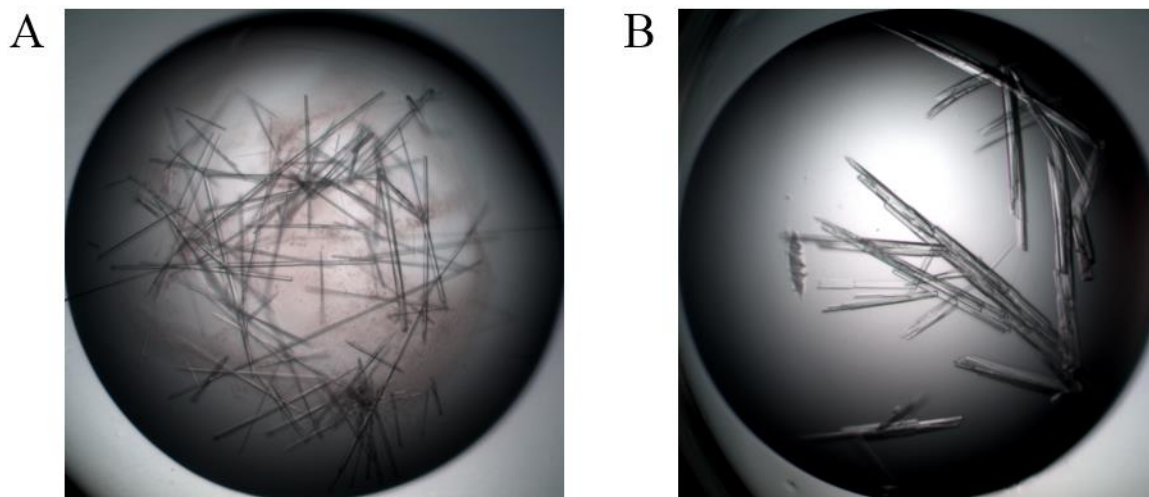
Attīrīts ORF6 Δ 21 tika koncentrēts ar 10 kDa molekulas masu ierobežojošu proteīnu koncentratoru līdz 10 mg/mL un sākotnēji kristalizēts bez ssDNS, izmantojot JCSG-plus HT-96 šķīdumu kitu. Kristāli tika iegūti apstākļos ar 0,04 M kālija dihidrogēnfosfātu 16% w/v PEG 8000 20% glicerīnu un analizēti MAX-lab sinhrotronā Lundā, Zviedrijā. Tika savākti nedaudz augstākas izšķirtspējas dati nekā pilna garuma ORF6 proteīnam, kuri parādīja, ka ORF6 Δ 21 proteīns kristalizējas savādākā telpas grupā ar atšķirīgiem vienības šūnas izmēriem. ORF6 Δ 21 proteīna struktūra tika noteikta ar molekulārās aizvietošanas metodi, kā meklēšanas modeli izmantojot iepriekš noteikto ORF6 struktūru. Kristalogrāfiskajā asimetriskajā vienībā ietilpst trīs ORF6 Δ 21 molekulas, kuru struktūra ir ļoti līdzīga (rmsd atšķirības pamatķēdes atomiem 0,62 – 0,76 Å) natīvā ORF6 struktūrai ar minimālām atšķirībām dažu cilpu konformācijā. ORF6 un ORF6 Δ 21 datu ievākšanas, fāzu uzlabošanas un modeļa kvalitātes statistika ir apkopota 6. tabulā.

6. tabula. ORF6 un ORF6 Δ 21 kristalogrāfisko datu ievākšanas parametri un fāzu uzlabošanas statistika. Iekavās norādīta vērtība augstākās izšķirtspējas zonā, Ramačandrāna analīze veikta ar MolProbity (Chen *et al.*, 2010).

Table 6. Crystallographic data collection parameters and refinement statistics of ORF6 and ORF6 Δ 21. Values in parentheses are given for the highest-resolution shell, Ramachandran analysis was performed using MolProbity (Chen *et al.*, 2010).

	ORF6	ORF6 Δ 21
Telpas grupa	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Šūnas parametri	a = 38.06 Å b = 67.16 Å c = 76.80 Å	a = 50,77 Å b = 103,59 Å c = 59,27 Å β = 111,08 °
Izšķirtspēja (Å)	23,93 – 1,50	24,6 – 1,34
R_{merge}	0,104 (0,774)	0,048 (0,364)
I/σ(I)	6,7 (2,6)	12,7 (2,8)
Datu pilnība (%)	99,4 (100,0)	99,3 (99,3)
Datu daudzkārtība	3,6 (3,6)	3,1 (2,7)
R_{work}	0,219	0,202
R_{free}	0,262	0,235
B faktors (Å²), vidējais	22,3	18,8
Atomu skaits		
proteīns	1400	4089
ūdens	116	403
Ramačandrāna diagramma		
atlikumi vēlamajos reģionos (%)	97,1	98,2
atlikumi atļautajos reģionos (%)	100,0	100,0

Kokristalizācijai ar ssDNS ORF6Δ21 proteīns tika koncentrēts tāpat kā iepriekš un sajaukts ar 18 timidīnu oligonukleotīdu – oligo(dT)18 – molārajā attiecībā 1:2. Kristalizācijas pārbaude tika veikta ar JCSG-plus HT-96 šķīdumu kitu. Nedēļas laikā tika novērota kristālu veidošanās apstākļos ar 0,2 M amonija citrātu (di-bāzisku) 20% w/v PEG 3350 (33. attēls, a) un 0,1 M citrātu pH 5,0 20% w/v PEG 6000 (33. attēls, b).



33. attēls. ORF6Δ21-oligo(dT)18 maisījuma kristāli 0,2 M amonija citrāta (di-bāziska) 20% w/v PEG 3350 (a) un 0,1 M citrāta pH 5,0 20% w/v PEG 6000 (b) kristalizācijas šķīdumā.

