



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Andrijana Danytė

GRYBINIŲ HIDROFOBINŲ NUSTATYMAS IR APIBŪDINIMAS

**THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
FUNGAL HYDROPHOBINS**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2022

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(parašas)
dr. Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

(Data)

Andrijana Danytė

GRYBINIŲ HIDROFOBINIŲ NUSTATYMAS IR APIBŪDINIMAS
THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
FUNGAL HYDROPHOBINS

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas	<u>dr. Jaunius Urbonavičius</u>	_____	_____
	(Pedag. vardas, vardas, pavardė)	(Parašas)	(Data)
Lietuvių kalbos konsultantas	<u>dr. Vaida Buivydienė</u>	_____	_____
	(Pedag. vardas, vardas, pavardė)	(Parašas)	(Data)

Vilnius, 2022

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

dr. Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

**MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.

Vilnius

Studentei Andrijanai Danytei

Baigiamojo darbo tema: Grybinių hidrofobinių nustatymas ir apibūdinimas

patvirtinta:

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas: 2022 m. gegužės 23 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

1. Identifikuoti genus, koduojančius hidrofobinių sintezę ir juos klonuoti į *Escherichia coli* kamieną.
2. Plazmidę su hidrofobinę koduojančiu *rodA* genu transformuoti į *E. coli* BL21 (DE3) kamieną, atlikti šio geno indukciją bei išgryninti baltymą.
3. Apibūdinti išgrynintą RodA baltymą ir panaudoti jį kaip matricą gliukozės oksidazės imobilizacijai ant aukso elektrodo.

Vadovas

.....
(Parašas)

dr. Jaunius Urbonavičius

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau

2020-10-20

(Parašas)

Andrijana Danytė

(Vardas, pavardė)

.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN

Egz. sk.

Data-....-....

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas **Grybinių hidrofobinų nustatymas ir apibūdinimas**

Autorius **Andrijana Danytė**

Vadovas dr. **Jaunius Urbonavičius**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Hidrofobinai yra unikaliomis savybėmis pasižymintys baltymai, sudaryti iš maždaug 70–130 aminorūgščių ir savo sandaroje turintys visai hidrofobinų šeimai būdingus 8 cisteinus, sujungtus 4 disulfidiniais ryšiais. Pagrindinė hidrofobinų savybė yra gebėjimas formuoti amfifilinius sluoksnius ant paviršių ir taip pakeisti jų savybes – hidrofilinę medžiagą paversti hidrofobine ir atvirkščiai. Visa tai nulemia šių baltymų bifunkcinė molekulinė struktūra su hidrofile ir hidrofobine pusėmis. Būtent dėl šios priežasties hidrofobinai gali būti plačiai pritaikomi įvairiose srityse, siekiant pagerinti medžiagų savybes – hidrofiliškumą, imobilizuotų molekulių aktyvumą ir stabilumą.

Baigiamajame magistro darbe buvo tirtas *Aspergillus fumigatus* hidrofobinas RodA ir jo savybės. Molekulinės biologijos metodais nustatytas už RodA sintezę atsakingas genas *rodA*, kuris vėliau panaudotas ekspresijos sistemos kūrimui. Darbe taip pat buvo išgrynintas rekombinantinis baltymas RodA, ištirtas jo gebėjimas formuoti į amiloidines fibriles panašias struktūras. Biologiškai aktyvus rekombinantinis baltymas RodA vėliau buvo panaudotas gliukozės oksidazės imobilizacijai ant aukso elektrodo kaip matrica, siekiant ištirti poveikį imobilizuotos gliukozės oksidazės veikimui.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir tyrimo metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis: 84 p. teksto, 36 paveikslėliai, 13 lentelių, 3 grafikai, 55 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: pelėsiniai grybai, hidrofobinas RodA, PGR, ekspresija, gliukozės oksidazės imobilizacija

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies no.
Date-....-....

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master's Graduation Thesis

Title: **The Identification and Characterization of Fungal Hydrophobins**

Author **Andrijana Danytė**

Academic supervisor **dr. Jaunius Urbonavičius**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Hydrophobins are proteins with unique properties, consisting of approximately 70–130 amino acids and containing 8 cysteines, characteristic of the entire hydrophobin family, linked by 4 disulfide bonds. A key property of hydrophobins is their ability to form amphiphilic layers on surfaces and thus change their properties, turning a hydrophilic material into a hydrophobic one and vice versa. This is due to the bifunctional molecular structure of these proteins with hydrophilic and hydrophobic sides. It is for this reason that hydrophobins can be widely used in a variety of applications to improve the properties of materials, such as hydrophilicity, activity and stability of immobilised molecules.

The hydrophobin RodA of *Aspergillus fumigatus* and its properties were investigated in the final master thesis. The gene responsible for the synthesis of RodA was identified by molecular biology techniques and subsequently used to design an expression system. The recombinant protein RodA was also purified and its ability to form amyloid fibril-like structures was investigated. The biologically active recombinant protein RodA was subsequently used to immobilise glucose oxidase on a gold electrode as a matrix to investigate the effect on the performance of immobilised glucose oxidase.

Structure: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, references.

Thesis consists of: 84 p. without appendixes, 36 pictures, 13 tables, 3 graphs, 55 bibliographical entries.

Keywords: fungi, hydrophobin RodA, PCR, expression, glucose oxidase, immobilisation

Turinys

Paveikslėlių ir grafikų sąrašas	10
Lentelių sąrašas	12
Santrumpų sąrašas	13
Įvadas.....	14
1. Literatūros apžvalga	16
1.1. Pelėsiniai grybai	16
1.1.1. Pelėsinių grybų ląstelės sienelė.....	17
1.2. <i>Aspergillus fumigatus</i> rūšis	18
1.2.1. <i>A. fumigatus</i> ląstelės sienelė	19
1.3. Grybiniai hidrofobinai.....	20
1.3.1. Hidrofobinų funkcija pelėsiniuose grybuose	21
1.3.2. Grybinių hidrofobinų struktūra ir klasifikacija	22
1.3.3. Hidrofobinus koduojančių genų ekspresija ir jos reguliavimas	25
1.3.4. Biologinės hidrofobinų funkcijos	26
1.3.5. Hidrofobinų formuojami sluoksniai.....	27
1.3.6. <i>A. fumigatus</i> hidrofobinai	29
1.3.7. Amiloidinės fibrilės	30
1.3.8. Hidrofobinų biotechnologinio pritaikymo perspektyvos.....	33
2. Medžiagos ir tyrimo metodai.....	37
2.1. Naudotos medžiagos ir prietaisai	37
2.1.1. Reagentai ir medžiagos	37
2.1.2. Naudoti rinkiniai	38
2.1.3. Mitybinės terpės ir tirpalai	38
2.1.4. Kamienai ir plazmidės	40
2.1.5. Pradmenys.....	40
2.1.6. Naudoti prietaisai	41

2.2.	Tyrimo metodai	42
2.2.1.	Nežinomos rūšies pelėsinio grybo išskyrimas iki pavienės kultūros.....	42
2.2.2.	Genominės DNR išskyrimas.....	43
2.2.3.	Genominės DNR padauginimas PGR metodu.....	43
2.2.4.	Horizontali elektroforezė	44
2.2.5.	PGR produkto gryninimas, ligavimas į pJET1.2 vektorių ir klonavimas	44
2.2.6.	Kompetentinių <i>Escherichia coli</i> ląstelių paruošimas.....	45
2.2.7.	Cheminė <i>E. coli</i> transformacija.....	45
2.2.8.	Plazmidinės DNR išskyrimas	46
2.2.9.	Plazmidinės DNR karpymas restrikcijos endonukleazėmis	46
2.2.10.	Sekoskaitos analizė	46
2.2.11.	Suminės RNR išskyrimas	47
2.2.12.	Kopijinės DNR sintezė	47
2.2.13.	Rekombinantinių baltymų ekspresija naudojant IPTG	48
2.2.14.	Rekombinantinių baltymų ekspresijos vertinimas SDS-PAGE metodu.....	48
2.2.15.	Intarpinių kūnelių tirpinimas	49
2.2.16.	Rekombinantinio baltymo RodA gryninimas	50
2.2.17.	Rekombinantinio baltymo RodA koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu.....	51
2.2.18.	Natyvios rekombinantinio baltymo RodA struktūros atstatymas	51
2.2.19.	Rekombinantinio baltymo RodA aktyvumo tyrimas	51
2.3.	Rekombinantinio baltymo RodA panaudojimas gliukozės oksidazės imobilizavimui ant aukso elektrodo	52
2.3.1.	Rekombinantinio baltymo RodA paruošimas	52
2.3.2.	Elektrodų paruošimas gliukozės oksidazės imobilizacijai.....	53
2.3.3.	Ciklinė voltamperometrija	53
2.3.4.	Chronoamperometrija	54
3.	Rezultatai ir jų aptarimas.....	55
3.1.	Nežinomos rūšies pelėsinio grybo išskyrimas iki pavienės kultūros	55

3.2. Nežinomos pelėsinio grybo rūšies nustatymas molekulinės biologijos metodais.....	56
3.2.1. Genominės DNR išskyrimas ir PGR	56
3.2.2. PGR produkto sekoskaita.....	57
3.3. Geno, koduojančio RodA baltymo sintezę, nustatymas.....	57
3.3.1. <i>rodA</i> geno aptikimas taikant PGR metodą.....	58
3.3.2. PGR produkto ligavimas į pJET1.2 vektorių, klonavimas ir transformacija.....	59
3.3.3. Plazmidinės DNR išskyrimas ir jos karpymas restrikcijos endonukleazėmis.....	60
3.3.4. Plazmidinės DNR su klonuotu <i>rodA</i> genu sekoskaitos analizė	61
3.4. Kopijinės DNR sintezė.....	61
3.4.1. <i>A. fumigatus</i> suminės RNR išskyrimas ir kopijinės DNR sintezė. Produkto ligavimas į pJET1.2 vektorių, klonavimas ir transformacija.....	61
3.4.2. Kopijinės DNR plazmidžių išskyrimas ir karpymas restrikcijos endonukleazėmis	63
3.4.3. Kopijinės DNR sekoskaita ir rezultatų analizė	64
3.5. Rekombinantinio baltymo RodA ekspresija	66
3.5.1. Plazmidės transformacija.....	66
3.5.2. Baltymų raiškos indukcija naudojant IPTG. Raiškos įvertinimas SDS-PAGE metodu.....	66
3.5.3. Intarpinių kūnelių tirpinimas ir rekombinantinio RodA baltymo gryninimas.....	68
3.5.4. Išgryninto rekombinantinio baltymo RodA koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu.....	70
3.5.5. Rekombinantinio baltymo RodA aktyvumo tyrimas naudojant Tioflaviną T.....	71
3.6. Rekombinantinio baltymo RodA pritaikymas	73
3.6.1. Gliukozės oksidazės elektrocheminio aktyvumo nustatymas ciklinės voltamperometrijos būdu.....	73

3.6.2. Kinetinių parametrų ir jautrio nustatymas	75
Išvados.....	79
Literatūros sąrašas	80

Paveikslėlių ir grafikų sąrašas

1 pav. Įvairių pelėsinių grybų ląstelių sienelių struktūra (pagal Gow et al., 2017)	17
2 pav. Saprofitinio tinklo schema (pagal Sugui, Kwon-Chung, Juvvadi, Latgé, & Steinbach, 2015)	18
3 pav. Hidrofobinių lazdelės formos struktūros sluoksniais apgaubtos: A – <i>Neurospora crassa</i> konidijos, 100 nm; B – <i>Aspergillus nidulans</i> konidijos (pagal Kershaw & Talbot, 1998)	21
4 pav. Aštuonių hidrofobinių cisteino liekanų disulfidinių ryšių išsidėstymas <i>Terreus reesei</i> baltymo HFBII struktūroje, parodytas punktyrinėmis linijomis (pagal Sanna, 2006)	23
5 pav. I klasės hidrofobino EAS iš <i>Neurospora crassa</i> ir II klasės hidrofobinių HFBI ir HFBII iš <i>Terreus reesei</i> struktūros (pagal Stenbæk, 2015)	24
6 pav. Funkcinio hidrofobinių mechanizmo schema (pagal Kallio, Linder, & Rouvinen, 2007)..	28
7 pav. RodA baltymo tirpalo struktūros vaizdas (de Francisco, 2021)	29
8 pav. Bendrosios amiloidinės fibrilės struktūros modelis (pagal Sunde et al., 1997)	32
9 pav. Schematiškai pavaizduotas hidrofobinių molekulių išsidėstymas ant įvairių hidrofobinių ir hidrofilinių substratų (pagal Opwis & Gutmann, 2011).....	34
10 pav. Lėkštelės su pelėsinių grybų kultūromis.	55
11 pav. Genominės DNR elektroforezės rezultatai.....	56
12 pav. PGR rezultatai naudojant ITS1-ITS4 pradmenis.....	57
13 pav. PGR rezultatai naudojant RodA1-RodA2 pradmenis	58
14 pav. <i>Escherichia coli</i> DH10β bakterijų augimas ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu	59
15 pav. Plazmidžių karpymo restrikcijos endonukleazėmis rezultatai	60
16 pav. Plazmidinės DNR sekoskaitos rezultatai.....	61
17 pav. Suminės RNR elektroforezės vaizdas	62
18 pav. Kopijinės DNR elektroforezės vaizdas	62
19 pav. Transformuotų <i>Escherichia coli</i> DH10β bakterijų augimas ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu.	63
20 pav. Išskirtos plazmidinės DNR elektroforezės vaizdas.	63
21 pav. Karpymo restrikcijos endonukleazėmis rezultatai.	64
22 pav. Kopijinės DNR sekoskaitos rezultatų lyginimas su literatūroje pateikta seka.....	65
23 pav. „Išverstos“ kopijinės DNR sekos analizės rezultatai	65
24 pav. Transformuotų <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) bakterijų augimas ant agarizuotos LB terpės su kanamicinu.	66
25 pav. Rekombinantinio RodA baltymo raiškos tikrinimas SDS-PAGE metodu.....	67

26 pav. Intarpinių kūnelių tirpinimo tikrinimo SDS-PAGE rezultatai.	68
27 pav. Laipsniškos gradientinės eliucijos rezultatai.	69
28 pav. Smūginės RodA eliucijos rezultatai	70
29 pav. Au/GOx elektrodo CV analizės rezultatai: darbinis buferinis tirpalas be gliukozės ir su 50 mM gliukozės	74
30 pav. Au/RodA/GOx elektrodo CV analizės rezultatai: darbinis buferinis tirpalas be gliukozės ir su 50 mM gliukozės	74
31 pav. Au/GOx biojutiklio generuojamų srovių pokytis laike, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms darbiniam tirpale.....	75
32 pav. Au/GOx biojutiklio generuojamų srovių pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos darbiniam tirpale.....	76
33 pav. Au/GOx biojutiklio srovės pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Duomenys glodinti naudojant tiesinį modelį.....	76
34 pav. Au/RodA/GOx biojutiklio generuojamų srovių pokytis laike, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms darbiniam tirpale.....	77
35 pav. Au/RodA/GOx biojutiklio generuojamų srovių pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos darbiniam tirpale.....	77
36 pav. Au/RodA/GOx biojutiklio srovės pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Duomenys glodinti naudojant tiesinį modelį.....	78
1 grafikas. Kalibracinė kreivė.....	71
2 grafikas. ThT sužadinimo spektrai.....	72
3 grafikas. ThT emisijos spektrai.....	72

Lentelių sąrašas

1 lentelė.	Funkcinių amiloidų, kuriuos galima rasti gamtoje, pavyzdžiai (pagal Sanna, 2006)....	31
2 lentelė.	Eksperimento metu naudoti reagentai ir medžiagos.....	37
3 lentelė.	Eksperimento metu naudoti rinkiniai	38
4 lentelė.	Eksperimento metu naudoti tirpalai bei jų sudėtys	38
5 lentelė.	Eksperimento metu naudotos terpės bei jų sudėtys	40
6 lentelė.	Eksperimento metu naudoti kamieniai	40
7 lentelė.	Eksperimento metu naudoti pradmenys ir jų sekos	41
8 lentelė.	Eksperimento metu naudoti prietaisai	41
9 lentelė.	PGR sąlygos pagal naudotus pradmenis.....	44
10 lentelė.	Baigiamojo darbo metu atliktos transformacijos.....	45
11 lentelė.	Kopijinės DNR sintezės PGR metodu sąlygos.....	47
12 lentelė.	SDS-PAGE naudojamų gelių sudėtys	49
13 lentelė.	ThT sužadinimo ir emisijos pikų poslinkiai laikui bėgant	73

Santrumpų sąrašas

APS – amonio persulfatas

AuND – aukso nanodalelės

Bp – bazių pora

CA – chronoamperometrija

CV – ciklinė amperometrija

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dNTP – deoksinukleozido trifosfatas

EDTA - Etilendiamintetraacto rūgštis

EGF – epidermio augimo faktorius

GOx – gliukozės oksidazė

IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas

JSA – jaučio serumo albuminas

kDa – kilodaltonai

LB – Luria Bertani terpė

MEAbI - Blakeslee's salyklo ekstrakto agaras

PDA – bulvių dekstrozės agaras

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

RNR – ribonukleino rūgštis

SDS – natrio dodecilsulfatas

SDS-PAGE – (*angl.* sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė

SUMO – su ubikvitinu susijęs modifikatorius

TAE – TRIS-acetato-EDTA buferinis tirpalas

TEMED - tetrametiletildiaminas

ThT – tioflavinas T

Ivadas

Hidrofobinai yra maži, cisteino turintys baltymai, kuriuos sintetina filamentiniai pelėsiniai grybai. Šie baltymai gali spontaniškai susiburti į amfifilinius monosluoksnius hidrofofinėse–hidrofilinėse sąsajose, todėl substrato savybės gali pasikeisti. Hidrofobinų struktūrai būdinga maža β cilindro šerdis, sudaryta iš aštuonių konservatyvių cisteino liekanų, kurios sudaro keturis disulfidinius tiltelius. Savo paviršiuje hidrofofinai turi dideles hidrofofines sritis, kurios yra atsakingos už didelį paviršiaus aktyvumą. Hidrofobinai pagal savo savybes skirstomi į I ir II klasės baltymus. I klasės hidrofofinai susiburia į monosluoksnius su fibrilinėmis substruktūromis, žinomomis kaip lazdelės formos struktūros, kurios yra ypač stabilios ir struktūriškai panašios į amiloidines fibriles. Dėl šios priežasties hidrofofinai laikomi funkciniais amiloidais ir yra svarbūs mikroorganizmų prisitvirtinimui prie paviršių. Priešingai, II klasės hidrofofinai sudaro labai tvarkingus 2D kristalinius amfifilinius monosluoksnius, kuriuos galima lengvai depolimerizuoti (Ribitsch & Guebitz, 2021).

Manoma, kad hidrofofinai yra būtini kelioms pelėsinio grybo gyvenimo ciklo ir vystymosi funkcijoms. Šie baltymai, dėl savo gebėjimo savarankiškai susiburti į amfifilines membranas, leidžia hifams pralaužti vandens ir oro barjerą (įveikti paviršiaus įtempį) bei prisitvirtinti prie hidrofofinų paviršių. Taip pat hidrofofinai padengia oro veikiamas pelėsinų grybų struktūras hidrofofine plėvele, jas taip apsaugant. Be to, yra nustatyta, kad hidrofofinai keičia hifų sienelių sudėtį (Rillig, 2001).