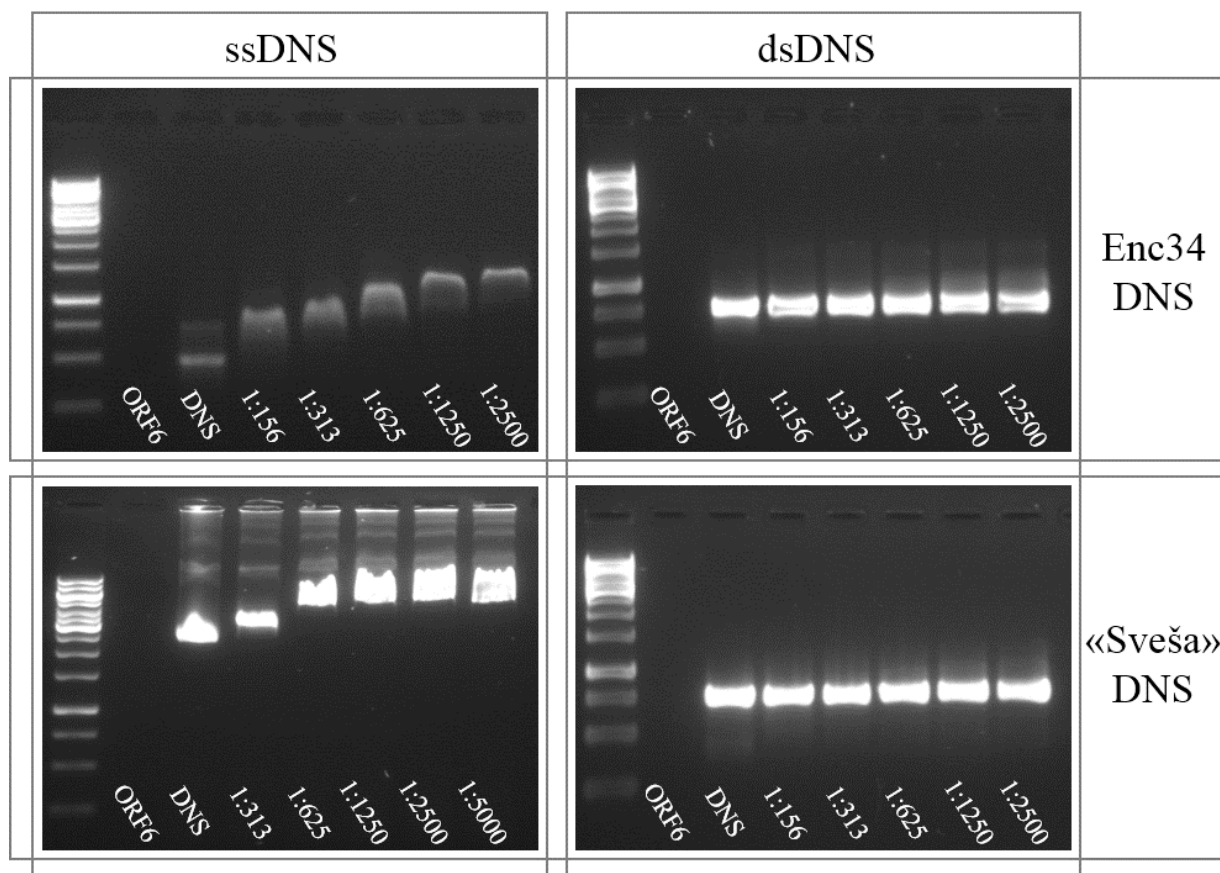
Figure 33. Crystals of ORF6Δ21 mixed with oligo(dT)18 obtained in 0,2 M ammonium citrate (dibasic) 20% w/v PEG 3350 (a) and in 0,1 M citrate pH 5,0 20% w/v PEG 6000 (b).

Iegūtie kristāli tika analizēti BESSY II sinhrotronā, Berlīnē, tomēr kristāli difragēja tikai līdz ļoti zelai izšķirtspējai, un dati netika savākti. Šobrīd nav zināms, vai iegūtajos kristālos ir notikusi mērķa proteīna un ssDNS saistība, tomēr zīmīgi, ka ORF6Δ21 proteīns bez DNS šajos apstākļos kristālus neveido. Turpmāk tiks veikta noteikto kristalizācijas apstākļu optimizācija ar mērķi iegūt ORF6Δ21-oligo(dT)18 kristālus ar labāku difrakciju.

Papildus kristalizācijas pētījumiem tika veikti vairāki secīgi elektroforētiskās kustības nobīdes (EMSA) eksperimenti ORF6/ORF6Δ21 un DNS mijiedarbības kvalitatīvai analīzei un natīvā ORF6 proteīna ssDNS saistīšanas funkcijas apstiprināšanai. Pētījuma gaitā pieaugošas koncentrācijas ORF6 vai ORF6Δ21 proteīna paraugi (~0,4 – 7,0 mg/mL) tika inkubēti ar fiksētas koncentrācijas DNS noteiktās molārajās attiecībās (skat. attēlus zemāk) ar sekojošu DNS analīzi agarozes gēlā. Darbam tika izvēlētas četru veidu DNS: (1) ~750 nukleotīdu ssDNS sekvenca, kas sintezēta no Enc34 genoma asimetriskajā PCR, izmantojot ORF3 gēna tiešo un ORF4 reverso oligonukleotīdu, (2) atbilstošs dsDNS fragments, kas amplificēts ar standarta PCR, (3) bakteriofāga

M13 cirkulārs ssDNS genoms (izdalīts no vīrusa daļiņām pēc metožu sadaļā aprakstītā protokola) un (4) audzēju antigēna NY-ESO-1 ~700 bp PCR produkts (no laboratorijas kolekcijas). Šādā veidā nukleīnskābes saistīšanas eksperimentos tika izpētīta ORF6 un ORF6Δ21 afinitāte pret fāga genoma vai tam nespecifisku (“svešu”) vienpavediena vai divpavedienu DNS.

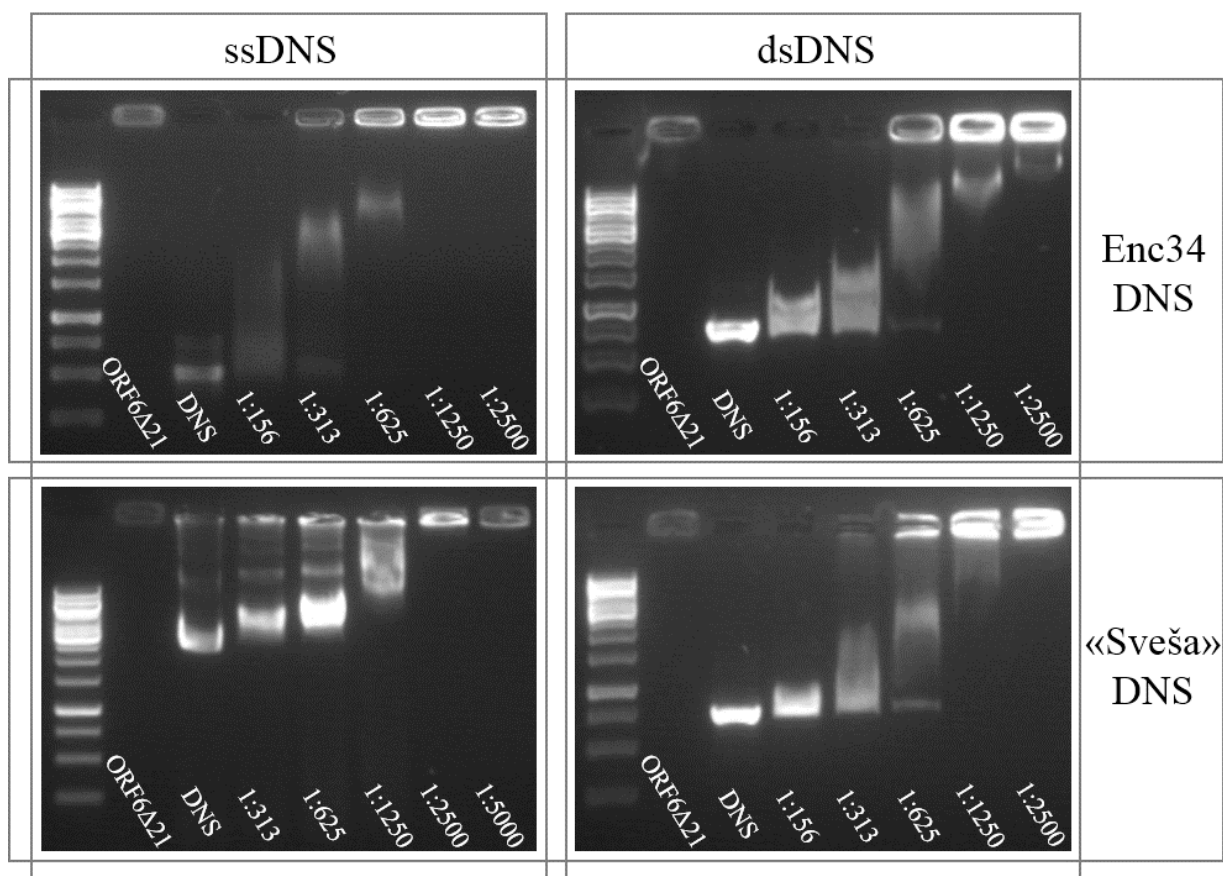
ORF6 EMSA eksperimentu sērija parāda, ka proteīns saista ssDNS, veidojot agarozes gēlā lēnāk migrējošus molekulu kompleksus un to, ka sekvenču ssDNS saistība ir sekvenču nespecifiska un neatkarīga no tās izcelsmes – Enc34 vai M13. Pārlicinoša dsDNS saistīšanas aktivitāte pētījumos netika novērota, tomēr pieļaujams, ka tā notiek ar zemu afinitāti un tādēļ nav viennozīmīgi detektējama ar etīdija bromīda krāsojumu (34. attēls). Šie rezultāti ir atbilstoši īpašībām, ko novēro SSB (Dickey *et al.*, 2013).



34. attēls. ORF6-DNS saistības eksperimenti ar EMSA agarozes gēlā. Pirmais celiņš aiz DNS molekulmasas marķiera – tikai ORF6 proteīns, otrs – tikai DNS. Turpākajos celiņos pārbaudīti proteīna un DNS maisījumi atbilstoši molārajām attiecībām, kas norādītas apakšdaļā.

Figure 34. ORF6-DNA binding experiments by EMSA in agarose gel. DNA ladder is followed by a track with the ORF6 protein only, the next track contains DNA only. Subsequent tracks examine protein and DNA mixtures in molar ratios shown below.

Atšķirībā no natīvā ORF6 proteīna, ORF6 Δ 21 veido kompleksus gan ar vienpavediena, gan divpavedienu DNS (35. attēls). Pētījumos ar T7 proteīnu gp2.5 parādīts, ka SSB C-gala saīsināšana paaugstina ssDNS saistīšanas afinitāti (Hyland *et al.*, 2003), tomēr šajos pētījumos proteīna spēja saistīt dsDNS netika pārbaudīta. ORF6 Δ 21-dsDNS EMSA eksperimenti parāda, ka proteīna C-terminālā reģiona delēcija samazina specifiskumu, ar kādu proteīns saista ssDNS salīdzinājumā ar dsDNS. Zinātniskās literatūras analīzē par līdzīgas uzbūves SSB funkcionālu izpēti šāds novērojums netika atklāts.



35. attēls. ORF6 Δ 21-DNS saistības eksperimenti ar EMSA agarozes gēlā. Pirmais celiņš aiz DNS molekulmasas marķiera – tikai ORF6 Δ 21 proteīns, otrs – tikai DNS. Turpākajos celiņos pārbaudīti proteīna un DNS maisījumi atbilstoši molārajām attiecībām, kas norādītas apakšdaļā.

Figure 35. ORF6 Δ 21-DNA binding experiments by EMSA in agarose gel. DNA ladder is followed by a track with the ORF6 Δ 21 protein only, the next track contains DNA only. Subsequent tracks examine protein and DNA mixtures in molar ratios shown below.

3.6. Bakteriofāga Enc34 DNS replikācijas proteīnu izpētes apkopojums

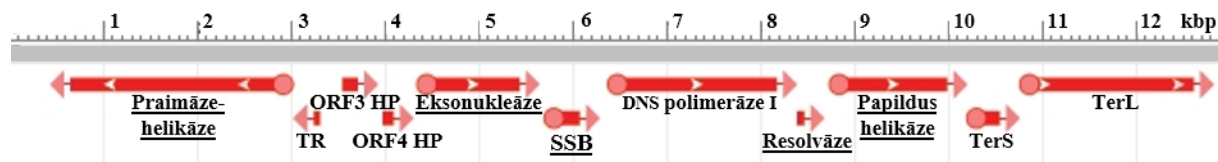
Šī pētījuma gaitā tika veikta visu bakteriofāga Enc34 replikācijas proteīnu sekvenču analīze, kā arī četru hipotētisko proteīnu *in vitro* izpēte ar mērķi noskaidrot to funkcijas ar struktūrbioģijas pieeju. Iegūtie rezultāti ir perspektīvi darba turpināšanai. Pašreizējais mērķa proteīnu izpētes progress un turpmākās darbības uzdevumi apkopoti 7. tabulā. Enc34 proteīna ORF6 strukturālo un funkcionālo pētījumu rezultāti pašlaik tiek sagatavoti zinātniskajai publikācijai.