Unikalios hidrofofinų savybės suteikia daug galimybių pritaikymui moksle ir technologiniuose procesuose. Hidrofobinai puikiai pritaikomi srityse, kuriose reikia geriau stabilizuoti putas. Norint išgryninti baltymus, naudojami sulieti hidrofofinai su kitais baltymais, kurie imobilizuojami ant kietų substratų, taip hidrofofinus pritaikant afininės chromatografijos metoduose. Hidrofobinų danga yra galimas tarpinis žingsnis ląstelėms ar kitokio tipo molekulėms pritvirtinti prie hidrofofinų paviršių, pavyzdžiui, biojutikliuose. Vaistinių preparatų formulavimas naudojant hidrofofinus dėl šių baltymų savybių yra dar viena įdomi tema, kuri šiuo metu plačiai tyrinėjama. Verta paminėti ir tai, jog norint toliau tobulinti hidrofofinų pritaikymą, reikalingi didelio masto atskyrimo ir gamybos metodai (Khalesi et al., 2012).

Darbo tikslas: identifikuoti *Aspergillus fumigatus* genome esančius genus, atsakingus už hidrofofinų sintezę bei panaudoti šiuos baltymus medžiagų padengimui ir fermentų imobilizavimui.

Darbo uždaviniai:

1. Identifikuoti genus, koduojančius hidrofobinų sintezę ir juos klonuoti į *Escherichia coli* kamieną;
2. Plazmidę su hidrofobiną koduojančiu *rodA* genu transformuoti į *E. coli* BL21 (DE3) kamieną, atlikti šio geno indukciją bei išgryninti baltymą.
3. Apibūdinti išgrynintą RodA baltymą ir panaudoti jį kaip matricą gliukozės oksidazės imobilizacijai ant aukso elektrodo.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Pelėsiniai grybai

Grybų karalystė apima milijonus rūšių, pradedant nuo didžiausio organizmo žemėje iki daugybės mikroskopinių rūšių, kai kurios iš jų yra patogeniškos augalams ir gyvūnams. Daugeliui grybų gebėjimas pajusti aplinkos ženklus ir perėjimas tarp skirtingų morfologijų daro didelę įtaką jų gebėjimui daugintis, ieškoti maistinių medžiagų, įsiskverbti į audinius ir išvengti imuninio atsako. Biosferoje grybai atlieka svarbų vaidmenį kaip organinių medžiagų skaidymas, leidžiantis iš negyvų organizmų išleisti ir pakartotinai panaudoti elementus ir maistines medžiagas. Grybai taip pat atlieka antrinių metabolitų sintezę, kuriuose yra tokių svarbių junginių kaip antibiotikai ir imunosupresantai, taip pat mikotoksinai, kurie gali būti žalingi žmonių, gyvūnų ir augalų sveikatai (Stajich et al., 2020).

Pelėsiniai grybai yra eukariotiniai organizmai, kuriems būdinga organelių įvairovė – ląstelių sienelės, kurių architektūra panaši; hifai, turintys pagrindinį komponentą chitiną; Goldžio komplekso nebuvimas zigomicetuose, askomicetuose ir bazidiomicetuose; bei branduoliai, kuriuose dalyvaujantys genų produktai turi aukštesnius eukariotų paralogus. Pelėsiniai grybai dauginasi lytiškai arba nelytiškai, diploidinė fazė paprastai būna trumpalaikė. Lytinis grybų dauginimasis paprastai vyksta tarp dviejų priešingo poravimosi tipo izoliatų, kurių kiekvienas turi skirtingą poravimosi tipo (MAT) genų rinkinį (heterotalizmas), arba viename izolate, turinčiame visus būtinus MAT genus (pirminis homotalizmas) (Scézi, 1999; Wilson, Gabriel, Singer, Wingfield, & Wingfield, 2021).

Pelėsiniai grybai atlieka pagrindinius vaidmenis dviejuose ekologinės organizacijos lygiuose: bendruomenėse pelėsiniai grybai yra augalų ir gyvūnų simbiotai, o ekosistemose jie yra skaidytojai, kurie perdirba maistines medžiagas kitiems organizmams. Tačiau tarp bendruomenės ir ekosistemų lygių atsiranda ryšiai, nes kai kurios simbiozės lemia maistinių medžiagų įsisavinimą, jog padidėtų pirminis produktyvumas. Be to, bendruomenės lygmeniu pelėsinų grybų simbiozės pasekmės šeimininkui gali būti įvairios – nuo parazitinės iki abipusės. Parazitai gali sumažinti pirminį produktyvumą ir taip paveikti ekosistemų procesus (Van Bael, 2020).

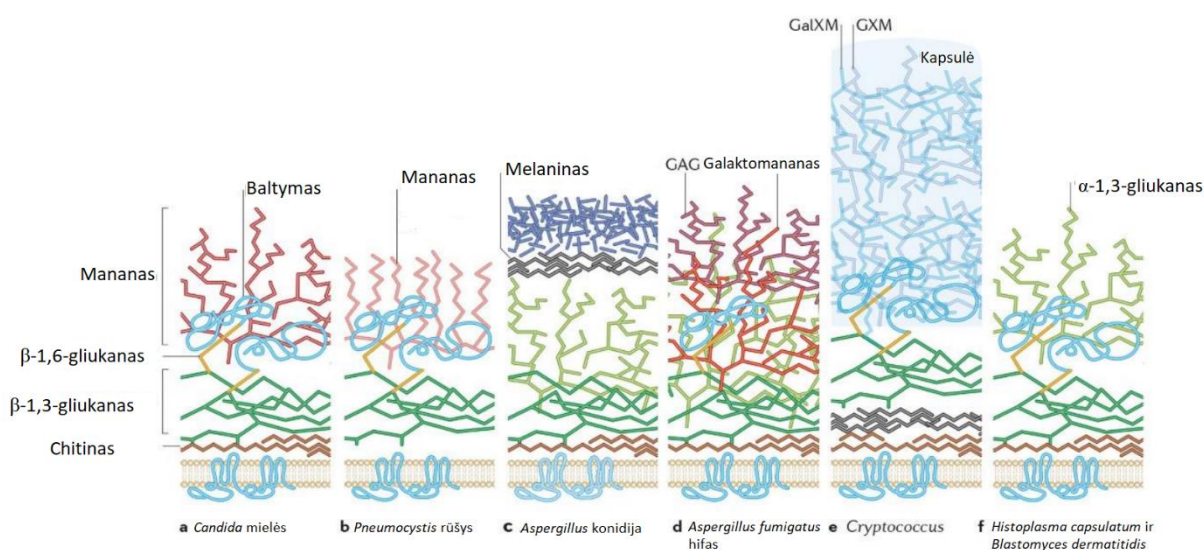
Siūliniai pelėsiniai grybai yra didelė mikroorganizmų grupė, užimanti daugybę ekologinių nišų. Jie yra organinių medžiagų perdirbėjai ir pagrindiniai augalų liekanų skaidytojai. Siūliniai pelėsiniai grybai sudaro mikorizinę simbiozę su 93 % visų žydinčių augalų šeimų, ir jie naudojami pramoninėje baltymų gamyboje. Visa tai daugiausiai lemia jų hifai – ląstelių grandinė atskirta viena nuo kitos pertvaromis. Hifai sparčiai auga dėl poliarizuotos egzocitozės hifo viršūnėje, todėl

siūliniai pelėsiniai grybai gali plisti dideliais atstumais ir įsiskverbti į daugelį substratų, įskaitant dirvožemį ir šeiminingo audinius. Hifo galiuko augimas inicijuojamas nustatant augimo vietą ir vėliau palaikant augimo ašį, pernešant augimui reikalingas atsargas, tokias kaip membranos komponentai ir baltymai, išilgai citoskeleto į hifo galiuką (Steinberg, Peñalva, Riquelme, Wösten, & Harris, 2017).

1.1.1. Pelėsinų grybų ląstelės sienelė

Pelėsinų grybų ląstelės sienelė yra dinamiškos struktūros, būtinos ląstelių gyvybingumui, morfogenezei ir patogenizei (Gow, Latge, & Munro, 2017). Ląstelės sienelė gali keisti savo sudėtį ir struktūrą priklausomai nuo aplinkos sąlygų ir gyvenimo ciklo fazės. Tai sąsaja tarp pelėsinio grybo ir jo aplinkos, todėl ši struktūra gali apsaugoti nuo cheminio ar fizinio streso. Dėl ląstelės sienelės stiprumo ir standumo pelėsiniai grybai gali atsispirti net 20 kartų didesniai už atmosferos slėgį turgoriniam slėgiui, augti ir diferencijuoti į sudėtingas formas (Sanders, 2002).

Dauguma pelėsinų grybų ląstelių sienelės yra sluoksniuotos, o vidinį sluoksnį sudaro santykinai konservatyvus struktūrinis skeleto sluoksnis. Išoriniai sluoksniai yra heterogeniškesni ir pritaikyti tam tikrų pelėsinų grybų fiziologijai. Daugumos pelėsinų grybų rūšių vidinę ląstelės sienelę sudaro kovalentiškai prijungtas šakotas β -(1,3)-gliukanas ir chitinas. Šie polisacharidai sudaro struktūras, gaubiančias ląstelę. Daugelyje rūšių β -(1,6)-gliukanas yra sujungtas su β -(1,3)-gliukanu. Likusi ląstelės sienelės angliavandenių dalis ir prie šerdies prisijungusių angliavandenių sudėtis gali varijuoti tarp skirtingų rūšių. 1 pav. pavaizduoti kai kurie skirtingų pelėsinų grybų ląstelių sienelių pavyzdžiai (Gow et al., 2017).



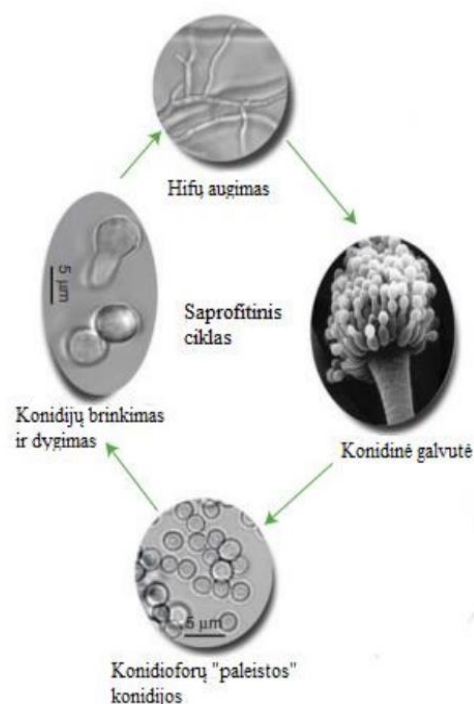
1 pav. Įvairių pelėsinų grybų ląstelių sienelių struktūra (pagal Gow et al., 2017)

Be įvairių polisacharidų, kurie paprastai sudaro 90 % ląstelės sienelės masės, pelėsinų grybų ląstelės sienelėje randama fermentų, kurie specializuojasi angliavandenių sintezėje ir pertvarkyme. Chitino ir gliukano sintazės yra įterptos į membraną, o struktūrą pertvarkantys fermentai, pavyzdžiui, glikohidrolazės, glikozidazės arba transglikozidazės yra pritvirtintos prie plazminės membranos per glikozilfosfatidilinozitolio inkarą (de Francisco, 2021).

1.2. *Aspergillus fumigatus* rūšis

Aspergillus fumigatus yra svarbus žmogaus patogenas, sukeliantis keletą ligų, tokių kaip alerginė bronchų ir plaučių aspergiliozė, aspergiloma ir invazinė aspergiliozė. Tokiomis ligomis serga žmonės, kurių imunitetas nusilpęs. Ši rūšis taip pat aptinkama kaip saprofitas, atliekantis esminį vaidmenį perdirbant anglį ir azotą dirvožemyje. Natūrali *A. fumigatus* niša ir yra dirvožemis, kuriame gausu organinių junginių. Ši rūšis buvo laikoma labai kintančia pagal savo savybes ir morfologiją, tačiau *A. fumigatus* yra vienalytė, atsižvelgiant į ekstrolitų profilius, restrikcijos fragmentų ilgus ir mitochondrijas (Hong, Go, Shin, Frisvad, & Samson, 2005).

A. fumigatus pelėsinis grybas yra labiau paplitęs negu kiti jo genties atstovai, nes palyginus su kitomis rūšimis, šie pelėsiniai grybai turi daugiau galimybių išgyventi ir augti įvairesnėmis aplinkos sąlygomis. Konidijos, išsiskiriančios iš konidioforų saprofitiniame tinkle, lengvai išsisklaido aplinkoje ir yra neveiksnios tol, kol neatsiranda tinkamos sąlygos, aktyvinančios jų metabolizmą. Atsiradus tinkamoms sąlygoms, konidijos išbrinksta ir sudygdamos sudarydamos hifų filamentus, kurie išauga į grybą. Visas saprofitinio tinklo ciklas pavaizduotas 2 pav. Pati *A. fumigatus* rūšis gali augti visur, kur dirvožemio ir yrančios augalijos temperatūra varijuoja nuo 12 iki 65 °C, o pH varijuoja nuo 2,1 iki 8,8. Pastebėta, kad *A. fumigatus* genome yra daug genų, koduojančių glikozilhidrolazes ir tarpląstelines proteinazes, kurių produktai palaiko gebėjimą sėkmingai augti (Sugui, Kwon-Chung, Juvvadi, Latgé, & Steinbach, 2015).



2 pav. Saprofitinio tinklo schema (pagal Sugui, Kwon-Chung, Juvvadi, Latgé, & Steinbach, 2015)

A. fumigatus pelėsinio grybo proteomoje aptikta 1111 specifinių baltymų, kurie sudaro tik 11,2 % visos šio pelėsinio grybo proteomo. 42 % *A. fumigatus* baltymų yra išskirtinai konservatyvūs eukariuotose, o 27 % jų yra konservatyvūs tik archėjose, bakterijose ir kai kuriuose eukariotuose. Labai nedaug šio pelėsinio grybo baltymų yra konservatyvūs tik archėjų (<0,2 %) ir bakterijų (<0,5 %) gyvybės domenuose (Tekaia & Latgé, 2005).

1.2.1. *A. fumigatus* ląstelės sienelė

Ląstelės sienelė sudaro 20–40 % sausos *A. fumigatus* micelio masės. Ląstelės sienelės frakcionavimo tyrimai, naudojant šarmų ekstrahavimo metodus, parodė, kad vidinė ląstelės sienelė atitinka šarmuose netirpias ląstelės sienelės preparatų frakcijas, o išoriniai ląstelės sienelės komponentai randami šarmuose tirpioje frakcijoje. Vidinėje ląstelės sienelės frakcijoje daugiausiai yra β -1,3-gliukanų (51 %) ir chitino (22 %) bei nedidelių chitozano (7 %) komponentų, β -1,3;1,4-gliukanų (6 %), galaktosaminogalaktano (7 %) ir galaktomanano (8 %). Kartu šie polisacharidai sudaro standų, struktūrizuotą ląstelės sienelės karkasą. Išorinėje ląstelės sienelės frakcijoje daugiausiai randama α -gliukanų (92 %), su nedideliais galaktozaminogalaktano (5 %) ir galaktomanano (3 %) komponentais. Atsižvelgiant į α -1,3-gliukano tirpumą šarmuose, imuninis ženklinimas anti- α -1,3-gliukano antikūnais patvirtino, kad α -1,3-gliukanas yra lokalizuotas išorinėje ląstelės sienelėje. Nors beveik visi α -1,3-gliukanai, rasti *A. fumigatus*, yra susiję su α -1,3 ryšiu, tačiau buvo pranešta, kad apie 1 % turi α -1,4 ryšius (de Francisco, 2021; Lee & Sheppard, 2016).

Lazdelės struktūros sluoksnis, randamas *A. fumigatus* ląstelės sienelės sudėtyje, dengia konidijų paviršių ir suteikia joms hidrofobiškumą, taip palengvinant pastarųjų sklaidą ir padidinant atsparumą vandeniui. Be to, šis sluoksnis apsaugo konidijas nuo išdžiūvimo. Šį lazdelės struktūros sluoksnį sudaro cisteino turintys baltymai hidrofobinai, kurie sugeba savaime agreguotis bei padidinti paviršiaus hidrofobiškumą, taigi, apriboti ir vandens judėjimą (de Francisco, 2021; Fricker, Heaton, Jones, & Boddy, 2017).

Konidijose aptinkamas ir melanino sluoksnis, kuris buvo aprašytas kaip grybinių patogeninių rūšių virulentiškumo faktorius. *A. fumigatus* atveju, plikai žalios spalvos konidijų ląstelės paviršius susidaro dėl melanino, kuris susideda iš makromolekulių, susidarančių oksidacinės fenolio junginių polimerizacijos būdu, sintezės. Konidijų ląstelės sienelėje randamas pelėsinio grybo melanino tipas yra 1,8-dihidroksinaftaleno melaninas (DHN-melaninas) (Mouyna & Fontaine, 2014).

1.3. Grybiniai hidrofofinai

Grybiniai baltymai hidrofofinai pirmą kartą buvo aptikti 1990-ųjų pradžioje, ieškant genų, kurių raiška pastebima prasidedant *Schizophyllum commune* pelėsinio grybo augimui. Pavadinimas „hidrofofinai“ buvo įkvėptas hidrofofinų struktūrų, esančių daugelio prokariotinių ir eukariotinių mikroorganizmų ląstelių sienelėse ir aplink jas. Kaip ir daugelyje gijinių pelėsinų grybų, pirminis micelis, išaugantis iš sporos, sudaro hifus. Dėl hifų vėliau susiformuoja antrinis micelis, kuris sudaro patį pelėsinį grybą. Gausiausiai išreikšti genai buvo sekvenuoti (Schuren & Wessels, 1990), atskleidžiant, kad mažiausiai keturi iš dešimties klonuotų genų koduoja panašius mažus cisteino turinčius hidrofofinus baltymus. Tuo metu šie baltymai buvo visiškai nežinomi. Buvo pastebėta, jog vieno iš šių genų produktas, baltymas SC3, sintetinamas hifų sienelėse, o gausus kito geno produktas, baltymas SC4, buvo aptiktas micelio, formuojančio pelėsinio grybo ląstelę, sienelėje. Panašiu laiku atrastas *Aspergillus nidulans* genas su homologija *S. commune* hidrofofinų genams. Išsiaiškinta, kad daugiausiai šio baltymo randama pelėsinų grybų sporose, tačiau skirtingose rūšyse jo vieta ir pats kiekis gali būti skirtingas (Stenbæk, 2015; Wessels, 1997).