7. attēls. Enc34 replikācijas moduļa hipotētisko proteīnu analīzes progress. Ar dzeltenu izcelti turpmākie uzdevumi.

Table 7. Advances in Enc34 replication module hypothetical protein analysis. Further tasks are highlighted in yellow.

	ORF3	ORF4	ORF5	ORF6
Sekvenču analīze	✓	✓	✓	✓
Ekspresija	✓	✓	✓	✓
Attīrīšana	✓	Uzlabot šķīdību: MBP-ORF4 / šaperoni	✓	✓
Kristalizācija	Kristalizēt ar citiem šķīdumu kitiem		Pārbaudīt agregāciju ar EM; kristalizēt	✓
Struktūras noteikšana				✓
Funkcijas apstiprināšana				✓

Pašreizējie rezultāti ļauj papildināt trīs iepriekš prognozētu Enc34 DNS replikācijas proteīnu anotāciju, kā arī piešķirt funkcionālu nozīmi diviem hipotētiskajiem proteīniem (36. attēls).



36. attēls. Pašreizējais funkcionālais priekšstats par Enc34 DNS replikācijas un pakošanas moduli. TR – transkripcijas regulators, HP – hipotētisks proteīns, TerS un TerL – termināzes mazā un lielā subvienība. Proteīni, kuru funkcija tika noskaidrota šī darba gaitā, ir izcelti ar pasvītrojumu.

Figure 36. The current functional view of the Enc34 DNA replication and packaging module. TR – transcriptional regulator, HP – hypothetical protein, TerS and TerL – terminase small and large subunit. Proteins with their function determined during this work are underlined.

Secinājumi

1. Enc34 ORF1 praimāzes C-terminālā reģiona homologija ar citu vīrusu un prokariotu AAA+ *folda* helikāzes domēnu liecina, ka šis replikācijas proteīns ir multifunkcionāla praimāze-helikāze. Fāga DNS replikācijas procesam nepieciešama papildus DNS helikāze, ko kodē ORF9.
2. Augsta homologija ar eksperimentāli izpētītajiem fāgu un prokariotu VRR-NUC domēnu saturošiem proteīniem norāda, ka Enc34 ORF8 ir Holideja savienojumus šķeļoša resolvāze.
3. ORF3 proteīnu ir iespējams attīrīt ar anjonu apmaiņas hromatogrāfijas un gēlfiltrācijas kombinētu pielietojumu. Attīrīts ORF3 ir oligomērs, kas neveido kristālus JCSG-plus HT-96 un PACT premier HT-96 reakciju apstākļos.
4. Rekombinanti producēts ORF4 proteīns ir nešķīstošs un nav iegūstams šķīstošā veidā ar pārbaudītajām proteīna renaturācijas metodēm.
5. Rekombinanti producēts ORF5 proteīns ir nešķīstošs, bet ar MBP sapludināta ORF5 ekspresija uzlabo proteīna šķīdību. Attīrīts ORF5 proteīns pastāv strukturāli organizētu oligomēru vai agregātu veidā.
6. ORF6 proteīna strukturāla un funkcionāla izpēte pārlicinoši parāda, ka līdz šim nezināmas funkcijas DUF2815 (PSSM ID: 256231) ir OB *folda* domēns ar ssDNS saistīšanas funkciju. Bakteriofāga Enc34, kā arī tam radniecīgo *Chi*- un *Nazgul-līdzīgo* fāgu homologie hipotētiskie proteīni ir SSB.
7. ORF6 proteīna C-terminālais reģions ir izšķirošais faktors, kas nosaka ssDNS saistīšanas specifiskumu.

Pateicības

Es vēlos izteikt pateicību

Dr. biol. Andrim Kazākam – par iespēju maģistra darba izstrādāšanai, darba vadīšanu un proteīnu hromatogrāfiskas attīrīšanas apmācību,

Dr. biol. Kasparam Tāram – par kristalogrāfisko datu ievākšanu un palīdzību to apstrādē,

Dr. biol. Kalvim Brangulim – par darba recenziju,

Dr. biol. Jānim Rūmniekam – par ieteikumiem proteīnu sekvenču un struktūru analīzē,

Dr. Tatjanai Voronkovai – par vairāku molekulārās bioloģijas metožu apmācību,

Inārai Akopjanai – par vairāku mikrobioloģijas metožu apmācību,

MSc. biol. Jānim Leitānam – par palīdzību proteīnu kristalizācijā,

MSc. biol. Svetlanai Kotelovičai – par ieteikumiem saistībā ar proteīnu attīrīšanu.

Literatūras saraksts

1. Abbate EA, Berger JM, Botchan MR. 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes & Development*, 18 (16): 1981–1996.
2. Abbott S. 1999. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia*, p 475-480. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edition. Washington, DC: ASM Press.
3. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. 2011. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1 (2): 66-85.
4. Acheson NH. 2011. *Fundamentals of Molecular Virology*, 2nd Edition. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 500 pp.
5. Ackermann HW. 2009. Basic Phage Electron Microscopy. *Methods in Molecular Biology*, 501: 113-126.
6. Ackermann HW. 2011a. The first phage electron micrographs. *Bacteriophage*, 1(4): 225-227.
7. Ackermann HW. 2011b. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32 (2): 90-94.
8. Ackermann HW, Prangishvili D. 2012. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology*, 157 (10): 1843-1849.
9. Ahern SJ, Das M, Bhowmick TS, Young R, Gonzalez CF. 2014. Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*, 196 (2): 459-471.
10. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, Yu YK. 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *The FEBS Journal*, 272 (20): 5101-5109.
11. Aravind L, Makarova KS, Koonin EV. 2000. Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Research*, 28 (18): 3417–3432.
12. Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. 2016. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, pii: gkw408.