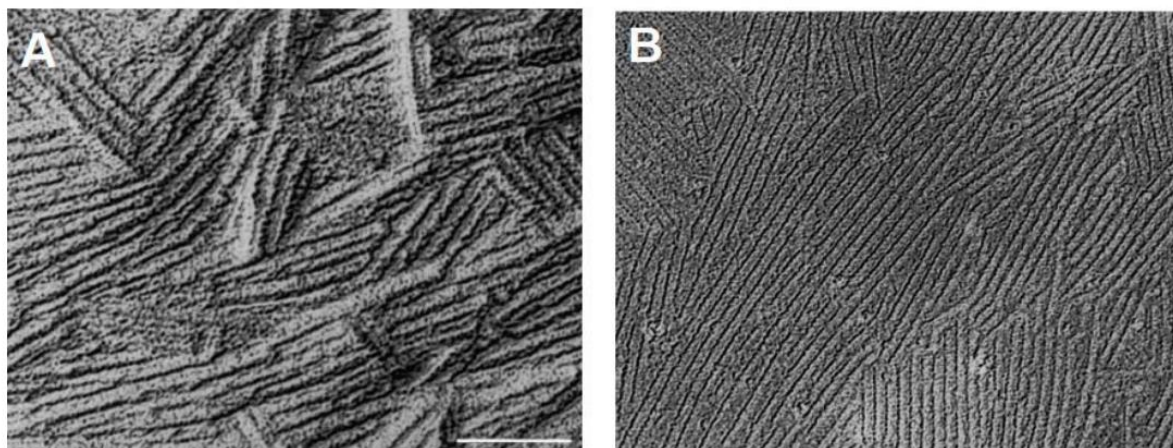
Hidrofofinai yra baltymų grupė, turinti unikalią savybę spontaniškai susiburti į amfifilinius sluoksnius ir taip pakeisti paviršiaus hidropatiją (Hakanpää, Szilvay, & Kaljunen, 2006). Hidrofofinai aptinkami zigomicetuose, askomicetuose ir daugelyje bazidiomicetų. Skirtingi vaidmenys pelėsinų grybų gyvavimo cikle buvo priskirti hidrofofinams, pavyzdžiui, ląstelės sienelės vientisumas, oro kanalų sudarymas dujų mainams vaisiakūniuose, konidiosporų padengimas ir jų apsauga nuo vandens bei kaip augalų apsaugą suteikiantys arba skatinantys hifų sąlytį su augalų paviršiais patogeninės sąveikos metu baltymai. Preliminariame tyrime hidrofofinai buvo aptikti tik hifuose. Nuodugnesnis tyrimas, naudojant baltymo ženklinimą imunoauksu itin plonose mikorizės atkarpose, aptiko hidrofofinus Hartigo tinkle, kur kiekviena pelėsinio grybo ląstelė padengta hidrofofinais. Hidrofofinų sluoksnio įtaka maistinių medžiagų mainams neaiški, nes simbiotinio audinio funkcija išlieka stabili, kadangi hifų sienelės paviršius tampa nepralaidus vandeniui (Mankel, Krause, & Kothe, 2002).

Baltymai hidrofofinai yra vienos iš labiausiai žinomų paviršiaus aktyviųjų biomolekulių. Juose yra apie 100 aminorūgščių, šie baltymai taip pat yra nepaprastai stabilūs ir gali atlaikyti temperatūrą, artimą vandens virimo temperatūrai. Dėl šių priežasčių hidrofofinai gali būti naudojami kaip adhezijos molekulės imobilizuojant kitus baltymus ir kaip žymės sulietuose baltymuose gryninimui afininės chromatografijos būdu. Pastarasis metodas pagrįstas labai dideliu hidrofofinų pasiskirstymu paviršinio aktyvumo medžiagos ir vandens dvifazėse sistemose (Hakanpää et al., 2004).

1.3.1. Hidrofobinų funkcija pelėsinuose grybuose

Hidrofobinai yra mažos molekulinės masės baltymai, kuriuos išskiria filamentiniai pelėsiniai grybai, pasižymintys nepaprastomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis. Šie baltymai išskiriami tirpia forma, kuri savaime asocijuojasi į amfifilinius sluoksnius hidrofofinėse–hidrofilinėse arba oro–vandens sąsajose. Hidrofobinų sluoksnių paviršinio aktyvumo medžiaga ir amfifilinė prigimtis padeda formuotis esminėms gijinių pelėsinų grybų oro struktūroms, tokioms kaip hifai, vaisiakūniai ir sporos (Valsecchi et al., 2018).

Genetiniais tyrimai parodyta, kad hidrofobinai taip pat yra įtraukti į morfogeninius procesus ir buvo pastebėta, jog jų pagrindinis vaidmuo yra formuoti lazdelės formos struktūros (angl. *rodlet*) baltymų sluoksnius, esančius ant pelėsinų grybų paviršių. Hidrofobinės lazdelės formos struktūros ant skirtingų dviejų pelėsinų grybų rūšių pavaizduotos 3 pav. Verta paminėti, jog šių struktūrų sluoksnių vaidmuo pelėsinuose grybuose nėra iki galo aiškus. Šios struktūros yra ypač hidrofobiškos, o vandens sąlyčio kampai su hifų paviršiumi dažnai viršija 120°. Tyrėjai Kershaw et al. atskleidžia, jog mutantai, koduojantys hidrofobinus, šias lazdelės formos struktūras naudoja paviršiaus hidrofobiškumo generavimui, tačiau tikslus struktūrinis išdėstymas nėra visiškai aiškus. Taip pat buvo pastebėta, jog šių struktūrų pavieniai komponentai yra per maži, jog prisidėtų prie hidrofobiškumo, nes topologinės savybės turi viršyti maždaug 100 nm, o pavieniai komponentai retai būna didesni nei 15 nm skersmens (Kershaw & Talbot, 1998).



3 pav. Hidrofobinų lazdelės formos struktūros sluoksniais apgaubtos: A – *N. crassa* konidijos, 100 nm; B – *A. nidulans* konidijos (pagal Kershaw & Talbot, 1998)

Dar nėra aišku, ar paviršinius lazdelės formos struktūros sluoksnius sudaro tik hidrofobinų agregatai. Šios struktūros identifikuotos išgryninto SC3 baltymo paviršiaus padengimu ir yra panašios į *S. commune* hifuose suformuotus lazdelės formos struktūros sluoksnius – nepaisant to, šios struktūros kokybiškai skiriasi atskirų komponentų ilgių atžvilgiu, nors buvo nustatyta, kad ilgį

gali nulemti skirtinga hidrofobinų monomerų koncentracija (Wosten, Schuren, & Wessels, 1994). Įdomu tai, kad *Aspergillus nidulans* sporų sienelėse yra daugiau nei vienas hidrofobinų tipas, o tai parodo, jog lazdelės formos struktūrų sluoksnius gali sudaryti daugiau nei vieno baltymo agregatai. *A. nidulans rodA⁻* mutantai, išreiškiantys *dewA* geną, atsakingą už hidrofobino sintezę, neturi šio sluoksnio. Iš principo tai įrodo, kad *rodA* gene užkoduotas hidrofobinas yra pagrindinis sluoksnio komponentas (Bell-Pedersen, Dunlap, & Loros, 1996; Kershaw & Talbot, 1998).

Baltymai hidrofobinai gali būti ir glikozilinti. Pavyzdžiui, baltymai SC3 ir hidrofobinas iš *Pleurotus ostreatus* buvo konjuguoti su angliavandeniais. Taip pat pastebėta, kad hidrofobinas kiparinas, randamas gijinių askomicetų *Cryphonectria parasitica* ląstelių paviršiuje, lygiai taip pat pasižymi lektinų surišimo aktyvumu. Visa tai tik patvirtina, jog angliavandenių sąveika taip pat nulemia hidrofobino lazdelės formos struktūrų sluoksnio charakteristiką (Carpenter et al., 1992).

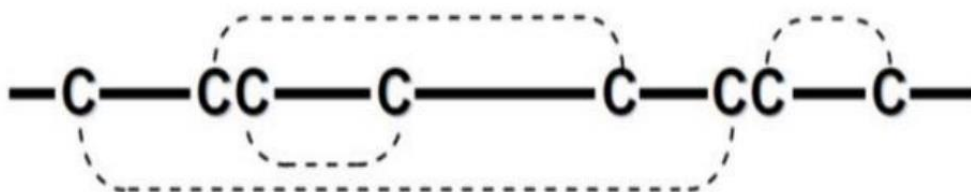
Be N-galo apdorojimo ir disulfidinių jungčių susidarymo, kai kuriuose hidrofobinuose buvo nustatytos kitos potransliacinės modifikacijos. *P. ostreatus* baltymai POH2 ir SC3 yra glikozilinti. SC3 baltyme 17-22 manozės liekanos yra susietos su N-galo domenu per treonino liekanų O-glikozilinimą. Deglikozilinimas *in vitro* atskleidė, kad glikozilinimas sustiprina agregatų ir hidrofobinių paviršių sąveiką ir skatina α spiralių susidarymą. Nežinoma, ar tarp šių poveikių yra koks nors funkcinis ryšys. Kad ir koks būtų SC3 glikozilinimo vaidmuo, hidrofobino funkcijai jis nėra būtinas, nes buvo įrodyta, kad kiti hidrofobinai nėra glikozilinti, pvz. *Agaricus bisporus* ABH3 ir CFHT1. Manoma, kad galbūt glikozilinimas SC3 N-gale yra funkciškai analogiškas biomodulinių hidrofobinų N-galiniams hidrofiliniams domenams ir tarnauja kaip inkaras tarp hidrofobinų ir hidrofilinių ląstelių sienelių (Alexander & Building, 2002).

Verta paminėti, jog hidrofobinai ne tik formuoja lazdelės formos struktūras, bet sudaro ir sluoksnius, kurie savo ruožtu užsandarina tarpus tarp agregavusių hifų, taip susidarant sudėtingesniems kompleksams. *S. commune* hidrofobinas SC4 atlieka šį vaidmenį, sujungdamas vidines oro erdves ir tarpus tarp agregavusių hifų (Wessels, 1997). Dėl šios priežasties hidrofobinų formuojamos struktūros gali apjungti hifus vieną su kitu arba su substratu. Tai yra labai svarbu, nes sudėtingoms pelėsinų grybų struktūroms reikalinga hifų agregacija augimui bei dujų transportui audiniuose – daugumoje pelėsinų grybų rūšių vidiniai dujų transporto kanalai yra padengti būtent hidrofobinų sluoksniais (Kershaw & Talbot, 1998).

1.3.2. Grybinių hidrofobinų struktūra ir klasifikacija

Tyrėjas Wessels (Wessels, 1997) suskirstė hidrofobinus į dvi klases – I ir II klasę. Šis pagrindinis skirstymas vis dar taikomas, nors Jensen et al. (Jensen et al., 2010) atskleidė, jog ne visus *Aspergillus* rūšių hidrofobinus galima aiškiai suskirstyti į šias dvi klases. Buvo pasiūlyta ir

III hidrofobinų klasė, pasižyminti šiek tiek kitokiomis savybėmis. Nepaisant to, I klasės hidrofobinai randami askomicetuose ir bazidiomicetuose, tuo tarpu II klasės hidrofobinai yra aptinkami tik askomicetuose (Jensen, Andersen, Pedersen, Frisvad, & Søndergaard, 2010; Stenbæk, 2015).



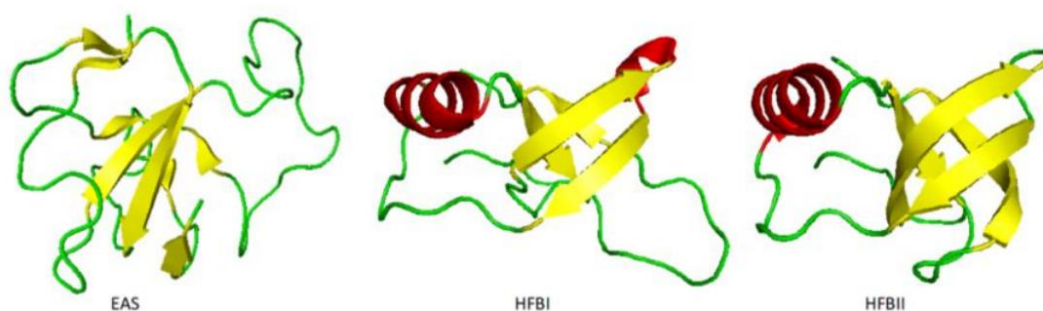
4 pav. Aštuonių hidrofobinų cisteino liekanų disulfidinių ryšių išsidėstymas *Terreus reesei* baltymo HFBII struktūroje, parodytas punktyrinėmis linijomis (pagal Sanna, 2006)

Baltymų hidrofobinų molekulės paprastai sudarytos iš 70–130 aminorūgščių ir apima sekrecijos signalo seką. Pagal pirminę struktūrą hidrofobinai gali turėti nepaprastą įvairovę, tačiau jiems būdingos aštuonios konservatyvios cisteino liekanos, kurios sekoje atsiranda pagal šiems baltymams būdingą modelį (Hakanpaa et al., 2006). Hidrofobinuose yra labai menkas sekų konservatyvumas, neskaitant jau paminėtų aštuonių cisteino liekanų, sujungtų disulfidiniais ryšiais (Cys1-Cys6, Cys2-Cys5, Cys3-Cys4, Cys7-Cys8) (Bayry, Aïmanianda, Guijarro, Sunde, & Latge, 2012). Disulfidinių ryšių vietos hidrofobinų sekoje bendra schema pavaizduota 4 pav. Tuo tarpu tariami III klasės hidrofobinai turi tarpinius hidropatijos profilius ir gali turėti daugiau arba mažiau cisteino liekanų. Taip pat šių baltymų struktūroje gali trūkti sekrecijos signalo peptidų, be to, kai kurie iš jų turi labai ilgas N-galo arba C-galo uodegėles (Jensen et al., 2010; Littlejohn, Hooley, & Cox, 2012).

I klasės hidrofobinų seka tarp trečiojo ir ketvirtojo konservatyvių cisteinų yra šiek tiek ilgesnė nei II klasės hidrofobinų, o tarpai tarp konservatyvių cisteino liekanų yra nekintantys (Hakanpaa et al., 2006). Matomas ryškus skirtumas tarp I ir II klasės hidrofobinų, tokių kaip hidrofobinių ir hidrofilinių liekanų išsidėstymas pagal pirminę seką, tarpai tarp cisteino liekanų. Pavyzdžiui, I klasės hidrofobinai gali sudaryti dviejų domenų baltymus su keturiomis kilpomis, išsidėsčiusiomis aplink disulfidines jungtis. Antrosios ir ketvirtosios kilpos ilgis tarp kiekvieno I klasės hidrofobino labai skiriasi. II klasės hidrofobinų sudaromų kilpų ilgis yra įvairesnis, o atstumas tarp kiekvieno domeno yra nekintantis. Abiem atvejais antroji ir ketvirtoji kilpos daugiausiai yra hidrofobinės, jose yra didelių hidrofobinių liekanų (metionino, izoleucino, leucino, valino), apsuptų nepolinių aminorūgščių (glicino, alanino) arba liekanų, kurios nesumažina grynosios hidropatijos (treonino, tirozino). Todėl hidrofobino monomerai gali susilankstyti tiesiai į amfifilinę konfigūraciją (Kershaw & Talbot, 1998).

Kaip minėta, I hidrofobinų klasėje pastebimi dideli skirtumai tarp cisteino liekanų tarpų – šie hidrofobinai susirenka į labai netirpius polimerinius monosluoksnius, sudarytus iš fibrilinių struktūrų, dar žinomų kaip lazdelės formos struktūros. Šios struktūros yra labai stabilios ir gali būti suardomos tik apdorojant stipriomis rūgštimis, o tirpios formos tinkamomis sąlygomis gali polimerizuotis atgal į lazdelės formos struktūras. Tuo tarpu II klasėje seka ir tarpai tarp cisteino liekanų yra labiau konservatyvūs, šių baltymų suformuoti monosluoksniai neturi fibrilinės lazdelės formos struktūros morfologijos ir gali būti suardomi apdorojant organiniais tirpikliais ir detergentais (Bayry et al., 2012). Nustatyta, kad I klasės hidrofobinų sluoksnių susidarymas lemia lazdelės formos struktūros mozaikinį raštą, primenantį amiloidines fibriles, o II klasės hidrofobinų agregatai yra neamiloidiniai ir adatėlių formos (Hakanpaa et al., 2006).

Visi hidrofobinai turi netaisyklingo β cilindro šerdį, sudarytą iš keturių nelygiagrečių β klosčių. I klasės hidrofobinuose du iš keturių disulfidinių ryšių tarp cisteino liekanų gali būti aptinkami cilindro šerdies centre, o likusios dvi jungtys yra sujungtos su cilindro paviršiumi šalia esančia kilpa ir papildoma nelygiagrečia β klostė. II klasės hidrofobinuose vietoj papildomų I klasės hidrofobinuose esančių struktūrų yra α spiralė. Cilindro šerdies centre gali būti dvi disulfidinės jungtys, viena iš jų jungia β cilindro šerdį ir α spiralę, kita jungia β cilindro šerdį ir N-galinę kilpą (Stenbæk, 2015). Disulfidinių jungčių, esančių β cilindro šerdies centre, skirtumai tarp hidrofobinų klasių pavaizduoti 5 pav.



5 pav. I klasės hidrofobino EAS iš *N. crassa* ir II klasės hidrofobinų HFBI ir HFBII iš *T. reesei* struktūros. Visi pavaizduoti baltymai savo struktūroje turi β cilindro šerdį su keturiomis nelygiagrečiomis β klostėmis. Hidrofobinas EAS turi papildomą β klostę, tuo tarpu HFBI ir HFBII turi α spiralę (pagal Stenbæk, 2015)

Hidrofobinų agregaciją lydi ir konformaciniai pokyčiai. Monomeriniai I ir II klasės hidrofobinai, kaip jau buvo minėta, turi daug β klostės struktūrų. Vandens ir oro sąsajoje I klasės hidrofobinai įgauna daugiau β klostės struktūrų, o vandens ir hidrofobinės kietos medžiagos sąsajoje stebima baltymo forma su padidėjusiu α spiralių kiekiu. Atrodo, jog α spiralės buvimas yra tarpinė agregacijos būseną, o β klostės struktūra yra stabili galutinė forma. Vandens ir oro

sąsajoje I klasės hidrofobinų monomerai α spiralės būseną pasiekia per kelias sekundes, tačiau konversija į β klostės būseną yra ženkliai lėtesnė ir trunka nuo minučių iki valandų (Han, 2001).

1.3.3. Hidrofobinus koduojančių genų ekspresija ir jos reguliavimas

Daugelis pelėsinų grybų rūšių turi daugiau nei vieną hidrofobino geną. Įrodyta, kad I ir II klasės hidrofobinai pasitaiko ir toje pačioje pelėsinų grybų rūšyje. Pomidorų patogene *Cladosporium fulvum* buvo nustatyti keturi I klasės ir du II klasės hidrofobinai, tuo tarpu kukurūzų patogene *Fusarium verticillioides* nustatyti trys genai, koduojantys I klasės hidrofobinus ir du genai koduojantys II klasės hidrofobinus. Ryžių patogene *Magnaporthe oryzae* yra bent po vieną geną, koduojantį I ir II klasės hidrofobinus. Iš principo, panaši situacija turėtų būti ir daugelyje kitų askomicetų (Sanna, 2006).

Atlikta grybų genomų analizė rodo, kad daugumoje rūšių hidrofobinai egzistuoja kaip mažos genų šeimos, turinčios nuo dviejų iki septynių narių, išskyrus grybą *Coprinus cinereus*, kuris turi 23 genus. Kadangi *C. cinereus* ir keleto kitų grybų genomų sekos yra užbaigtos, manoma, jog toks hidrofobinus koduojančių genų skaičius gali būti būdingas ir kitiems grybams. Hidrofobinų genai nebuvo anotuoti iš zigomicetų ir chitridų genomo sekų, nors buvo pastebėti hidrofobinų formuojamos polimerinės lazdelės formos struktūros sluoksniai (Sunde, Kwan, Templeton, Beever, & Mackay, 2008).

Kaip buvo minėta anksčiau, hidrofobinai dalyvauja įvairiuose morfogeniniuose procesuose, todėl jų sintezei taikomas sudėtingas reguliavimas. Hidrofobinų, kaip morfogeninių tikslinių genų, tyrimas atskleidė pagrindinius reguliacijos mechanizmus, susijusius su grybinių ląstelių diferenciacija. Pavyzdys yra *rodA* genas, kurį reguliuoja centrinis BrlA reguliatorius, bet nepriklausomai nuo kitų reguliatorių, tokių kaip WetA ir AbaA. Priešingai, *dewA* geną reguliuoja *wetA* geno produktas, kuris atitinka jo ekspresiją susidarius konidijoms. Naudojant *rodA* geną kaip morfogenetinį taikinį, buvo nustatyti *cis* veikiantys elementai, reaguojantys į BrlA. Jie vadinami BRE (angl. *B recognition element*) elementais. Nuo to laiko šie elementai buvo atpažinti daugelyje *A. nidulans* genų, reguliuojamų BrlA (Kershaw & Talbot, 1998).

BrlA yra laikomas pagrindiniu *Aspergillus* genties vystymosi iniciacijos aktyvatoriumi. Šis genas yra išreikštas ankstyvojoje konidijos vystymosi fazėje. *BrlA* neturintys mutantai dažnai turi pailgus hifus, kurie negali suformuoti struktūros už konidijos kotelio, o būtent tai įrodo, jog genas *brlA* yra būtinas pilnam konidijos susiformavimui. BrlA turi dvi C_2H_2 cinko pirštų sritis ir veikia kaip transkripcijos aktyvatorius. Šis aktyvatorius yra būtinas tinkamai genų, tokių kaip *abaA*, *wetA*, *vosA* ir *rodA*, susijusių su konidijų susidarymu, raiškai. Šių genų promotoriaus regionuose aptinkami *brlA* atsako elementai. *BrlA* taip pat reikalingas kitų struktūrų susiformavimui –

pašalinus šį geną pasikeičia ir kiti genai, susiję su konidijų pigmentacija, gliotoksino biosinteze ir ribosomų susidarymu (Sunde et al., 2008).

Eas/ccg-2 protomotoriaus analizė atskleidė *cis* veikiančius elementus, kurie reguliuoja geno ekspresiją reaguodami į cirkadinius modelius, šviesos ir maistinių medžiagų badą. *Eas* genas, kurį valdo DNR sritis, ekspresuojamas ryte ir žinomas kaip aktyvuojantis elementas. Šis genas yra represuojamas micelio augimo metu ir teigiamai kontroliuojamas mėlyna šviesa bei transkripcijos aktyvatoriumi, dalyvaujančiu konidijos susiformavimo metu (Kershaw & Talbot, 1998).

A. fumigatus ir *A. nidulans* I klasės hidrofobinių genai daugiausiai išreiškiami kultūrai sporuliuojant, kadangi tuo pačiu metu vystosi konidijos. *A. nidulans* I klasės hidrofobinių genai nėra išreiškiami micelyje, tuo tarpu *A. fumigatus* *rodA* ir *rodB* genai išreiškiami net susidarius biofilmui. RodD, cisteinų liekanomis gausus hidrofobinas, neturi tipiško hidropatijos profilio ir hidrofobinams būdingų aštuonių cisteinų. Nepaisant to, šio baltymo geno raiška pastebima tiek sporuliuojančioje kultūroje, tiek susiformavus biofilmui, tačiau jo raiška yra nuo 30 iki 125 kartų mažesnė, nei *rodB* geno. Kita pelėsinių grybų klasė, turinti aštuonių cisteino modelio CFEM domeną, turi signalinį peptidą. Kitos gerai apibūdintos šešis–aštuonis cisteinus turinčios sritys yra EGF (epidermio augimo faktoriaus) domenai. Šie baltymai yra susiję su biogeneze, biofilmo struktūros ir vientisumo palaikymu, sukibimo signalo transdukcija ir ląstelių paviršiaus receptoriais. Tačiau RodD baltymas neturi nei signalinio peptido, nei CFEM ar EGF domenų, be to, nebuvo aptikta nei viena iš funkcijų, susijusių su CFEM ar EGF domenais turinčių baltymų. Šio baltymo ir jų reguliuojančio geno funkcijos lieka neaiškios (Valsecchi et al., 2018).

1.3.4. Biologinės hidrofobinių funkcijos

Biologinės hidrofobinių funkcijos priklauso nuo jų formuojamų sluoksnių fizikinių ir cheminių savybių. Pavyzdžiui, *S. commune* baltymo SC3 pagrindinis vaidmuo yra apgaubti hifų paviršių ir taip leisti šioms struktūroms sumažinti vandens paviršiaus įtempimą bei pažeisti oro–vandens sąsają. SC3 mutantai po delecijos nesugeba suformuoti orinių struktūrų, tačiau rekombinantinio SC3 pridėjimas į terpę papildė deleciją ir suteikia galimybę pelėsiniam grybui suformuoti orines struktūras. Visa tai parodo, jog SC3 vaidmuo yra svarbus teisingam pelėsinio grybo vystymuisi (Han, 2001). Panašūs hidrofobinai, kuriuos koduoja genas *hypA* buvo rasti Portobello grybuose, dar žinomuose kaip *A. bisporus*. Šių grybų hidrofobinai sumažina drėgmę ir didina atsparumą aplinkos sukeltam stresui (de Francisco, 2021).

Nelytinės grybo sporos, konidijos, kurias formuoja *Ascomycetes* oriniai hifai, paprastai yra labai hidrofobinės, ir tai palengvina jų sklaidą ore. Nustatyta, kad keli hidrofobinai, tokie kaip *A. fumigatus* RodA, *N. crassa* EAS ir *Cladosporium fulvum* HCF-1, yra susiję su konidijų

hidrofobiškumu. Jau yra įrodymų, kad RodA ir EAS koduojančių genų delecija pablogina konidijų sklaidą ore. Be to, geno, koduojančio HCF-1, delecija sumažino konidijų gebėjimą surinkti vandens lašelius. Taigi, hidrofobinų danga ant konidijų palengvina jų plitimą (Sanna, 2006).

Nors daugelis pelėsinių grybų auga ant negyvų audinių, kai kurie iš jų gali augti palaikydami simbiotinius ryšius su kitais gyvais organizmais. Nustatyta, jog hidrofobinai atlieka svarbų vaidmenį tokioje sąveikoje. MGP-1, I klasės hidrofobino iš *Magnaporthe grisea* genų delecija sumažino patogeniškumą bei suteikė hidrofilinį fenotipą. MHP-1, II klasės hidrofobinas iš to paties pelėsinio grybo, taip pat buvo labai ekspresuojamas tiek konidijų susidarymo, tiek patogenezės metu (Sunde et al., 2008). Įdomu tai, kad hidrofobinai dalyvauja pačiame patogenezės mechanizme. Pavyzdžiui, *Ophiostoma novo-ulmi* ir *Ophiostoma ulmi* II klasės hidrofobinas CU yra pripažintas toksinu. Tai buvo pagrįsta pastebėjimu, jog suleidus išgrynintą CU injekciją į baltąją guobą, šis baltymas sukėlė augalo vytimą, sumažino kvėpavimą ir elektrolitų kiekį. Manoma, kad tai galėjo sukelti šeimininko, t.y. baltosios guobos plazminės membranos pralaidumas. Dėl šios priežasties buvo pasiūlyta, kad CU yra vienas iš kelių *O. novo-ulmi* patogeniškumo faktorių, kurių kiekvienas yra būtinas ir kartu suteikia visišką patogeniškumą (Han, 2001).

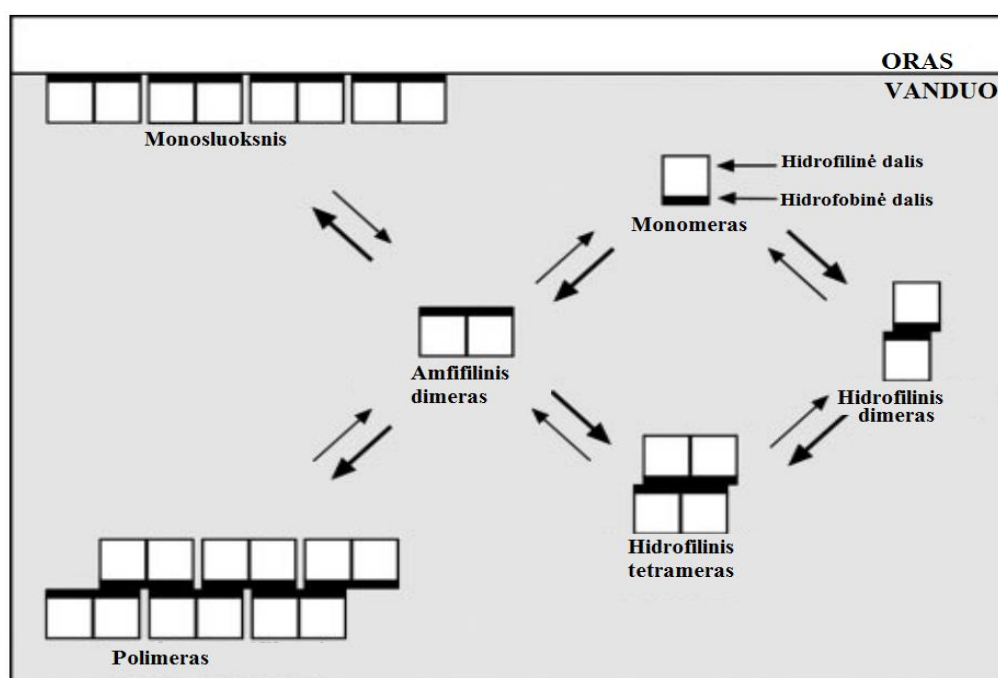
Yra manoma, kad hidrofobinai prisijungia prie pelėsinio grybo sienelių, kai šis susiduria su hidrofilinė–hidrofobine sąsaja. Ši sąsaja gali atsirasti tarp hidrofilinės ląstelės sienelės ir, pavyzdžiui, oro arba hidrofobinės kietos medžiagos. Tokia hipotezė atitinka imunolokalizacijos tyrimą, kuris parodė, jog *S. commune* hifų ląstelių sienelėse nebuvo SC3 hidrofobinų, kuomet pelėsinis grybas augo be sąsajos su oru. Kita vertus, imunolokalizacijos eksperimentais įrodyta, kad II klasės hidrofobinas CRP jungiasi prie *C. parasitica* ląstelių sienelių skystoje fazėje, nesant hidrofilinės–hidrofobinės sąsajos. Manoma, kad šis prisijungimas atsirado dėl į lektiną panašių CRP savybių. Lektinai yra angliavandenius surišantys baltymai, turintys vieną ar daugiau vietų, kurios yra labai specifinės įvairioms cukraus struktūroms. Į lektino panašus aktyvumas taip pat buvo įrodytas SC3 ir SC4 hidrofobinams (Sanna, 2006).

1.3.5. Hidrofobinų formuojami sluoksniai

Paprastai hidrofobinai apibūdinami kaip monomerai, esantys tirpale, tačiau labiau tikėtina, jog jiems būdingas silpnai susijusių oligomerų susidarymas. Susidarant oligomerams formuojami hidrofobinų sluoksniai, kuomet egzistuoja oro–vandens arba aliejaus–vandens sąsajos. Taigi oligomerai susidaro tirpaluose ir dažniausiai tai yra dimerai arba tetramerai, kurie išsidėsto taip, jog hidrofobinės baltymo dalys yra nepasiekiamos vandeniniam tirpikliui. Oligomerinių formų susidarymas ir tarpusavio konversija priklauso nuo monomerų koncentracijos. Žinoma, šios

sąveikos turėtų būti gana silpnos, tačiau laikomos labai svarbiomis, nes priešingu atveju spontaniškas hidrofobinių sluoksnių susidarymas būtų lėtas procesas (Cox & Hooley, 2009).

Manoma, kad oligomerizacijos procesas lemia pačių hidrofobinių tirpumą, nepaisant jų amfifiliškumo, o energetiniai principai laikomi savaiminės agregacijos varomąja jėga (Lienemann et al., 2013). Hidrofobinių kristalinėse struktūrose molekulių sąveikos vyksta per hidrofobines baltymo paviršiaus dalis. Ortorombinėje baltymo kristalinėje struktūroje pastebima glaudi sąveika. Dvi asimetriniame vienetuose esančios molekulės sudaro sandariai susiglaudusį dimerą, kuris nepaslepia hidrofobinių paviršiaus sričių, o išlygiuoja juos vienoje dimero pusėje. Kai šis amfifilinis dimeras yra prikibęs prie tetramero, turinčio hidrofobinę sąveiką, jo padėtis yra artima dvejoms nedimerinėms molekulėms (tik šiek tiek pakreipus), kurios atsiranda iš dviejų skirtingų sudedamųjų dimerų. Pavyzdžiui, monomerinis baltymas HFBII tirpale pirmiausia oligomerizuojasi iki dimerų, laikomų kartu hidrofobinės sąveikos būdu, o vėliau, sujungus du dimerus, sudaro tetramerą. Tetrameras gali skilti iki dimero, kuris turi abiejų molekulių hidrofobines paviršines dalis, išsidėsčiusias vienoje dimero pusėje ir paruoštas sąveikauti su hidrofobiniu paviršiumi. Tuomet amfifilinis dimeras įtraukiamas į agregatą ant hidrofobinės–hidrofilinės sąsajos arba (esant pertekliniam hidrofobino kiekiui) į fibrilinę struktūrą (Kallio, Linder, & Rouvinen, 2007). Scheminis viso veikimo mechanizmo vaizdas parodytas 6 pav.

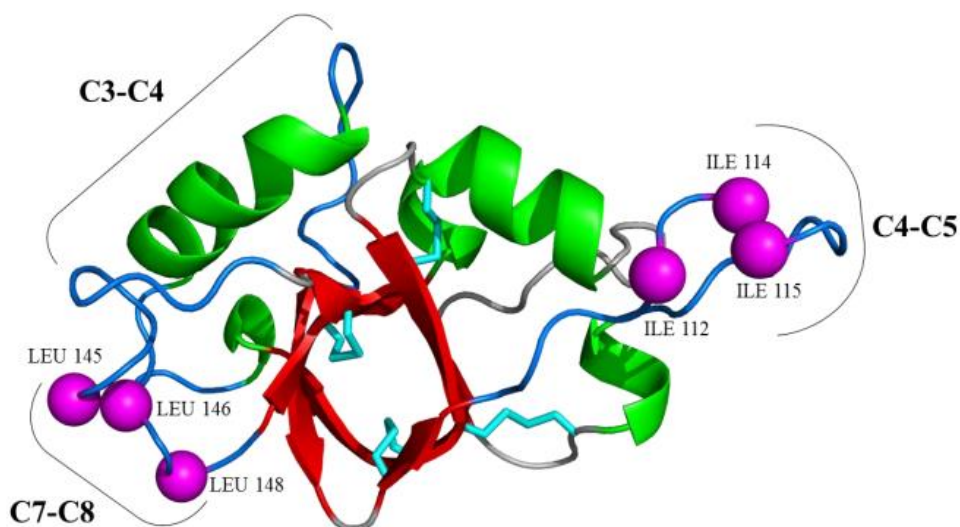


6 pav. Funkcinio hidrofobinių mechanizmo schema. Monomerai multimerizuojasi į dimerus, iš kurių du sudaro tetramerą. Tetrameras gali skilti į du naujus dimerus, kurių hidrofobiniai paviršiaus plotai yra sulygiuoti. Šie amfifiliniai dimerai yra prieš amfifilinio monosluoksnio susidarymą hidrofobinėje–hidrofilinėje sąsajoje. Esant didelei koncentracijai, hidrofobinių perteklius sudaro fibrilų (polimerines) struktūras (pagal Kallio, Linder, & Rouvinen, 2007)

1.3.6. *A. fumigatus* hidrofobinai

Iš esmės egzistuoja trys pagrindinės charakteristikos, kurios apibūdina hidrofobinus: aštuonių cisteino liekanų modelio buvimas, hidropatijos profilis ir gebėjimas sudaryti arba nesudaryti amiloidinius pluoštus, padalijančius hidrofobinus į skirtingas klases. *A. fumigatus* genome buvo nustatyti septyni galimi hidrofobinų genai, koduojantys RodA, RodB, RodC, RodD, RodE, RodG ir RodF hidrofobinus. Šie baltymai turi nuo 125 iki 211 aminorūgščių ir išskyrus RodD bei RodE, visi baltymai turi N-galo signalinį peptidą. RodA, RodB ir RodC artimi homologai su daugiau nei 40 % sekos padengimu ir 50 % panašumu tarp jų (Valsecchi et al., 2018).

Plačiausiai ištirtas *A. fumigatus* hidrofobinas yra RodA. Šiuo metu yra nustatyta, jog natyvus rekombinantinis baltymas RodA *in vitro* savaime agreguojasi į lazdelės formos struktūros sluoksnius, kurių morfologija panaši į matomą sporų paviršiuje. Natyvių disulfidinių jungčių integralumas yra būtinas, norint suformuoti šiuos sluoksnius tiek *in vivo* ir *in vitro*. Pati baltymo RodA struktūra turi tipiską, hidrofobinams būdingą susilankstymą, išsidėsčiusį aplink keturis disulfidinius ryšius, o β -cilindro šerdis yra apjungta dviem disulfidiniais ryšiais (7 pav.).



7 pav. RodA baltymo tirpalo struktūros vaizdas. Disulfidiniai ryšiai pažymėti žydra spalva, β -klostės – raudona, α -spiralės – žalia. Tarpcisteininės kilpos regionai pažymėti mėlyna spalva. Svarbūs RodA agregacijos liekanos pažymėtos purpurinės spalvos sferomis. Cisteinai žymimi pagal atitinkamą vietą sekoje (de Francisco, 2021)

Baltymų dinamikos analizė ^{15}N relaksacijos būdu atskleidė, kad struktūros šerdis standi, baltymo N-galinė sritis yra netvarkinga ir Cys4-Cys5 bei Cys7-Cys8 tarpcisteininės kilpos sritys yra lanksčios. Baltymo paviršius turi amfifilinį pobūdį su dviem hidrofobinėmis dėmėmis šiuose dinaminiuose regionuose, taip pat ir Cys3-Cys4 regione. Taškinė mutacijų analizė parodė 6 hidrofobines liekanas Cys7-Cys8 ir Cys4-Cys5 lanksčiose srityse, kurios stabdo skaidulų

susidarymą *in vitro* bei buvo įrodyta, kad mutacijos dviejose iš šių pozicijų taip pat stabdo lazdelės formos struktūrų susiformavimą sporų paviršiuje (de Francisco, 2021).