13. Balakrishnan L, Bmbara AR. 2013. Okazaki Fragment Metabolism. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5 (2): pii: a010173.
14. Brüning JG, Howard JL, McGlynn P. 2014. Accessory replicative helicases and the replication of protein-bound DNA. Journal of Molecular Biology, 426 (24): 3917-3928.
15. Calendar R. 2006. The Bacteriophages, 2nd Edition. New York: Oxford University Press, 768 pp.
16. Casjens SR, Hendrix RW. 2015. Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant. Virology, 479-480: 310-330.
17. Catalano CE. 2005. Viral Genome Packaging Machines: Genetics, Structure, and Mechanism. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 153 pp.
18. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 66 (Pt 1): 12-21.
19. Choi Y, Shin H, Lee JH, Ryu S. 2013. Identification and characterization of a novel flagellum-dependent *Salmonella*-infecting bacteriophage, iEPS5. Applied and Environmental Microbiology, 79 (16): 4829-4837.
20. Clokie MRJ, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. 2011. Phages in nature. Bacteriophage, 1 (1): 31-45.
21. Cooper GM. 2000. The Cell: A Molecular Approach, 2nd Edition. Sunderland: Sinauer Associates, 689 pp.
22. Dale JW, Schantz M. 2007. From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology, 2nd Edition. West Sussex: Wiley-Interscience, 394 pp.
23. DeLano WL. 2002. The PyMOL molecular graphics system. San Carlos, CA: DeLano Scientific.
24. Demir T, Baran G, Buyukguclu T, Sezgin FM, Kaymaz H. 2014. Pneumonia due to *Enterobacter cancerogenus* infection. Folia Microbiologica, 59 (6): 527-530.
25. Dickey TH, Altschuler SE, Wuttke DS. 2013. Single-stranded DNA-binding proteins: multiple domains for multiple functions. Structure, 21 (7): 1074-1084.

26. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. 2012. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein & Peptide Science*, 13 (8): 699-722.
27. Edgar R, Friedman N, Molshanski-Mor S, Qimron U. 2012. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (3): 744-751.
28. Emsley P, Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*: 60 (Part 12 Part 1): 2126-2132.
29. Evans P. 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 62 (Part 1): 72-82.
30. Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA. 2015. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 13 (10): 641-650.
31. Forterre P, Gribaldo S, Gabelle D, Serre MC. 2007. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*, 89 (4): 427-446.
32. Garazzino S, Aprato A, Maiello A, Massé A, Biasibetti A, De Rosa FG, Di Perri G. 2005. Osteomyelitis caused by *Enterobacter cancerogenus* infection following a traumatic injury: case report and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (3): 1459-1461.
33. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, Wong ML, Xu A, Chavakis T, Bornstein AB, Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Lohmann T, Wolf T, Bornstein SR. 2013. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *The Pharmacogenomics Journal*, 13 (6): 514-522.
34. Guillian TA, Keen BA, Brissett NC, Doherty AJ. 2015. Primase-polymerases are a functionally diverse superfamily of replication and repair enzymes. *Nucleic Acids Research*, 43 (14): 6651-6664.
35. Hatfull GF. 2015. Dark Matter of the Biosphere: the Amazing World of Bacteriophage Diversity. *Journal of Virology*, 89 (16): 8107-8110.
36. Hendrix RW, Lawrence JG, Hatfull GF, Casjens S. 2000. The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends in Microbiology*, 8 (11): 504-508.

37. Hedglin M, Kumar R, Benkovic SJ. 2013. Replication clamps and clamp loaders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (4): a010165.
38. Hendrix RW, Ko CC, Jacobs-Sera D, Hatfull GF, Erhardt M, Hughes KT, Casjens SR. 2015. Genome Sequence of *Salmonella* Phage χ . *Genome Announcements*, 3 (1): pii: e01229-14.
39. Hildebrand A, Remmert M, Biegert A, Söding J. 2009. Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins*, 77 Suppl 9: 128-132.
40. Hingorani MM, O'Donnell M. 2000. A tale of toroids in DNA metabolism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1 (1): 22-30.
41. Hooton SP, Brathwaite KJ, Connerton IF. 2016. The Bacteriophage Carrier State of *Campylobacter jejuni* Features Changes in Host Non-coding RNAs and the Acquisition of New Host-derived CRISPR Spacer Sequences. *Frontiers in Microbiology*, 7: 355.
42. Hyland EM, Rezende LF, Richardson CC. 2003. The DNA binding domain of the gene 2.5 single-stranded DNA-binding protein of bacteriophage T7. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (9): 7247-7256
43. Hyman P, Abedon ST. 2012. *Bacteriophages in Health and Disease*, 1st Edition. Oxfordshire: CABI, 296 pp.
44. Iyer LM, Babu MM, Aravind L. 2006. The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA. *Cell Cycle*, 5 (7): 775-782.
45. Iyer LM, Koonin EV, Leipe DD, Aravind L. 2005. Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucleic Acids Research*, 33 (12): 3875-3896.
46. James JA, Escalante CR, Yoon-Robarts M, Edwards TA, Linden RM, Aggarwal AK. 2003. Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure*, 11 (8): 1025-1035.
47. Karpe YA, Kanade GD, Pingale KD, Arankalle VA, Banerjee K. 2016. Genomic characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from India. *Virus Genes*, 52 (1): 117-126.
48. Kazāks A, Dišlers A, Lipowsky G, Nikolajeva V, Tārs K. 2012. Complete genome sequence of the *Enterobacter cancerogenus* bacteriophage Enc34. *Journal of Virology*, 86 (20): 11403-11404.

49. Kazlauskas D, Krupovic M, Venclovas Č. 2016. The logic of DNA replication in double-stranded DNA viruses: insights from global analysis of viral genomes. *Nucleic Acids Research*, pii: gkw322.
50. Kazlauskas D, Venclovas Č. 2011. Computational analysis of DNA replicases in double-stranded DNA viruses: relationship with the genome size. *Nucleic Acids Research*, 39 (19): 8291–8305.
51. Keen EC. 2015. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 37 (1): 6-9.
52. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, 1338 pp.
53. Kingwell K. 2015. Bacteriophage therapies re-enter clinical trials. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14 (8): 515-516.
54. Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, Abedon ST. 2010. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11 (1): 69-86.
55. Lara E, Holmfeldt K, Solonenko N, Sà EL, Ignacio-Espinoza JC, Cornejo-Castillo FM, Verberkmoes NC, Vaqué D, Sullivan MB, Acinas SG. 2015. Life-style and genome structure of marine *Pseudoalteromonas* siphovirus B8b isolated from the northwestern Mediterranean Sea. *PLoS One*, 10 (1): e0114829.
56. Lech K, Brent R. 2001. Introduction to lambda phages. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 1: Unit 1.9.
57. Lee JH, Shin H, Choi Y, Ryu S. 2013. Complete genome sequence analysis of bacterial-flagellum-targeting bacteriophage Chi. *Archives of Virology*, 158 (10): 2179-2183.
58. Lemak S, Beloglazova N, Nocek B, Skarina T, Flick R, Brown G, Popovic A, Joachimiak A, Savchenko A, Yakunin AF. 2013. Toroidal structure and DNA cleavage by the CRISPR-associated [4Fe-4S] cluster containing Cas4 nuclease SSO0001 from *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of the American Chemical Society*, 135 (46): 17476-17487.