RodA antrinės struktūros, disulfidinių jungčių topologijos ir sekos panašumo lygmuo atskleidžia, kad RodB ir RodC hidrofobinių monomerai, kaip ir RodA monomerai, turi β -cilindro formą, organizuotą aplink disulfidinius ryšius, kurie pasižymi tipiška hidrofobinių baltymų topologija (Kwan et al., 2006). Buvo manoma, jog šie trys hidrofobinai turi C-galinį glikozilfosfatidilinozitolio (GPI) inkarą, kuris gali lemti jų ryšį su ląstelių sienele, tyrimai atskleidė, jog hidrofobinai RodA, RodB ir RodC iš tiesų nėra pritvirtinti prie GPI. Nors numatoma, kad jų skilimo vieta tarp cisteino liekanų yra būtent Cys7-Cys8 tarpas, tai suardytų konservatyvią disulfidinę jungtį, kuri svarbi šių baltymų struktūrai (Pille et al., 2015).

RodD, RodE, RodF ir RodG turi labai mažą panašumą tarpusavyje ir su RodA, RodB bei RodC baltymais. RodD turi keletą neįprastų savybių, dėl kurių šio baltymo klasifikacija kaip hidrofobino yra prieštaringa. Šis baltymas neturi sekrecijos signalo, turi itin trumpą Cys3-Cys4 kilpą ir labai ilgą C-galinę uodegą (132 aminorūgščių liekanos) po Cys8, pasižymi netipišku hidropatijos profiliu, rodančiu labai hidrofilišką Cys7-Cys8 sritį, priešingai nei I ir II klasės hidrofobinuose. Bene svarbiausias bruožas, jog jame trūksta vieno cisteino – Cys3 arba Cys4, atsižvelgiant į padėtį. Disulfidinio ryšio nebuvimas tarp cisteino liekanų Cys3-Cys4 visiškai sutrikdytų hidrofobinams būdinga β -cilindro šerdį, kurios stabilumą palaiko S-S ryšiai. Tuo tarpu RodF ir RodG baltymai turi signalinį peptidą ir aštuonių cisteino liekanų modelį (Valsecchi et al., 2018).

Baltymas RodE turi tris papildomus cisteinus, du iš jų būdingo hidrofobinių aštuonių cisteino liekanų modeliai. Šis baltymas taip pat neturi signalinio peptido ir anksčiau buvo išbrauktas iš hidrofobinių šeimos (Jensen et al., 2010). Tačiau jo hidropatijos profilis yra išsaugotas I klasės hidrofobinių RodA, RodB ir RodC. Dėl šios priežasties ir dėl to, kad RodE susilankstymas gali sutalpinti papildomus cisteinus, šis baltymas įvardijamas kaip numanomas I klasės hidrofobinas (Valsecchi et al., 2018).

1.3.7. Amiloidinės fibrilės

Amiloidinės fibrilės yra savaime susitelkiančios gijos, paprastai 0,1–10 mm ilgio ir maždaug 10 nm pločio, susidarančios spontaniškai agreguojant įvairiems peptidams ir tirpiems baltymams (Tycko, 2004). Amiloidinės fibrilės nusėda tarpląstelinio būdu audiniuose. Yra manoma, kad jos turi patogeninį poveikį. Fibriliniai mazgai iš prigimties yra stabilūs, o struktūriniai tyrimai atskleidė, kad juos daugiausiai sudaro β klostės struktūra, kuriai būdinga kryžminė β konformacija. Neseniai buvo nustatyta keletas funkcinų amiloidų pavyzdžių, įskaitant

melanosomų, Curli (amiloidinio baltymo, sintetinamo enterobakterijų) ir hidrofobinių sudedamąsias dalis (Rambaran & Serpell, 2008).

Yra nemažai baltymų, kurie savo biologinei funkcijai atlikti naudoja amiloidinę fibrilinę formą. Šiais laikais aprašytų funkcinį amiloidų tikriausiai yra daugiau nei su ligomis susijusių amiloidų. Funkciniai amiloidai iš tiesų buvo aptikti trijuose gyvybės domenuose – bakterijose, archėjose ir eukariotuose, įskaitant žmones (Sanna, 2006). Šiuose organizmuose aptinkami funkciniai amiloidai paprastai yra nepatogeniniai. Pavyzdžiui, Curli yra funkcinis pluoštas, randamas bakterijų, tokių kaip *E. coli*, paviršiuje. Šio baltymo skaidulos yra struktūriškai panašios į amiloidą ir susidaro iš baltymo, vadinamo CsgA. Fibrilizaciją kruopščiai reguliuoja baltymų aparato kompleksas. Pelėsinių grybų sintetinami hidrofobiniai oro ir vandens sąsajose agreguojasi į pluoštus, kuriuose gausu β klosčių, ir manoma, kad jos atlieka apsauginį vaidmenį. Mielių prionai atlieka funkcinį vaidmenį, sudarydami citoplazminius fibrilinius mazgus, kurie gali būti susiję su paveldimos informacijos perdavimu (Rambaran & Serpell, 2008). Apskritai, amiloidai gali atlikti svarbius fiziologinius vaidmenis, kurie gali būti struktūriniai, modeliniai, sukibimo, biofilmų ir tarpląstelinės matricos formavimo, reguliavimo ir kt. baltymų forma (Sanna, 2006). Daugiau funkcinį amiloidų, kuriuos galima aptikti gamtoje, pavyzdžių pateikta 1 lentelėje:

1 lentelė. Funkcinių amiloidų, kuriuos galima rasti gamtoje, pavyzdžiai (pagal Sanna, 2006)

Rūšis	Organizmo tipas	Baltymas	Funkcija
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Bakterija	MTP	Adhezijai, biofilmo suformavimui, tarpląsteliniam ryšiui
<i>Escherichia coli</i>	Bakterija	Curli	Adhezijai ir biofilmo suformavimui
<i>Bacillus subtilis</i>	Bakterija	TasA	Kolonijų biofilmo suformavimui
<i>Methanosaeta thermophila</i> ir <i>Methanospirillum hungatei</i>	Archėjos	MspA	Ląstelės sienelės sudėtinis baltymas
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Pelėsinis grybas	RodA	Prikibimui prie paviršių, orinių hifų susiformavimui ir paviršių įtempimo modifikacijai
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mielės	Ure2p	Azoto katabolizmui
Pelė, žuvis, šilkinė kandis	Gyvūnai	ZP baltymai (ZP1-ZP3)	Amiloidinės matricos suformavimas apie oocitus

Visi gyvūnai	Gyvūnai	Pmel17	Šablonas melanino sintezės metu melanosomoje
<i>Hevea brasiliensis</i>	Augalas	REF	Latekso komponentas

Ankstyvieji amiloidinių fibrilių rentgeno spindulių difrakcijos tyrimai, atlikti Bonar et al., 1967 metais parodė paprastus modelius, kuriuose pastebėta, jog amiloidinių fibrilių struktūrą sudaro 4,7–4,8 Å skersmens ir 10 Å ilgio subvienetai. Jie būdingi kryžminei β -struktūrai, kurioje polipeptidinė grandinė yra suskirstyta į β -klostes, išdėstytas lygiagrečiai fibrilės ašiai, o juos sudarančios β -gijos yra statmenos fibrilės ašiai (8 pav). Dėl šio išskirtinio skaidulų difrakcijos modelio amiloidozės buvo vadinamos β -fibrilozėmis, o Alzheimerio ligos fibrilių baltymas buvo pavadintas β -baltymu, kol dar nebuvo žinoma jo antrinė struktūra. Būdingas kryžminės β -struktūros difrakcijos modelis kartu su fibrilių išvaizda ir tinklinėmis savybėmis dabar yra priimtini diagnostiniai amiloidozės požymiai ir jie parodo, kad fibrilės, nors ir suformuotos iš gana skirtingų baltymų pirmtakų, turi tam tikrą struktūrinį panašumą (Sunde et al., 1997).



8 pav. Bendrosios amiloidinės fibrilės struktūros modelis. Keletas β klosčių (skirtingomis spalvomis čia pažymėtos keturios) sudaro protofilamento struktūrą. Šios klostės yra lygiagrečios protofilamento ašiai, o jų komponentų β gijos yra statmenos fibrilės ašiai. Įprastai sukant β gijas, β klostės sukasi aplink bendrą spiralinę ašį, kuri sutampa su protofilamento ašimi ir pateikia 24 β gijų pasikartojimą (pagal Sunde et al., 1997)

Amiloiduose hidrofobinės liekanos daugiausia susikaupusios pluošto šerdyje, o hidrofilinės įkrautos liekanos nukreiptos į tirpiklį. Šis išdėstymas laikomas tarp visų subvienetų

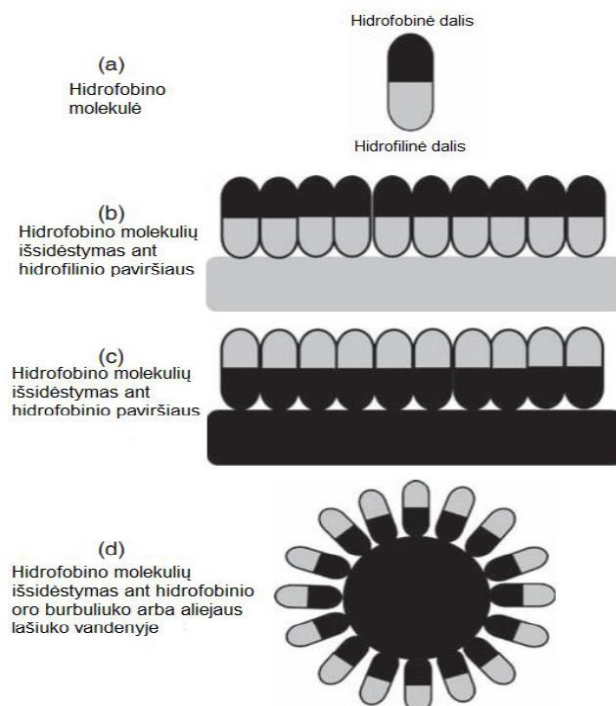
gijų, kad įkrovos balansas būtų pastovus ir stabilus. Didelis pagrindinių vandenilinių jungčių skaičius ir hidrofobinės sąveikos tarp papildomų šoninių grandinių yra didelio amiloidinių skaidulų stabilumo ir stiprumo priežastis. Įrodyta, kad didelis tarpmolekulinių vandenilinių jungčių tinklas gali suteikti amiloidams mechaninį stiprumą, prilygstantį plienui (de Francisco, 2021).

Anksčiau minėta hidrofobinių lazdelės formos struktūra savo antrinėje struktūroje turi β klostę ir β gijas, esančias stačiu kampu išilgai ilgosios ašies atžvilgiu. Dėl šios priežasties ir ši struktūra yra laikoma amiloidine (Ball, Kwan, & Sunde, 2019). Lazdelės formos struktūros, nudažytos Kongo raudonu dažu, suteikia spalvą, kuri būdinga nudažytoms amiloidinėms fibrilėms, o žiedinio dichroizmo duomenys rodo, kad lazdelėse yra didelis kiekis β klosčių – tai atskleidžia faktą, jog lazdelės formos struktūros ir amiloidinės fibrilės turi bendrų struktūrinių savybių. II klasės hidrofobinių formuojami sluoksniai yra ne tokie tvirti ir jiems trūksta I klasės hidrofobinių lazdelės formos struktūros morfologijos (Kwan et al., 2006).

Tyrėjai pateikė spektroskopinių įrodymų, kad baltymo SC3 lazdelės formos struktūrų agregacija sukūrė į amiloidą panašią struktūrą ir baltymo EAS struktūros forma yra funkcinis amiloidas. Rekombinantinių hidrofobinių, tokių kaip RodA, RodB ir RodC iš *A. fumigatus* ir MPG1, DewA ir EASD15 tyrimai atskleidė, kad visi šie hidrofobinai, išskyrus RodC, gali būti suaktyvinti *in vitro* į fibrilinę formą, kurioje yra daug β klosčių. Tačiau struktūros, gautos *in vitro* kai kuriomis dalimis gali skirtis, pavyzdžiui, šoniniu įpakavimu, nuo tų, kurios gaunamos *in situ* ant sporų, nes tiksliai sąveikaujančio paviršiaus pobūdis nėra atkartotas ir formavimosi kinetika gali būti pažeista. Nors pagrindinė struktūrinė šerdis yra ta pati, morfologiniai skirtumai dažniausiai pastebimi tarp amiloidinių fibrilių, gautų *in vitro* ir tų, kurios yra biologiniame kontekste (Ball et al., 2019).

1.3.8. Hidrofobinių biotechnologinio pritaikymo perspektyvos

Bene pagrindinė baltymų hidrofobinių savybė yra jų gebėjimas spontaniškai prikibti prie visų tipų paviršių, suformuojant amfifilinę membraną. Šį procesą nulemia ypatinga bifunkcinė molekulinė struktūra su hidrofiline ir hidrofobine pusėmis (9 pav.). Dėl šios priežasties hidrofobinai gali prikibti prie hidrofiliinių paviršių savo hidrofiline puse bei ant hidrofobinių paviršių savo hidrofobine puse – taip šie baltymai gali stipriai paveikti ir pakeisti substrato savybes. Be šios pagrindinės savybės hidrofobinai pasižymi netoksiškumu ir biologiniu suderinamumu (Opwis & Gutmann, 2011). Hidrofobinių sukibimas ir savarankiškas susirinkimas hidrofobinėse–hidrofilinėse sąsajose pavaizduotas 9 pav. b–d dalyse.



9 pav. Schematiškai pavaizduotas hidrofobinių molekulių išsidėstymas ant įvairių hidrofobinių ir hidrofilinių substratų (pagal Opwis & Gutmann, 2011)

Hidrofobinai tapo naudojami kosmetikos pramonėje. Dažna plaukams gydyti skirtų produktų problema yra ta, kad jie nepakankamai gerai prikimba ar susigeria į plauką bei yra lengvai pašalinami išplovus šampūną. Yra įrodymų, kad hidrofobinai gali pagerinti produkto savybes padedant geriau prikibti prie plauko molekulėms. Hidrofobinai taip pat gali būti naudojami kremų ir tepalų emulsijoms stabilizuoti. Yra žinoma, kad hidrofobinių agregacija hidrofobinių–hidrofilinių skysčių sąsajoje gali stabilizuoti emulsijas. Ši savybė gali būti naudinga ir farmaciniams tikslams bei maisto pramonei, kur tam tikroms formulėms ir sudedamosioms dalims reikia stabilų emulsijų (Hektor & Scholtmeijer, 2005).

Sparčiai augant biojutiklių naudojimui, atsirado būtinybė padidinti jų jautrumą. Bendra biojutiklių su imobilizuotais fermentais problema yra ant paviršių surišų baltymų denatūracija (Khalesi et al., 2012). Biomolekulės dažniausiai yra hidrofilinės ir norint jas imobilizuoti, reikia labai hidrofilinių paviršių. Amfifilinė struktūra padeda hidrofobinams lengvai savarankiškai agreguotis ant santykinai hidrofobinių paviršių ir pagerinti paviršiaus hidrofilumą – tai palengvina tolesnę biomolekulinę imobilizaciją. Be to, turėdama didelį biologinį suderinamumą, hidrofobinių matrica gali gerai išsaugoti imobilizuotų biomolekulių biologinį aktyvumą (Z. Zhao et al., 2009). Fermentai gali būti imobilizuojami kovalentiškai arba nekovaleentiškai ant hidrofobinių dangos kaip sulieti baltymai. Pavyzdžiui, neseniai buvo sukurtas naujas

nekovalentinis metodas kelių sienelių anglies nanovamzdelių (MWNT) funkcionalizavimui naudojant hidrofobiną HFBI. Dėl amfifilinės prigimties HFBI gali būti prijungtas prie MWNT paviršiaus, kad susidarytų HFBI-MWNT nanokompozitai, turintys tinkamą dispersiją vandenyje. Toks biojutiklis pasižymėjo dideliu jautrumu, turėjo platų linijinį diapazoną, žemą aptikimo ribą ir greitą gliukozės aptikimo reakciją, o tai reiškia, kad HFBI-MWNT nanokompozitinė plėvelė suteikia didelį pranašumą kuriant biojutiklius (Khalesi et al., 2012).

Gebėjimas imobilizuoti baltymus ant paviršių skatina medicininių implantų integraciją į audinius, o tai užtikrina geresnį stabilumą ir suderinamumą. Įrodyta, kad hidrofobinai, tokie kaip SC4 ir sukonstruota baltymų inžinerijos metodais baltymo TrSC3 forma, pagerina hidrofobinių paviršių, tokių kaip teflono, hidrofiliškumą. Šios dangos padidina pelių fibroblastų L292 ląstelių paviršiaus sukibimą, palyginus su nepadengtu teflonu. Kiti pavyzdžiai, apimantys ląsteles, yra funkcionalizuotos baltymo DewA dangos, buvo sukurtos suliejus sekų surišimo vietas iš fibronektino (DewA-RGD) ir laminino globulinio domeno (LG3). Jie buvo panaudoti titano paviršiams padengti, siekiant sustiprinti mezenchiminių kamieninių ląstelių, osteoblastų, fibroblastų ir chondrocitų sukibimą. Svarbu tai, kad hidrofobinų dangos nepadidino bakterijų *Staphylococcus aureus* sukibimo. Mezenchiminių kamieninių ląstelių sukibimas su titanu buvo sustiprintas nepadidinant bakterinės infekcijos rizikos (Boeuf et al., 2012; Lo, 2018).

Kalbant apie farmacinį šių baltymų panaudojimą, hidrofobinių vaistinių preparatų formulavimas yra įdomi alternatyva tradiciniams metodams, nes ši formulė yra generinė ir joje kaip pagalbinė medžiaga yra tik netoksiškas baltymas. Paprastas paruošimas kartu su galimybe atlikti nedidelio masto eksperimentus leidžia pritaikyti hidrofobinų kompozicijas potencialių vaistų kandidatų atrankai didelio našumo sąrankoje. Be to, hidrofobinų savarankiškos agregacijos savybės leidžia juos naudoti vandenyje netirpių vaistų, skirtų vartoti per burną, formulėse. Pridedant baltymo SC3 į vaisto suspensiją, hidrofobinių vaistų ciklosporino A ir nifedipino biologinis prieinamumas padidėjo atitinkamai du ir šešis kartus (Khalesi et al., 2012).

Hidrofobinai gali būti naudojami ir įvairiais kitais tikslais. Tai, kad hidrofobinai nėra toksiški (jų praryja žmonės valgydami grybus ir grybų fermentuotą maistą), nei citotoksiški ar imunogeniški, parodo, jog juos galima saugiai naudoti medicinos ir maisto reikmėms. Visi hidrofobinai, kaip jau buvo minėta anksčiau, savarankiškai agreguojasi hidrofilinėse–hidrofobinėse sąsajose, tačiau jų vandenyje tirpių formų ir rinkinių savybės skiriasi. Pavyzdžiui, skiriasi I ir II klasės hidrofobinų tirpumas ir stabilumas. Be to, skiriasi ir agregacijos kinetika bei hidrofiliškumo laipsnis abiejose hidrofilinės–hidrofobinės sąsajos pusėse. Taigi, atsižvelgiant į taikymo reikalavimus, galima pasirinkti tam tikrą I arba II klasės hidrofobiną. Biofizinės ir biocheminės hidrofobinų plėvelių savybės galima optimizuoti taikant genų inžineriją arba pridodant paviršinio aktyvumo medžiagų dengimo metu. Verta paminėti ir tai, kad daugumos

hidrofobinų sintezės išeiga nėra didelė, o tai iš esmės trukdo juos naudoti medicinoje ir techninėse srityse (Wösten & Scholtmeijer, 2015).

2. Medžiagos ir tyrimo metodai

2.1. Naudotos medžiagos ir prietaisai

2.1.1. Reagentai ir medžiagos

Tiriamąo darbo metu naudoti reagentai ir medžiagos pateiktos 2 lentelėje:

2 lentelė. Eksperimento metu naudoti reagentai ir medžiagos

Reagentai ir medžiagos	Tiekėjas
Bulvių dekstrozės agaras, peptonas, salyklo ekstraktas, etidžio bromidas, N-aminas, gliukozė, karbamidas, Triton X-100, redukuotas glutationas, oksiduotas glutationas, Tioflavinas T, Gliukozės oksidazė iš <i>Aspergillus niger</i>	Sigma Aldrich
Mielų ekstraktas	Oxoid
Agaras, kanamicinas	Formedium
Natrio chloridas, akrilamido-bisakrilamido 29:1 tirpalas, amonio persulfatas (APS), izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas (IPTG), CaCl ₂ , NiCl ₂ , TRIS-HCl, β-merkaptioetanolis, Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O, fosforo rūgštis	Carl Roth
Etanolis 96 %	Stumbras
10X DreamTaq Green Buffer, 25 mM dNTP Mix, DreamTaq™ polimerazė (5 U/μl), 50X TAE buferinis tirpalas, vanduo be nukleazių, TopVision agarozės tabletės, Gene Ruler DNA Ladder Mix molekulinis žymuo, 6X DNA Loading Dye dažas, 10X FastDigest Green Buffer, SuperScript IV RT Mix, 2X Platinum SuperFi RT-PCR Master Mix, Unstained Protein Molecular Weight Marker molekulinis žymuo	Thermo Fisher Scientific
Ampicilinas	Balkanpharma
Imidazolas	Alfa Aesar
CBB R-250, CBB G-250, tetrametiletilendiaminas (TEMED)	AppliChem
Glicerolis, CuSO ₄ ·5H ₂ O, ZnSO ₄ ·7H ₂ O, CH ₃ COONa, acto rūgštis	Reachim
Natrio laurilsulfatas (SDS)	Bio-Rad
Bromfenolio mėlis	Fluka
D(+)-gliukozės monohidratas	VWR Chemicals

2.1.2. Naudoti rinkiniai

Tiriamąo darbo metu naudoti rinkiniai ir jų gamintojai pateikti 3 lentelėje:

3 lentelė. Eksperimento metu naudoti rinkiniai

Rinkinio pavadinimas	Gamintojas
„PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit“, „SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System“	Invitrogen
„DreamTaq Green DNA Polymerase“, „GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit“, „CloneJET PCR Cloning Kit“, „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“, „FastDigest XbaI, „FastDigest BglI“	Thermo Fisher Scientific
„Quick-RNA™ MiniPrep“	Zymo Research

2.1.3. Mitybinės terpės ir tirpalai

Tiriamąo darbo metu naudoti tirpalai ir jų sudėtis pateikti 4 lentelėje:

4 lentelė. Eksperimento metu naudoti tirpalai bei jų sudėtys

Tirpalo pavadinimas	Sudėtis
Agarozės gelis	1 % arba 3% agarozė, 1X TAE buferinis tirpalas
Amonio persulfato tirpalas	10 % amonio persulfatas, dejonizuotas vanduo
Ampicilino tirpalas	100 mg/ml ampicilinas, dejonizuotas vanduo
Baltymų elektroforezės gelio dažas	1 g/l CBB R-250, 400 ml etanolio, 100 ml ledinės acto rūgšties, galutinis tūris – 1 litras, pridedama dejonizuotu vandeniu
Blukalas	100 ml ledinės acto rūgšties, 300 ml etanolio, galutinis tūris – 1 litras, pridedama dejonizuotu vandeniu
Bradfordo reagentas	100 mg/l CBB G-250, 50 ml etanolis, 93.43 ml 85 % H ₃ PO ₄ , galutinis tūris – 1 litras, pridedama dejonizuotu vandeniu
CaCl ₂ tirpalas	0,1 M CaCl ₂ , dejonizuotas vanduo
Chromatografinės kolonėlės	20 mM TRIS-HCl, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, „nuregimo“ buferinis tirpalas, pH 7,4
	dejonizuotas vanduo

Dializės buferinis tirpalas, pH 5	100 mM NaCl, 50 mM CH ₃ COONa, 10 mM redukuotas glutationas, 1 mM oksiduotas glutationas, dejonizuotas vanduo
Eliucijos buferinis tirpalas, pH 7,4	20 mM Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O, 500 mM NaCl, 500 mM imidazolas, 8M karbamidas, 5 mM β-merkaptetoetanolis, dejonizuotas vanduo
Etanolio tirpalas (20 %)	96 % etanolio skiedžiama dejonizuotu vandeniu
Etidžio bromido tirpalas	0,5 mg/l etidžio bromido, dejonizuotas vanduo
IPTG tirpalas	500 mM IPTG, dejonizuotas vanduo
Kanamicino tirpalas	50 mg/ml kanamicinas, dejonizuotas vanduo
Lizės buferinis tirpalas I, pH 8	50 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, dejonizuotas vanduo
Lizės buferinis tirpalas II, pH 8	20 mM TRIS-HCl, 10 mM imidazolas, 300 mM NaCl, dejonizuotas vanduo
Lizės buferinis tirpalas III, pH 8	20 mM TRIS-HCl, 10 mM imidazolas, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, dejonizuotas vanduo
Lizės buferinis tirpalas IV, pH 8	20 mM TRIS-HCl, 10 mM imidazolas, 300 mM NaCl, 8M karbamidas dejonizuotas vanduo
Mikroelementų pradinis tirpalas	5 g/l CuSO ₄ ·5H ₂ O, 1 g/l ZnSO ₄ ·7H ₂ O, dejonizuotas vanduo
Natrio dodecilsulfato tirpalas	10 % natrio dodecilsulfatas, dejonizuotas vanduo
NiCl ₂ tirpalas	0,1 M NiCl ₂ , dejonizuotas vanduo
Prisijungimo buferinis tirpalas, pH 7,4	20 mM Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O, 0,5 M NaCl, 30 mM imidazolas, 8 M karbamidas, 5 mM β-merkaptetoetanolis, dejonizuotas vanduo
TRIS buferinis tirpalas, pH 6,8 arba pH 8,8	0,5 M (pH 6,8) arba 1,5 M (pH 8,8) TRIS, pH privedamas HCl, galutinis tūris privedamas dejonizuotu vandeniu
5X pavyzdžio buferis	800 mg SDS, 2,5 ml 1,0 M TRIS-HCl, pH 6,8, 4 ml glicerolio, 0,1 ml 1 % bromfenolio mėlio, 2 ml β-merkaptetoetanolio
1X TAE buferinis tirpalas	50 X TAE buferinis tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu

Eksperimento metu naudotos mitybinės terpės ir jų sudėtys pateiktos 5 lentelėje:

5 lentelė. Eksperimento metu naudotos terpės bei jų sudėtys

Mitybinės terpės pavadinimas	Sudėtis
<i>Blakeslee's</i> salyklo ekstrakto agaras (MEAbl)	1 ml/l mikroelementų pradinis tirpalas, 50 g/l salyklo ekstraktas, 1 g/l N-aminas, 20 g/l gliukozė, 20 g/l agaras, distiliuotas vanduo.
Bulvių dekstrozės agaras (PDA)	39 g/l bulvių dekstrozės agaro, dejonizuotas vanduo
Luria-Bertani terpė (LB)	10 g/l peptonas, 5 g/l mielių ekstraktas, 10 g/l natrio chloridas, distiliuotas vanduo. Jei reikia pridedama ampicilino arba kanamicino

2.1.4. Kamienai ir plazmidės

Tiriamąjo darbo metu naudoti kamienai ir jų šaltinis pateikti 6 lentelėje:

6 lentelė. Eksperimento metu naudoti kamienai

Kamienas	Šaltinis
<i>E. coli</i> DH10β	VG TU, Chemijos ir bioinžinerijos katedra
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	VG TU, Chemijos ir bioinžinerijos katedra
Nežinomų rūšių pelėsiniai grybai	VG TU, Chemijos ir bioinžinerijos katedra

Tiriamąjo darbo metu naudota ENA-pSUMO plazmidė, gauta iš NovoGen. Plazmidė susideda iš bakterinio indukuojamo ekspresijos vektoriaus „*Champion™ pET SUMO*“, kuris turi histidino ir SUMO (mažo, į ubikvitiną panašaus baltymo) žymes. SUMO žymė yra ypatinga tuom, jog gali padidinti tikslinio baltymo tirpumą. Vektoriuje įklonuotas RodA baltymą koduojantis genas.

2.1.5. Pradmenys

Tiriamąjo darbo metu naudoti pradmenys pateikti 7 lentelėje:

7 lentelė. Eksperimento metu naudoti pradmenys ir jų sekos

Pradmuo	5'→3' seka
ITS1_FW	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4_RV	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
RodA1_FW	GCT GGC AAT GGT GGC AA
RodA2_RV	AGG GCA ATG CAA GGA AGA CC
<i>rodA</i> _FW	ATGAAGTTCTCTTTGAGCGCTG
<i>rodA</i> _RV	TTACAGGATAGAACCAAGGGCAATG

2.1.6. Naudoti prietaisai

Tiriamajame darbe naudoti prietaisai ir jų gamintojai pateikti 8 lentelėje:

8 lentelė. Eksperimento metu naudoti prietaisai

Prietaisas	Gamintojas
Afininės chromatografijos kolonėlės HisTrap™ High Performance	GE Healthcare
Analitinės svarstyklės ME204	Mettler Toledo
Analitinė potencio stato sistema	Bioanalizės sistemos
Autoklavas Steriltechnik ECO 135	Laboklav
Automatinės pipetės 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Orange Scientific
Aukso elektrodas	BASi®
Centrifuga 5418 R	Eppendorf
Centrifuga FastGene NG002B	NIPPON GENETICS EUROPE
Centrifuga 2-16P ir 2-16KL	Sigma
Fluorimetras AMINCO-Bowman® Series 2	Thermo Spectronic
Gelių dokumentavimo sistema MiniBIS 16 mm	DNR Bio-imaging Systems
Horizontalios elektroforezės aparatas MultiSUB MIDI	Cleaver
Inkubatorius su purtykle Innova 44	New Brunswick
Laminaras Mars Safety Classe 2	Scanlaf

Ledo gaminimo mašina	Scotsman
Magnetinė maišyklė C-MAG HS 7	IKA
Magnetinė maišyklė ARE	VELP Scientifica
Mikrobangų krosnelė	Sharp
Orinis termostatas MKR13	DITABIS
Peristaltinė pompa Pump P-1	Pharmacia Biotech
Spektrofotometras Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific
Spektrofotometras Spectroquant Pharo 100	Merck
Svarstyklės EG 2200-2NM	KERN
Sūkurinis maišytuvas Multi-Vortex V-32	Biosan
Šaldytuvas su šaldymo kamera	Snaigė, Whirpool
Termomikseris Thermomixer Compact	Eppendorf
Termocikleris T-personal	Biometra
Termocikleris G-Storm GS1	Agilegene Technologies
Termostatas Microprocessor Control MPC	Huber
Vertikalios elektroforezės aparatas	Cleaver Scientific Ltd
Termostatas Unimax 1010	Heidolph
Termostatas FC-B2V-M/FC 111	Friocell
Transiliuminatorius 2011 MACROVUE	LKB
Ultragarso homogenizatorius	Cole Parmer
Vandens vonia 1083	GFL

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Nežinomos rūšies pelėsinio grybo išskyrimas iki pavienės kultūros

Iš VGTU Chemijos ir bioinžinerijos katedros gauta lėkštelė su nežinomų rūšių pelėsiniais grybais, augusiais ant biokompozitinių plokščių su pluoštinių kanapių spalų užpildu, panaudota

pavienės kultūros atskyrimui. Atsitiktinai pasirinkta pelėsinio grybo kultūra iš gautos lėkštelės persėjama keletą kartų ant PDA ir MEAbl terpių tol, kol buvo matoma pavienė nežinomo pelėsinio grybo kultūra pagal morfologinius požymius. Tarp persėjimų buvo 5–7 dienų skirtumas, kultūros augintos 25 °C temperatūroje.

2.2.2. Genominės DNR išskyrimas

Nežinomos rūšies pelėsinio grybo genominė DNR buvo išskiriama naudojant „PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit“ rinkinį iš Invitrogen pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išskyrimui buvo naudotos dvi pelėsinių grybų kultūros, tarp kurių auginimo buvo 7 dienų skirtumas, siekiant patikrinti, ar augimo trukmė turi įtakos genominei DNR išskyrimui. Dalis ant agarizuotos terpės išaugusių kultūrų buvo nuimamos steriliu skalpeliu bei atsveriamos po 0,2 gramo. Vėliau atsvertos kultūros buvo perkeltos į genominės DNR išskyrimo rinkiniui priklausančius „BeadTube“ tipo mėgintuvėlius, kurių pagalba jos suardomos. Suardytos kultūros toliau naudojamos genominei DNR išskyrimui.

2.2.3. Genominės DNR padauginimas PGR metodu

PGR reakcija yra skirta DNR fragmentų padauginimui *in vitro*. Norint padauginti konkrečią DNR dalį, reikia naudoti specifinius pradmenis. Po PGR reakcijos gaunama susintetinta komplementari DNR seka. Baigiamajame magistro darbe buvo naudoti universalūs ITS1 ir ITS4 pradmenys, siekiant padauginti ITS regioną, bei baltymą RodA koduojančio geno padauginimui skirti pradmenys RodA1 ir RodA2.

Pirmiausia iš standartinio pradmenų tirpalo, kurio koncentracija yra 100 μM, pagaminamas darbinis tirpalas. Darbinio tirpalo koncentracija yra 10 μM. Skiedimui naudotas vanduo be nukleazių. PGR reakcijai naudojama genominė DNR, išskirta iš nežinomos rūšies pelėsinio grybo. Paruošiamas 50 μl reakcijos mišinys, kurį sudaro 5 μl 10X *DreamTaq Green* buferinis tirpalas, 5 μl 2 mM dNTP mišinys, po 1 μl tiesioginio ir grįžtamojo pradmenų, 5 μl išskirta genominė DNR, 1 μl *DreamTaq* polimerazės ir 32 μl vandens be nukleazių. Paruoštas reakcijos mišinys vorteksuojamas, perkeliamas į termociklerį ir reakcija paleidžiama. Optimizuoti termociklerio parametrai skyrėsi siekiant padauginti konkretų DNR regioną. PGR sąlygos pagal naudotus pradmenis pateiktos 9 lentelėje. Gauti PGR produktai tikrinti agaroziniame gelyje atliekant elektroforezę.

9 lentelė. PGR sąlygos pagal naudotus pradmenis

	ITS1 ir ITS4 pradmenys	RodA1 ir RodA2 pradmenys
Pradinė denatūracija	94 °C, 1 minutė	95 °C, 5 minutės
Denatūracija	94 °C, 1 minutė	95 °C, 30 sekundžių
Specifinis pradmenų prilydimas	51 °C, 1 minutė	53 °C, 30 sekundžių
DNR sintezė	72 °C, 1 minutė	72 °C, 1 minutė
Paskutinio ciklo DNR sintezė	72 °C, 8 minutės	72 °C, 5 minutės
Ciklų skaičius	35	35

2.2.4. Horizontali elektroforezė

Paruošiamas 1 arba 3 % agarozės gelis, ištirpinant vieną „TopVision“ agarozės tabletę 50 ml 1X TAE buferiniame tirpale. Gautas tirpalas šildomas mikrobangų krosnelėje tol, kol pasidaro skaidrus. Paruoštas gelis supilamas į formelę, įstatomos šukutės šulinėliams. Sustingus geliui šukutės palengva išimamos ir visa formelė kartu su geliu perkeliama į horizontalios elektroforezės aparatą, užpildytą 1X TAE buferiniu tirpalu. Į gelyje esančius šulinėlius suleidžiami mėginiai po 5 µl, jei reikia, jie yra nudažomi 5:1 santykiu (5µl mėginio ir 1 µl 6X DNA Loading Dye dažo). Greta mėginių į vieną šulinėlį suleidžiamas molekulinis žymuo GeneRuler Ladder Mix, jog būtų galima nustatyti suleistų mėginių dydžius. Elektroforezė vykdoma 45 minutes, esant 120 V įtampai. Po elektroforezės gelis išimamas ir perkeliamas į vonelę su etidžio bromido tirpalu kelioms minutėms. Gelis tikrinamas ultravioletinėje (UV) šviesoje naudojant gelių dokumentavimo sistemą ir GelCapture programinę įrangą.

2.2.5. PGR produkto gryninimas, ligavimas į pJET1.2 vektorių ir klonavimas

Gauti PGR produktai valomi naudojant „GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit“ iš Thermo Fisher Scientific pagal gamintojo pateiktą protokolą. Vėliau išgryninti PGR produktai dar kartą patikrinami agaroziniame gelyje vykdant elektroforezę, siekiant įsitikinti, kad PGR produktas liko mėginyje. Išgryninus PGR produktus atliekamas ligavimas ir klonavimas naudojant „CloneJET PCR Cloning Kit“ rinkinį iš Thermo Fisher Scientific pagal gamintojo pateiktą protokolą. Pirmiausia atliekama galų bukinimo reakcija, kurios metu gaunami fragmentai, savo galuose neturintys nesuporuotų bazių porų arba išsikišimų. Galų bukinimo reakcija atlikta todėl, nes PGR reakcijoje naudota DreamTaq polimerazė. Galiausiai paruošti fragmentai liguojami į pJET1.2 klonavimo vektorių ir padauginami.