59. Lemak S, Nocek B, Beloglazova N, Skarina T, Flick R, Brown G, Joachimiak A, Savchenko A, Yakunin AF. 2014. The CRISPR-associated Cas4 protein Pcal_0546 from *Pyrobaculum calidifontis* contains a [2Fe-2S] cluster: crystal structure and nuclease activity. *Nucleic Acids Research*, 42 (17): 11144-11155.
60. Leslie AG, Powell HR. 2007. Processing diffraction data with Mosflm. *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, 245: 41-51.
61. Lipps G, Weinzierl AO, von Scheven G, Buchen C, Cramer P. 2004. Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11 (2): 157-162.
62. Mahony J, McAuliffe O, Ross RP, van Sinderen D. 2011. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (2): 157-163.
63. Marceau H. 2012. Functions of single-strand DNA-binding proteins in DNA replication, recombination, and repair. *Methods in Molecular Biology*, 922: 1-21.
64. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 43 (Database issue): D222-6.
65. Marintcheva B, Marintchev A, Wagner G, Richardson CC. 2008. Acidic C-terminal tail of the ssDNA-binding protein of bacteriophage T7 and ssDNA compete for the same binding surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (6): 1855-1860.
66. Martin IV, MacNeill SA. 2002. ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biology*, 3 (4): REVIEWS3005.1.
67. Mihara T, Nishimura Y, Shimizu Y, Nishiyama H, Yoshikawa G, Uehara H, Hingamp P, Goto S, Ogata H. 2016. Linking Virus Genomes with Host Taxonomy. *Viruses*, 8 (3): E66.
68. Monk AB, Rees CD, Barrow P, Hagens S, Harper DR. 2010. Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, 51 (4): 363-369.
69. Moody CL, Tretyachenko-Ladokhina V, Laue TM, Senear DF, Cocco MJ. 2011. Multiple conformations of the cytidine repressor DNA-binding domain coalesce to one upon recognition of a specific DNA surface. *Biochemistry*, 50 (31): 6622-6632.

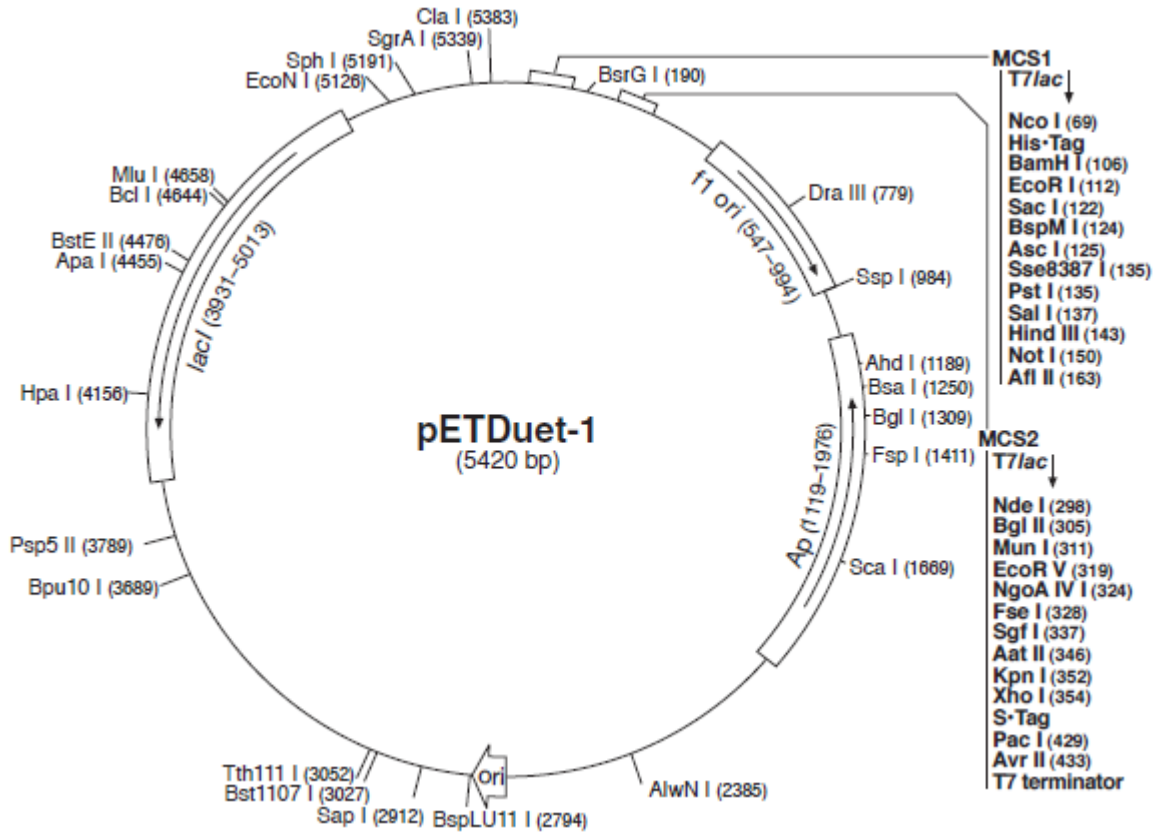
70. Mueser TC, Hinerman JM, Devos JM, Boyer RA, Williams KJ. 2010. Structural analysis of bacteriophage T4 DNA replication: a review in the Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives. *Virology Journal*, 7: 359.
71. Murphy J, Klumpp J, Mahony J, O'Connell-Motherway M, Nauta A, van Sinderen D. 2014. Methyltransferases acquired by lactococcal 936-type phage provide protection against restriction endonuclease activity. *BMC Genomics*, 15: 831.
72. Murphy J, Mahony J, Ainsworth S, Nauta A, van Sinderen D. 2013. Bacteriophage orphan DNA methyltransferases: insights from their bacterial origin, function, and occurrence. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (24): 7547-7555.
73. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 53 (3): 240-255.
74. Onmus-Leone F, Hang J, Clifford RJ, Yang Y, Riley MC, Kuschner AR, Waterman PE, Lesho EP. 2013. Enhanced de novo assembly of high throughput pyrosequencing data using whole genome mapping. *PloS One*, 8 (4): e61762.
75. Pennell S, Déclais AC, Li J, Haire LF, Berg W, Saldanha JW, Taylor IA, Rouse J, Lilley DM, Smerdon SJ. 2014. FAN1 activity on asymmetric repair intermediates is mediated by an atypical monomeric virus-type replication-repair nuclease domain. *Cell Reports*, 8 (1): 84-93.
76. Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI. 2010. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59 (3): 145-155.
77. Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB. 2014. *Campbell Biology*, 10th Edition. Pearson, 1488 pp.
78. Roach DR, Donovan DM. 2015. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 5 (3): e1062590.
79. Rubinstien EM, Klevjer-Anderson P, Smith CA, Drouin MT, Patterson JE. 1993. *Enterobacter taylorae*, a new opportunistic pathogen: report of four cases. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (2): 249-254.
80. Ryu S, Kropinski AM, Lavigne R, Hendrix RW, Casjens SR, Adriaenssens E. 2013. ICTV Taxonomic proposal form "To create a new genus, the *Chilikevirus*, within the family