2.2.6. Kompetentinių *Escherichia coli* ląstelių paruošimas

Pirmiausia užsėjama naktinė kultūra į 100 ml skystos LB terpės, kuri auginama per naktį 37 °C temperatūroje, purtant 160 aps./min. Sekančią dieną iš naktinės kultūros ląstelės persėjamos į šviežią LB terpę taip, jog pradinis optinis tankis būtų $OD_{600} \approx 0,05$ O.V. Persėta kultūra auginama keletą valandų, kol pasiekiamas optinis tankis $OD_{600} \approx 0,4$ O.V. Tuomet ląstelės perkeliama į 50 ml mėgintuvėlius ir šaldomos ant ledo 10 minučių. Nuo šio etapo ląstelės visuomet laikomos lede. Po inkubacijos ląstelės surenkamos centrifuguojant 3 minutes, esant 6000 aps./min. Supernatantas nupilamas ir ant likusių ląstelių užpilama 10 ml šalto 0,1 M $CaCl_2$ tirpalo, švelniai suspenduojama. Toliau mėginys inkubuojamas lede 20 minučių ir ląstelės vėl nucentrifuguojamos, surenkama biomasė. Galiausiai ląstelės suspenduojamos 5 ml šalto 0,1 M $CaCl_2$ /15 % glicerolio tirpale ir išpilstomos į 1,5 ml Eppendorf tipo mėgintuvėlius po 300 µl. Taip paruoštos kompetentinės *E. coli* ląstelės saugomos -80 °C temperatūroje.

2.2.7. Cheminė *E. coli* transformacija

Tiriamąjį darbo metu buvo atlikta keletas skirtingų cheminių transformacijų pagal tą patį protokolą. 10 lentelėje pateikta glausta informacija apie transformacijų metu naudotus bakterinius kamienus, transformantų atrankos žymenis bei plazmidės.

10 lentelė. Baigiamojo darbo metu atliktos transformacijos

Bakterinis kamienas	Plazmidė/genas	Atrankos žymuo
<i>E. coli</i> DH10β	pJET1.2 vektorius su <i>rodA</i> genu	Ampicilinas
<i>E. coli</i> DH10β	pJET1.2 vektorius su kopijine DNR	Ampicilinas
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Champion™ pET SUMO vektorius su RodA baltymą koduojančio geno seka	Kanamycin

Atliekant transformaciją į 50 µl kompetentinių *E. coli* ląstelių buvo įnešta 5 µl klonavimo mišinio ir inkubuojama lede 30 minučių. Praėjus inkubacijos laikui, atliktas karščio šokas 42 °C temperatūroje 2 minutes, po kurio mėginiai vėl grąžinami ant ledo. Į mėginius tuomet pridedama po 945 µl skystos LB terpės ir jie inkubuojami 60 minučių, 37 °C temperatūroje. Kol vyko inkubacija, buvo paruoštos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe. Kadangi kiekviena plazmidė turi skirtingus atsparumo antibiotikui genus, į terpę pridedama tokio antibiotiko, kokio reikia. Praėjus inkubacijos laikotarpiui, 100 µl transformantų kultūros išsėjama ant agarizuotos terpės su atitinkamu antibiotiku naudojant glaistykklę. Siekiant padidinti transformacijos efektyvumą, likę

mėginiai nucentrifuguojami 6000 aps./min greičiu, 3 minutes. 800 µl supernatanto nupilama, ląstelės suspenduojamos likusiame terpės tūryje ir išsėjamos ant agarizuotos terpės. Paruoštos lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje parą.

2.2.8. Plazmidinės DNR išskyrimas

Tiriamąjį darbą metu plazmidinė DNR buvo išskiriama keletą kartų iš skirtingų mėginių laikantis to paties gamintojo pateikto protokolo. Plazmidinės DNR išskyrimas buvo atliktas naudojant „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį iš Thermo Fisher Scientific. Prieš atliekant išskyrimą, pirmiausiai iš ant agarizuotos terpės su ampicilinu užaugusių transformantų paruošiama naktinė kultūra. Į 15 ml mėgintuvėlius įpilama 3 ml skystos LB terpės ir 3 µl ampicilino tirpalo. Nuo lėkštelės paimama viena kolonija su vienkartinė inokuliavimo kilpele ir persėjama į paruoštą terpę. Naktinė kultūra auginama 37 °C temperatūroje 18 valandų, esant 200 aps./min. Sekančią dieną išskiriama plazmidinė DNR ir gauti mėginiai tikrinami agaroziniame gelyje vykdant elektroforezę.

2.2.9. Plazmidinės DNR karpymas restrikcijos endonukleazėmis

Visais atvejais buvo atliekamas plazmidinės DNR karpymas restrikcijos endonukleazėmis, siekiant įsitikinti, jog tikslinis genas sėkmingai įsiterpė į bakterinį genomą. Karpymui buvo naudotos dvi restrikcijos endonukleazės – XbaI ir BglII, kurių kirpimo vietos atitinkamai yra 877 bp ir 2615 bp. Visais atvejais karpymas atliktas pagal gamintojo pateiktą protokolą. Reakcijos mišinys susidarė iš 8 µl vandens be nukleazų, 2 µl 10X *FastDigest Green* buferinio tirpalo, 5 µl plazmidinės DNR ir po 1 µl restrikcijos endonukleazų XbaI ir BglII. Mišiniai trumpai vorteksuojami ir galiausiai inkubuojami 37 °C temperatūroje 40 minučių. Gauti fragmentai tikrinami agaroziniame gelyje elektroforezės būdu.

2.2.10. Sekoskaitos analizė

Išgryninto PGR produkto ir išskirtų plazmidinių DNR mėginiai siunčiami 5.8S ribosominės RNR sekoskaitai. Gauti rezultatai buvo analizuojami naudojant ApE programinę įrangą, kurios pagalba apdorojamos sekos, pašalinant „triukšmą“. Galiausiai sutvarkytos sekos įkeliamos į NCBI duomenų bazę, kurioje buvo surasti sekų atitikmenys. Plazmidinė DNR su kopijinės DNR seka siunčiama sekoskaitai siekiant palyginti sekų skirtumus.

2.2.11. Suminės RNR išskyrimas

Suminė RNR buvo išskiriama naudojant „Quick-RNA™ MiniPrep“ rinkinį iš Zymo Research pagal gamintojo pateiktą protokolą. Pirmiausiai pelėsinis grybas buvo persėjamas iš senos kultūros ir auginamas mėnesį. Prieš išskiriant RNR pelėsinį grybą reikėjo suardyti, šiam tikslui buvo naudoti mėgintuvėliai, užpildyti inertiškais burbuliukais ir lizės buferis. Po išskyrimo gauti RNR mėginiai buvo vizualizuojami ant 3 % agarozės gelio.

2.2.12. Kopijinės DNR sintezė

Kopijinės DNR sintezė atliekama vykdant atvirkštinės transkripcijos reakciją su išskirta sumine RNR. Atvirkštinės transkripcijos reakcijai atlikti naudotas „SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System“ rinkinys iš Thermo Fisher Scientific. Rinkinyje esanti SuperScript® IV atvirkštinė transkriptazė kol kas laikoma geriausiu pasirinkimu kopijinės DNR sintezei, nes pasižymi didesniu reakcijos greičiu, atsparumu inhibitoriams, termostabilumu ir labai efektyvia kopijinės DNR sinteze. Kopijinės DNR sintezei ir padauginimui naudoti pradmenys *rodA_FW* ir *rodA_RV*. Reakcijos mišinio tūris buvo 50 µl ir susidėjo iš 25 µl 2X RT Master Mix, 2,5 µl *rodA_FW* pradmens, 2,5 µl *rodA_RV* pradmens, 0,5 µl Superscript IV RT Mix, 2,5 µl suminės RNR ir 17 µl benukleazio vandens. PGR reakcijos sąlygos pateiktos 11 lentelėje:

11 lentelė. Kopijinės DNR sintezės PGR metodu sąlygos

Etapas	Temperatūra	Trukmė
Kopijinės DNR sintezė (1 ciklas)		
Atvirkštinė transkripcija	55 °C	10 minučių
Inaktyvacija	98 °C	2 minutės
Kopijinės DNR amplifikacija (40 ciklų)		
Pradinė denatūracija	98 °C	10 sekundžių
Specifinis pradmenų prilydimas	66 °C	10 sekundžių
DNR sintezė	72 °C	15 sekundžių
Galutinė DNR sintezė	72 °C	5 minutės

Gauti PGR mėginiai vizualizuojami ant 1 % agarozės gelio vykdant elektroforezę. Patikrinti mėginiai siunčiami sekoskaitai, siekiant patikrinti sekų suderinamumą.

Baigiamojo darbo metu buvo įsigytas genas, turintis RodA baltymą koduojantį geną *rodA* su pašalintais intronais. Genas įsigytas dėl to, jog tai pigesnė ir paprastesnė alternatyva. Geno seka buvo adaptuota iš literatūros šaltinių, todėl kopijinės DNR sekoskaitos rezultatai naudoti palyginimui su literatūroje pateikta seka.

2.2.13. Rekombinantinių baltymų ekspresija naudojant IPTG

Pirmiausia su įsigyta plazmide, turinčia *rodA* geno seką be intronų, buvo atliekama transformacija į *E. coli* BL21 (DE3) kamieną. Iš užaugusių transformantų vėliau užsėjama naktinė kultūra. Indukcijos dieną ląstelės iš naktinės kultūros persėjamos į naują LB terpę su kanamicinu, kurio galutinė koncentracija terpėje yra 50 µg/ml. Ląstelės į naują terpę persėjamos tokiu tūriu, jog OD₆₀₀ būtų apie 0,05 O.V. Ląstelių optiniam tankiui pasiekus 0,6 O.V. į terpę pridedama IPTG, kurio galutinė koncentracija siekia 0,5 mM. Pridėjus IPTG ląstelės paauginamos dar 2–3 valandas, jog užaugtų didesnis biomasės kiekis. Užauginus biomasę ji surenkama centrifuguojant 12000 aps./min 15 minučių esant 4 °C temperatūrai. Nucentrifugavus ląsteles supernatantas nupilamas ir surinkta biomasė saugoma -20 °C temperatūroje.

2.2.14. Rekombinantinių baltymų ekspresijos vertinimas SDS-PAGE metodu

Atlikus indukciją surinktos biomasės dalis panaudojama ekspresijos įvertinimui SDS-PAGE būdu. Prieš atliekant elektroforezę, biomasė suspenduojama prijungimo buferiniame tirpale ir įstatoma į ledo vonelę. Ląstelės vėliau ardamos ultragarsu 10 minučių (30 sekundžių ardymas, 30 sekundžių pauzė). Ardymui naudojamas 3 mm skersmens antgalis ir 40 % amplitudė.

Po ardymo ultragarsu lizatas nucentrifuguojamas 8000 aps./min greičiu, 3 minutes ir supernatantas nupilamas. Nuosėdos suspenduojamos lizės buferiniame tirpale I (50 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, pH 8). Mėginys inkubuojamas kambario temperatūroje 5 minutes ir vėl nucentrifuguojamas, supernatantas pašalinamas. Likusios nuosėdos suspenduojamos distiliuotame vandenyje. Galiausiai vykdoma vertikali elektroforezė.

Elektroforezės gelio paruošimas: gelis ruošiamas iš dviejų skirtingų koncentracijų gelių – 12 % skiriamąjo (apatinio) ir 4 % koncentruojamojo (viršutinio). Gelių sudėtys pateikiamos 12 lentelėje. Pirmiausiai iš dviejų stiklų surenkama elektroforezės aparato gardelė, skirta pripildyti skiriamąjo ir koncentruojamojo poliakrilamidinių gelių. Stiklai suspaudžiami aparate, kuris įstatomas į pildymui skirtą stovėlį. Šalia tarpinės, esančios tarp stiklų pirmiausiai supilamas

skiriamasis gelis, po to, kai jis sustingsta, užsluoksniuojamas koncentruojamasis gelis ir įstatomos šukutės šulinėliams suformuoti.

12 lentelė. SDS-PAGE naudojamų gelių sudėtys

Komponentai	Gelio tipas	
	Skiriamasis (12 %)	Koncentruojamasis (4 %)
Akrilamidas/bisakrilamidas 29:1	3 ml	0,625 ml
1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8	-	1,25 ml
Distiliuotas vanduo	4,3 ml	3,05 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
10 % APS	75 µl	37,5 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl

Mėginių paruošimas: 20 µl baltymų mėginio sumaišoma su 7 µl 5X pavyzdžio buferiniu tirpalu. Mėginiai kaitinami 95 °C temperatūroje 5 minutes.

Elektroforezė: kuomet gelis sustingsta, šukutės palengva išimamos, susiformavę šulinėliai praplaunami elektroforezės buferiniu tirpalu. Gardelė su geliu perkeliama į elektroforezės vonelę. Elektroforezės aparato talpykla užpildoma 1X elektroforezės buferiu. Į šulinėlius įleidžiami paruošti baltymų mėginiai po 15 µl, o į kontrolinį šulinėlį įpilama 8 µl etaloninių baltymų mišinio. Tušti šulinėliai užpildomi 1X pavyzdžio buferiniu tirpalu. Vykdytą elektroforezę koncentruojamam geliui iš pradžių naudojama 15 mA srovė iki tol, kol mėginiai pasiekia skiriamąjį gelį – tuomet srovė didinama iki 20 mA. Pasibaigus elektroforezei, gelis perkeltas į vonelę su pašildytu dažu. Nudažytas gelis blukinamas ir vėliau vizualizuojamas naudojant GelCapture programinę įrangą.

2.2.15. Intarpinių kūnelių tirpinimas

Surinkta biomasė pirmiausia suspenduojama su lizės buferiniu tirpalu II (20 mM TRIS, 10 mM imidazolas, 300 mM NaCl, pH 8) – 1 gramui biomasės tenka 30 ml tirpalo. Suspenduotos ląstelės toliau ardamos ultragarsu 5 minutes (10 sekundžių pulsas, 10 sekundžių pauzė). Naudojamas 3 mm storio antgalis ir maksimali 40 % amplitudė. Suardytos ląstelės vėliau centrifuguojamos 30 minučių, esant 10000 aps./min, 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo

supernatantas pašalinamas ir likusios nuosėdos suspenduojamos su lizės buferiniu tirpalu III (20 mM TRIS, 10 mM imidazolas, 300 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH 8). Tuomet mėginys vorteksuojamas maksimaliu greičiu 5 minutes ir vėl nucentrifuguojamas. Pašalinus supernatantą nuosėdos suspenduojamos su lizės buferiniu tirpalu IV (20 mM TRIS, 10 mM imidazolas, 300 mM NaCl, 8 M karbamidas, pH 8) ir vėl vorteksuojamos 5 minutes. Po to ląstelės vėl ardomos ultragarsu ir nucentrifuguojamas. Supernatantas išsaugomas ir naudojamas baltymų gryninimui. Intarpinių kūnelių tirpinimo eigoje surinkti supernatantai panaudojami SDS-PAGE elektroforezei siekiant įvertinti intarpinių kūnelių tirpinimo rezultatus.

2.2.16. Rekombinantinio baltymo RodA gryninimas

Ištirpintų intarpinių kūnelių tirpalas prieš gryninimą perfiltruojamas pro 0,22 µm filtrą, siekiant pašalinti likusias ląstelių nuolaužas. Baltymų gryninimui naudojama 1 ml tūrio „HisTrap™ High Performance“ chromatografinė kolonėlė. Iš pradžių kolonėlė prijungiama prie peristaltinės pompos ir tuomet įvertinamas tūrinis greitis. Baltymas RodA buvo gryninamas dviem būdais: gradientine laipsniška ir smūgine eliucijomis. Pradedant gryninimą abiem būdais, kolonėlė praplaunama dejonizuotu vandeniu 5 kolonėlės tūriais bei pakraunama 100 mM NiCl₂ tirpalu 2 kolonėlės tūriais. Tuomet kolonėlė praplaunama 10 kolonėlės tūrių prisijungimo buferiniu tirpalu, turinčiu 30 mM imidazolo. Šis žingsnis svarbus, siekiant pašalinti nuo ankstesnių gryninimų kolonėlėje likusius baltymus. Į taip paruoštą kolonėlę užnešami 3 kolonėlės tūriais perfiltruoto baltymų mėginio. Maždaug 1,5 ml baltymo mėginio suleidžiama į šiukšles, o likęs tūris surenkamas palyginimui SDS-PAGE elektroforezės metu. Po to kolonėlė dar sykį praplaunama 10 kolonėlės tūrių prisijungimo buferiniu tirpalu, turinčiu 30 mM imidazolo, siekiant išplauti prie sorbento neprisijungusius baltymus. Atlikus praplovimą vykdoma tikslinio baltymo eliucija. Gradientinė laipsniška eliucija atliekama eliuuojant baltymą praplovimo buferiniais tirpalais, kuriuose imidazolo koncentracijos yra 25, 50, 100, 150, 200, 250 ir 500 mM. Gradientinės eliucijos metu leidžiama po 2 kolonėlės tūrius prisijungimo buferinių tirpalų, turinčių skirtingas imidazolo koncentracijas. Gradientinė eliucija atliekama dėl to, jog būtų galima pamatyti, ties kuria imidazolo koncentracija prasideda baltymo eliucija. Vykiant smūginę eliuciją kolonėlė praplaunama 10 kolonėlės tūrių prisijungimo buferiniu tirpalu, turinčiu 75 mM imidazolo. Baltymo eliucija vykdoma leidžiant 7 kolonėlės tūrius eliucijos buferinio tirpalo, turinčio 500 mM imidazolo. Atlikus gryninimą, kolonėlė praplaunama nurengimo buferiniu tirpalu, kad būtų išplauti likę baltymai – plaunama 5 kolonėlės tūriais. Tuomet kolonėlė dar sykį praplaunama 10 kolonėlės tūrių distiliuoto vandens ir galiausiai konservuojama 5 kolonėlės tūriais 20 % etanolio.

2.2.17. Rekombinantinio baltymo RodA koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Pirmiausia sudaroma kalibracinė kreivė, kuri reikalinga tikslinio baltymo koncentracijos nustatymui. Paruošiamas standartinis jaučio serumo albumino (JSA) tirpalas, kurio koncentracija 1 mg/ml. Iš pradinės koncentracijos daromi 7 skirtingi skiedimai, kur JSA koncentracijos varijuoja nuo 0,02 iki 0,9 mg/ml. Paruošti skirtingų koncentracijų tirpalai maišomi su Bradfordo reagentu – į 1,25 ml Bradfordo tirpalo pridedama po 100 µl baltymo. Atitinkamai paruošiamas ir rekombinantinio baltymo RodA mėginys. Paruošti mėginiai inkubuojami 20 minučių. Vėliau mėginiai išpilstomi į 96 šulinėlių plokšteles po 300 µl ir spektrofotometriškai matuojama sugertis 595 nm bangos ilgyje. Iš gautų JSA sugerties duomenų brėžiamas grafikas, panaudojama kalibracinės kreivės funkcija ir gaunama tiesės lygtis iš kurios apskaičiuojama baltymo RodA koncentracija.

2.2.18. Natyvos rekombinantinio baltymo RodA struktūros atstatymas

Natyvi rekombinantinio baltymo RodA struktūra buvo atstatyta taikant dializės metodą. Dializės metu naudotas dializės buferinis tirpalas savo sudėtyje turėjo redukuoto ir oksiduoto glutationų porą. Glutationų pora skatina disulfidų mainus. Manoma, kad tai veiksmingiausia, kai baltymas formuoja savo antrinę ir tretinę struktūras, jog cisteino liekanos būtų arti viena kitos (Thomson, Olson, Jackson, & Schrader, 2012). Oksiduotas glutationas veikia kaip oksidatorius formuojant disulfidines jungtis baltymuose, o redukuotas glutationas veikia kaip reduktorius, kuris skaido netinkamai sujungtas disulfidines jungtis baltymuose, todėl susidaro termodinamiškai stabili baltymų konformacija (Okumura, Saiki, Yamaguchi, & Hidaka, 2011).