- Siphoviridae*, containing three new species”: <http://www.ictvonline.org/proposals-14/2013.039a-dB.A.v3.Chilikevirus.pdf>.
81. Ruska H. 1940. Die Sichtbarmachung der Bakteriophagen Lyse im Übermikroskop. *Naturwissenschaften*, 28: 45-46.
 82. Salmond GP, Fineran PC. 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews. Microbiology*, 13 (12): 777-786.
 83. Schmerer M, Molineux IJ, Bull JJ. 2014. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. *PeerJ*, 2: e590.
 84. Shamoo Y. 2002. Single-stranded DNA-binding proteins. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1-7. London: Nature Publishing Group.
 85. Shin H, Lee JH, Kim H, Choi Y, Heu S, Ryu S. 2012. Receptor diversity and host interaction of bacteriophages infecting *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *PLoS One*, 7 (8): e43392.
 86. Shishmarev D, Wang Y, Mason CE, Su XC, Oakley AJ, Graham B, Huber T, Dixon NE, Otting G. 2014. Intramolecular binding mode of the C-terminus of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 42 (4): 2750-2757.
 87. Shokri L, Rouzina I, Williams MC. 2009. Interaction of bacteriophage T4 and T7 single-stranded DNA binding proteins with DNA. *Physical Biology*, 6 (2): 025002.
 88. Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB. 2007. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 23-50.
 89. Snyder L, Champness W. 2007. *Molecular Genetics of Bacteria*, 3rd Edition. Washington, DC: ASM Press, 735 pp.
 90. Switt MAI, Orsi RH, den Bakker HC, Vongkamjan K, Altier C, Wiedmann M. 2013. Genomic characterization provides new insight into *Salmonella* phage diversity. *BMC Genomics*, 14: 481.
 91. Theobald DL, Mitton-Fry RM, Wuttke DS. 2003. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32: 115-133.

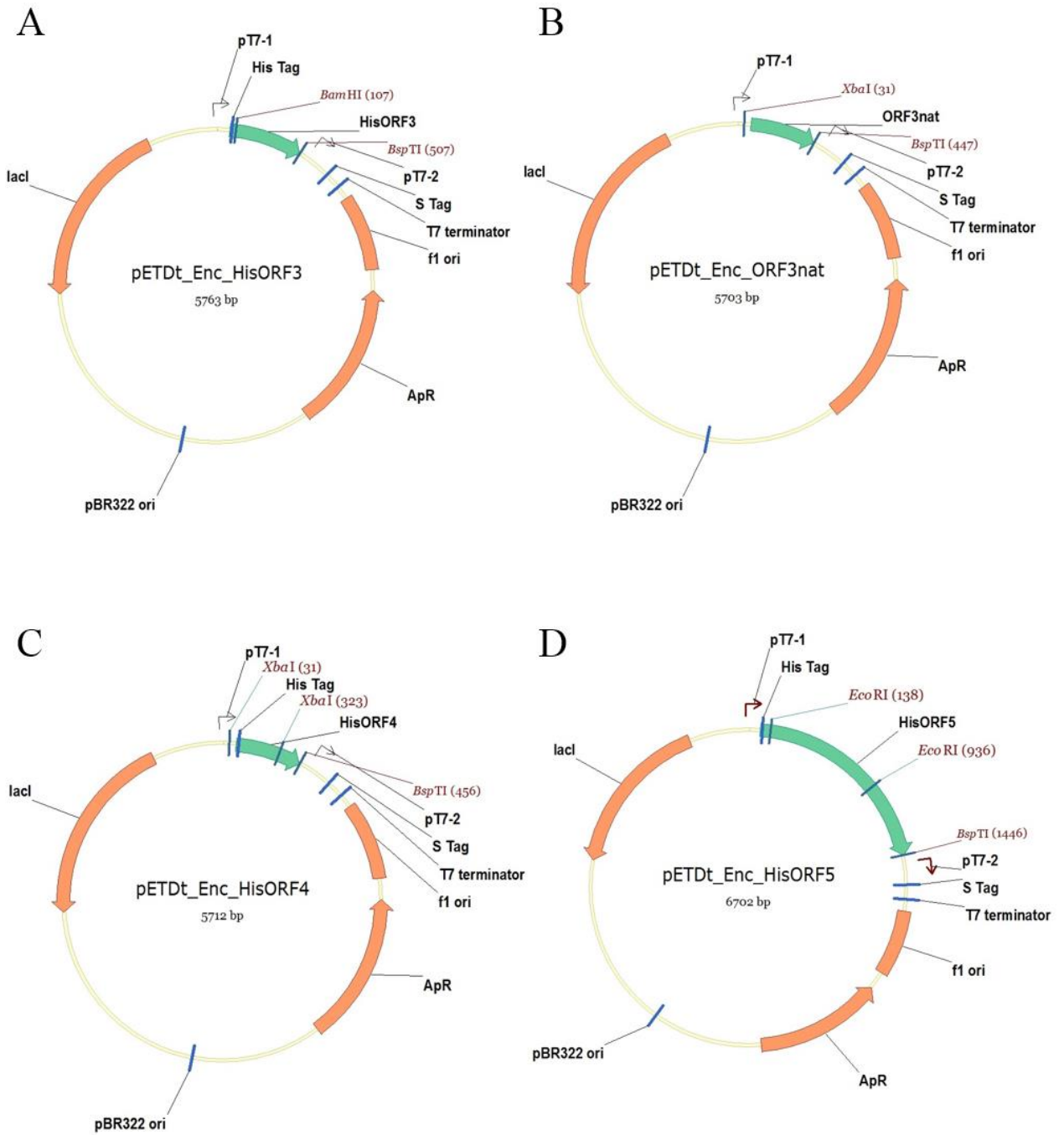
92. Thresher RJ, Makhov AM, Hall SD, Kolodner R, Griffith JD. 1995. Electron microscopic visualization of RecT protein and its complexes with DNA. *Journal of Molecular Biology*, 254 (3): 364-371.
93. Tropea JE, Cherry S, Waugh DS. 2009. Expression and purification of soluble His6 tagged TEV protease. *Methods in Molecular Biology*, 498: 297-307.
94. Vagin A, Teplyakov A. 2010. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 66 (Pt 1): 22-25.
95. Veessler D, Cambillau C. 2011. A Common Evolutionary Origin for Tailed-Bacteriophage Functional Modules and Bacterial Machineries. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75 (3): 423-433.
96. Viertel TM, Ritter K, Horz HP. 2014. Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (9): 2326-2336.
97. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. 2011. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 67 (Part 4): 235-242.
98. Wu S, Beard WA, Pedersen LG, Wilson SH. 2014. Structural comparison of DNA polymerase architecture suggests a nucleotide gateway to the polymerase active site. *Chemical Reviews*, 14 (5): 2759-2774.
99. Yang W. 2011. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Quarterly Reviews of Biophysics*, (1): 1-93.
100. Zhang J, Kasciukovic T, White MF. 2012. The CRISPR associated protein Cas4 is a 5' to 3' DNA exonuclease with an iron-sulfur cluster. *PLoS One*, 7 (10): e47232.
101. Zhu B, Lee SJ, Richardson CC. 2010. Direct role for the RNA polymerase domain of T7 primase in primer delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (20): 9099-9104.

Pielikumi

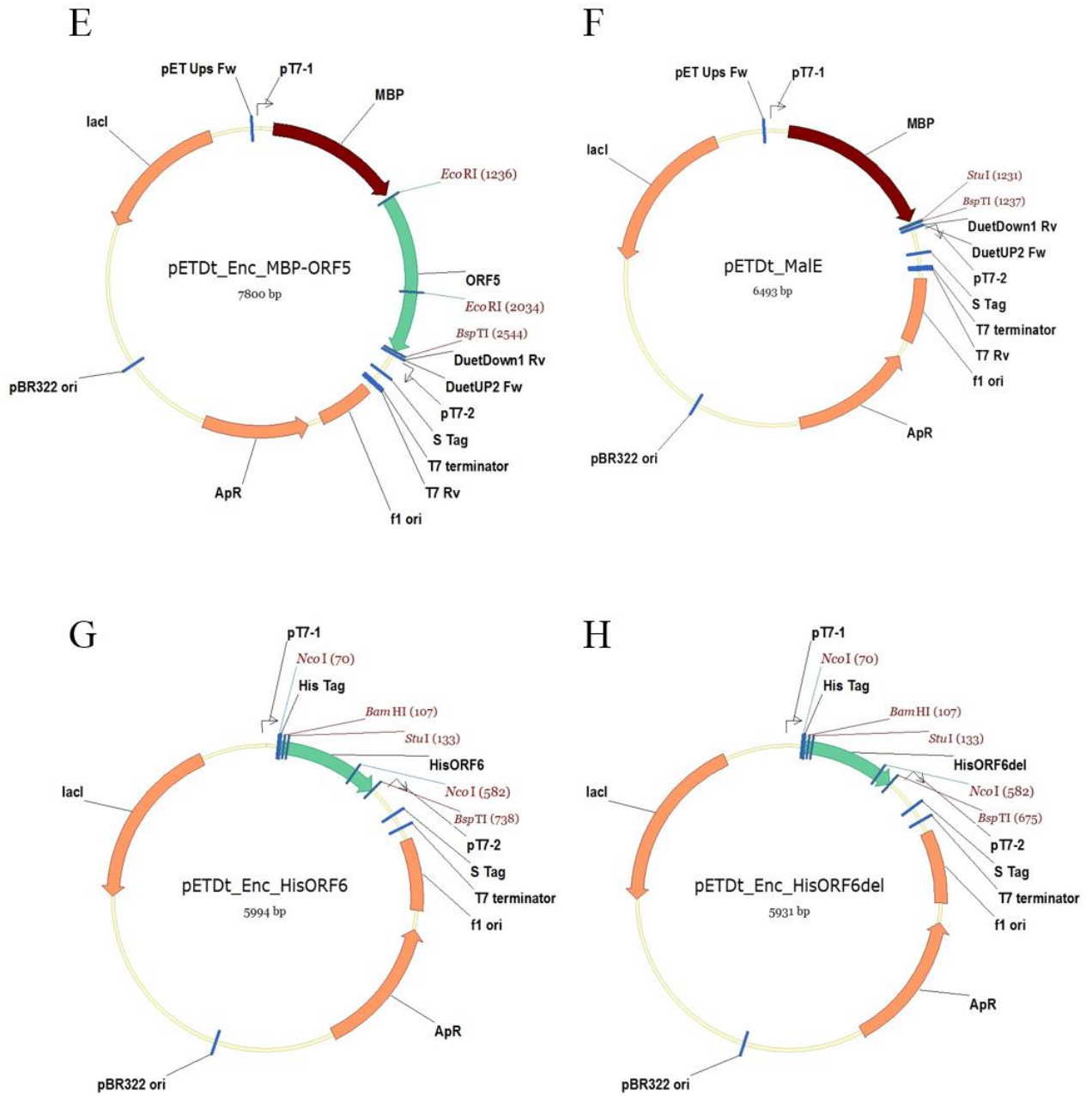
1. pielikums
pETDuet-1 vektora karte



pETDuet-1 vektorā ir divi multi-klonēšanas saiti (MCS, *multiple cloning sites*). Pirms katra MCS lokalizēts T7 promoters/lac operators. ORF6 gēns tika klonēts MCS-1. Vektors satur *His-tag* kodējošu sekvenci un ampicilīna rezistences gēnu.



Pētījumā izmantoto plazmīdu kartes (turpinājums)



Maģistra darbs „Bakteriofāga Enc34 replikācijas moduļa proteīnu ekspresija, attīrīšana un raksturošana” izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

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

Autore: Elīna Černooka 14.06.2016.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: BMC vad. pētnieks Dr. biol. Andris Kazāks 14.06.2016.

Recenzents: BMC pētnieks Dr. biol. Kalvis Brangulis

Darbs iesniegts Molekulārās bioloģijas katedrā 14.06.2016.

Katedras vadītājs: LU asoc. prof., BMC vad. pētnieks Dr. biol. Kaspars Tārs

Darbs aizstāvēts bakalaura darbu pārbaudījuma komisijas sēdē 14.06.2016.

Komisijas sekretārs(-e):