Dializė buvo vykdoma 4 °C temperatūroje, esant pastoviam maišymui. Dializės metu buferinis tirpalas keičiamas du kartus kas 6 valandas. Baltymo ir buferinio tirpalo tūrinis santykis atitinkamai 1:50.

2.2.19. Rekombinantinio baltymo RodA aktyvumo tyrimas

Natyvioje konformacijoje esantis RodA baltymas geba formuoti į amiloidines fibriles panašias struktūras. Dažas Tioflavinas T (ThT) yra labai plačiai naudojamas tiek amiloidinių fibrilių, tiek baltymų agregacijos kinetikos tyrimuose. Tiriant amiloidinių fibrilių susidarymą, matuojama fluorescencija maždaug 480 nm bangos ilgyje. Teoriškai, jei RodA baltymas yra aktyvus, jis formuos į amiloidines fibriles panašias struktūras ir sąveikaus su ThT.

Aktyvumo matavimams buvo ruošiamas mėginys, kuriame galutinė ThT koncentracija siekė 40 μM , o baltymo – 50 μM . Matavimai buvo atliekami fluorimetru naudojant AB programinę įrangą – sužadėjimas matuotas prie 415 nm bangos ilgio, o fluorescencija prie 484 nm bangos ilgio. Nustatytas jautris siekė 600 voltų. Matavimai buvo atliekami palaikant 40 °C temperatūrą – taip skatinamas didesnis β klosčių kiekio atsiradimas, kadangi nuo šios baltymo struktūros priklauso į amiloidus panašių struktūrų susidarymas. Tarp matavimų buvo atliekama inkubacija kambario temperatūroje, purtant mėginius 720 aps./min 16 valandų, po antrojo matavimo mėginiai inkubuoti 3 paras kambario temperatūroje, purtant mėginius 720 aps./min, siekiant patikrinti, kaip kinta fluorescencija bėgant laikui.

2.3. Rekombinantinio baltymo RodA panaudojimas gliukozės oksidazės imobilizavimui ant aukso elektrodo

Hidrofobinių dangos plačiai taikomos įvairių paviršių, tokių kaip teflonas, likra, stiklas, žėrutis, PDMS ir stiklinis anglies elektrodas, modifikacijoms, kurios labai pakeičia paviršiaus vilgumą. Hidrofobinių paviršiaus aktyvumas suteikia dideles daugelio hidrofobinių paviršių biofunkcionalizacijos perspektyvas. Kadangi biomolekulės dažniausiai yra hidrofilinės, siekiant jas imobilizuoti reikia labai hidrofilinių paviršių. Amfifilinė hidrofobinių struktūra padeda šiems baltymams lengvai suformuoti sluoksnius ant hidrofobinių paviršių ir pagerinti paviršiaus hidrofilumą, o tai palengvina tolesnę biomolekulinę imobilizaciją. Be to, turėdama didelį biologinį suderinamumą, hidrofobino matrica gali gerai išsaugoti imobilizuotų biomolekulių biologinį aktyvumą (Zhao et al., 2009).

2.3.1. Rekombinantinio baltymo RodA paruošimas

Rekombinantinio baltymo RodA tirpalas buvo pakeistas į 100 mM fosfatinį buferinį tirpalą (pH 6,8), siekiant pašalinti dializės buferiniame tirpale buvusią glutationų sistemą, kuri sąveikaudama su elektrodu gali blokuoti gliukozės oksidazės imobilizaciją. Šiai procedūrai atlikti buvo naudotos Zeba™ Spin Desalting Columns kolonėlės. Buferinio tirpalo pakeitimas buvo atliktas pagal gamintojo protokolą. Rekombinantinis baltymas RodA po buferinio tirpalo pakeitimo iškart buvo naudojamas elektrodo padengimui.

2.3.2. Elektrodo paruošimas gliukozės oksidazės imobilizacijai

Tyrimo metu buvo paruošti du elektrodai: aukso elektrodas, dengtas aukso nanodalelėmis su imobilizuota gliukozės oksidaze (Au/GOx) ir aukso elektrodas, dengtas aukso nanodalelėmis ir rekombinantiniu baltymu RodA su imobilizuota gliukozės oksidaze (Au/RodA/GOx).

Pirmiausia aukso elektrodai buvo nuvalyti mechaniškai, naudojant Al_2O_3 suspensiją ir po to veikiami ultragarsu dejonizuotame vandenyje 15 minučių. Po mechaninio valymo buvo atliktas elektrocheminis valymas 50 mM KOH ir 500 mM H_2SO_4 tirpaluose. Atliekant valymą 50 mM KOH tirpale potencialas buvo nustatytas nuo 0 iki -1450 mV, o nuskaitymo greitis siekė 200 mV/s. Kuomet valymas buvo atliktas 500 mM H_2SO_4 tirpale, potencialas buvo nustatytas nuo -200 iki 1450 mV, nuskaitymo greitis buvo 200 mV/s. Elektrocheminio valymo procesas abiejų tirpalų atveju atliktas per 40 ciklų.

Toliau ant išvalytų aukso elektrodų paviršiaus buvo užlašinta 4 μl AuND suspensijos ir elektrodai palikti nudžiūti. AuND šiame tyrime buvo naudojamos siekiant padidinti elektrodo paviršiaus plotą. Vėliau buvo atliktas dar vienas elektrocheminis valymas pagal anksčiau minėtą metodiką naudojant tik 500 mM H_2SO_4 tirpalą.

Paruošti aukso elektrodai su AuND buvo atsargiai nuplaunami vandeniui ir vandens likutis pašalintas oro srove. Ant vieno iš elektrodų su AuND buvo užlašinti 5 μl 2mg/ml GOx tirpalo ir elektrodas paliktas džiūti. Tuo tarpu kitas elektrodas buvo įmerktas į RodA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tirpalą ir inkubuotas 30 minučių. Praėjus inkubacijos laikui elektrodas buvo nusausintas ir ant jo paviršiaus užlašinti 5 μl 2 mg/ml GOx tirpalo. Elektrodas paliktas džiūti.

Naudojant paruoštus elektrodus Au/GOx ir Au/RodA/GOx buvo atliekama ciklinės voltamperometrijos analizė.

2.3.3. Ciklinė voltamperometrija

Ciklinė voltamperometrija (CV) yra galingas ir populiarus elektrocheminis metodas, dažniausiai naudojamas tiriant molekulinis redukcijos ir oksidacijos procesus. CV taip pat yra neįkainojamas tiriant elektronų perdavimo inicijuotas chemines reakcijas, įskaitant katalizę. CV metodas yra pagrįstas per celę tekančios srovės stiprio matavimu priklausomai nuo darbinio elektrodo potencialo pokyčio laike (Rountree, McCarthy, Rountree, Eisenhart, & Dempsey, 2017).

Šiame magistriniame darbe CV metodas buvo taikytas ištirti imobilizuotos gliukozės oksidazės ant aukso elektrodo paviršiaus ir gliukozės oksidazės imobilizuotos ant rekombinantinio RodA baltymo matricos ant aukso elektrodo paviršiaus elektrocheminius aktyvumus – atliekant

CV matavimus buvo stebėta, ar atsiranda srovė, kuri priklauso nuo fermento katalizuojamos reakcijos ant elektrodų paviršių.

Matavimai buvo atlikti 20 ml tūrio celėje, naudojant 0,1 M fosfatinį buferinį tirpalą (pH 6,8), palaikant pastovią 25 °C temperatūrą. Au/GOx ir Au/RodA/GOx elektrodai buvo naudoti kaip darbiniai elektrodai, platinos kaip pagalbinis ir kalomelio kaip palyginamasis elektrodas. Viso tyrimo metu buvo atlikta po du matavimus kiekvienam iš paruoštų elektrodų – vienas matavimas atliktas esant 0 mM gliukozės koncentracijai, kitas esant 50 mM gliukozės koncentracijai celėje.

2.3.4. Chronoamperometrija

Chronoamperometrija (CA) – nuo laiko priklausomas metodas, kai darbiniam elektrodai taikomas potencialas. Elektrodo srovė, matuojama kaip laiko funkcija, svyruoja priklausomai nuo analitės difuzijos iš tūrinio tirpalo link jutiklio paviršiaus. Todėl chronoamperometrija gali būti naudojama matuojant srovės ir laiko priklausomybę difuzijos valdomam procesui, vykstančiam prie elektrodo (Guy & Walker, 2016).

Baigiamajame magistro darbe CA metodas buvo taikytas siekiant nustatyti Au/GOx ir Au/RodA/GOx jautrį bei K_M ir I_{max} reikšmes.

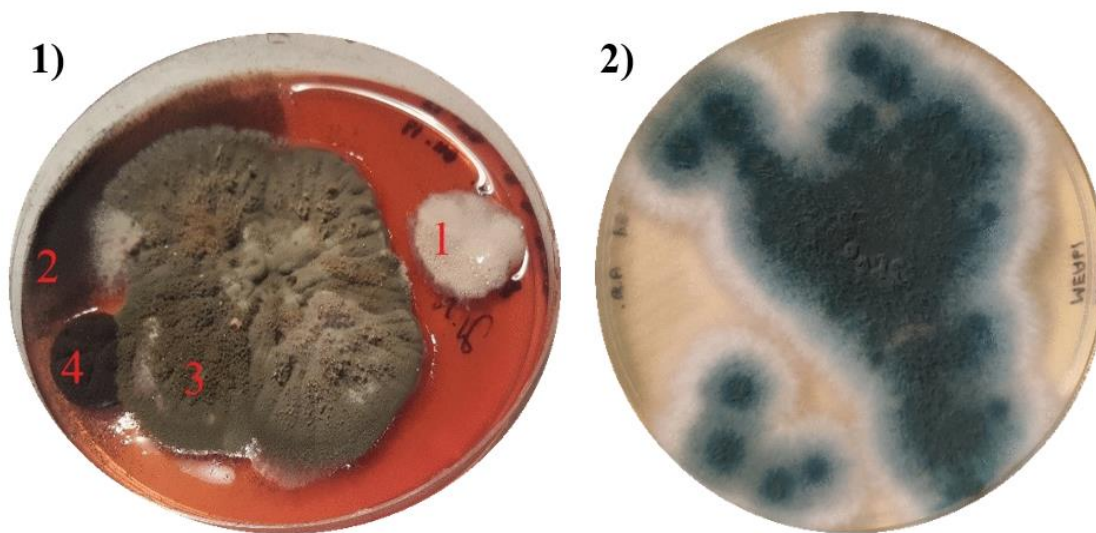
CA matavimai atlikti 20 ml tūrio celėje, naudojant 0,1 M fosfatinį buferinį tirpalą (pH 6,8), pastovioje 25 °C temperatūroje. Celėje buvo panardinti Au/GOx arba Au/RodA/GOx darbinis elektrodas, pagalbinis platinos ir palyginamasis kalomelio elektrodas. Parinktas potencialas buvo + 0,6 V, o laikui bėgant pridėamos gliukozės koncentracijos: 0 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM ir 50 mM.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Nežinomos rūšies pelėsinio grybo išskyrimas iki pavienės kultūros

Iš ant biokompozitinių plokščių augusių nežinomos rūšies pelėsinių grybų išskirtų ant MEAbI terpės (10 pav. 1)) mišinio, buvo atsitiktinai pasirinkta kultūra išskyrimui iki pavienės. Pasirinkta persėjimui kultūra pažymėta 3 numeriu.

Pelėsinis grybas buvo persėjamas keletą kartų tam, jog būtų akivaizdžiai matoma atskirta pavienė rūšis pagal morfologinius požymius, kuri vėliau buvo naudojama tolimesniuose tyrimuose. Paskutinio persėjimo metu pelėsinis grybas buvo augintas septynias paras. Praėjus inkubacijos periodui, buvo matoma pavienės kultūros morfologija – atskirto pelėsinio grybo paviršius buvo purus ir šiek tiek priminė miltelių pavidalą. Šviežios kultūros paviršius buvo melsvai žalios spalvos su baltais siaurais krašteliais (10 pav. 2)). Inkubuojant atskirtą kultūrą ilgesnį laiką, jos spalva pakito į tamsiai pilką ir paviršius prarado savo purumą. Tyrinėjant paviršių steriliu skalpeliu buvo pastebėta, kad purumą pakeitė miltelius primenanti struktūra, kuri šviežioje kultūroje yra nežymi.

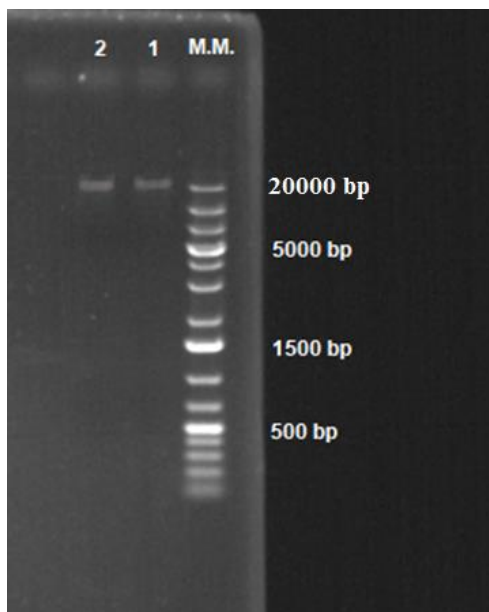


10 pav. Lėkštelės su pelėsinių grybų kultūromis. 1) Nežinomų rūšių pelėsinių grybų mišinys; 2) Išskirta pavienė nežinomo pelėsinio grybo rūšis

3.2. Nežinomos pelėsinio grybo rūšies nustatymas molekulinės biologijos metodais

3.2.1. Genominės DNR išskyrimas ir PGR

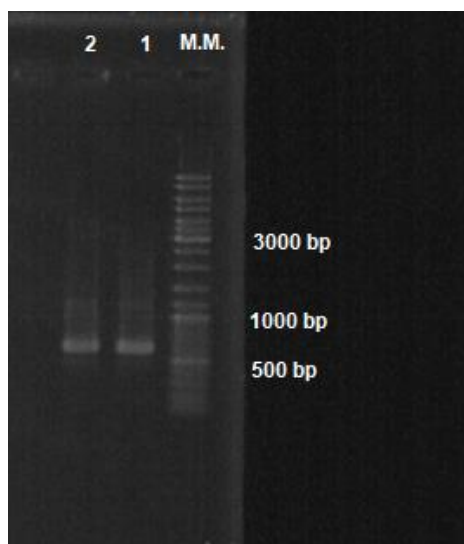
Iš pavienės nežinomos rūšies pelėsinio grybo kultūros buvo išskiriama genominė DNR. Išskyrimui buvo naudotas komercinis rinkinys „PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit“ iš Invitrogen, naudojant gamintojo pateiktą protokolą. Naudotos dvi to paties nežinomo pelėsinio grybo rūšies kultūros, augintos skirtingais laiko tarpais, siekiant išsiaiškinti, ar auginimo trukmė turi įtakos genominės DNR išskyrimui. Tarp augintų kultūrų buvo 7 dienų tarpas. Prieš išskyrimą pelėsinio grybo kultūra nuo Petri lėkštelės buvo nuimama steriliu skalpeliu ir atsveriamą po 0,2 gramo – tai buvo rekomenduojamas kiekis genominės DNR išskyrimui. Atlikus procedūrą, gauti rezultatai buvo tikrinami horizontalios elektroforezės būdu, naudojant 1 % agarozės gelį. Gauti rezultatai pateikti 11 pav.:



11 pav. Genominės DNR elektroforezės rezultatai. M.M – molekulinės masės žymuo, 1 – 26 dienas auginto pelėsinio grybo genominė DNR, 2 – 19 dienų auginto pelėsinio grybo genominė DNR

Remiantis gautais rezultatais, matoma, jog iš abiejų kultūrų išskirta genominė DNR yra vienodo dydžio ir siekia 20000 bp. Daroma prielaida, jog kultūrą pavyko pilnai atskirti iš mišinio. Rezultatai parodo, jog pelėsinių grybų augimo trukmė neturėjo įtakos genominės DNR išskyrimo procedūros kokybei.

Toliau darbe išskirta genomine DNR buvo naudojama kaip matrica PGR, siekiant padauginti tarpribosominį regioną (ITS). Šiam tikslui įgyvendinti, buvo naudoti universalūs ITS1 ir ITS4 pradmenys. PGR produktai buvo tikrinami elektroforetiškai, naudojant 1 % agarozės gelį. Rezultatai pateikti 12 pav. Pagal gautus rezultatus matoma, jog amplifikuotos DNR dydis abiejų kultūrų atveju yra 600 bp. Gauti PGR produktai buvo išgryninti iš išsiųsti ITS sekoskaitai.



12 pav. PGR rezultatai naudojant ITS1-ITS4 pradmenis. M.M. – molekulinės masės žymuo, 1 – 26 dienas auginto pelėsinio grybo PGR produktas, 2 – 19 dienų auginto pelėsinio grybo PGR produktas

3.2.2. PGR produkto sekoskaita

Gauti sekoskaitos rezultatai buvo pertvarkomi naudojant programinę įrangą ApE. Atliekant pertvarkymus buvo siekiama pašalinti sekoskaitos rezultatuose matomą „triukšmą“ – persidengiančius signalus, ir palikti tik chromatogramoje matomus ryškius pikus. Tai yra labai svarbu siekiant gauti kuo tikslesnius rezultatus. Pertvarkytos sekos buvo tikrinamos NCBI duomenų bazėje taikant „blastn“ įrankį. Gauta, jog nežinomos rūšies pelėsinis grybas yra *A. fumigatus* su 99,8 % sekų sutapimu.

3.3. Geno, koduojančio RodA baltymo sintezę, nustatymas

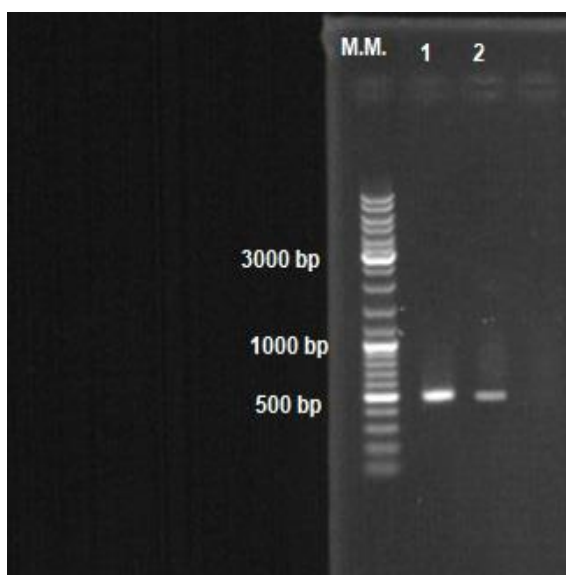
Daugelio pelėsinių grybų konidijų paviršių dengia plonas, tvarkingai išsidėsčiusių lazdelės formos struktūrų sluoksnis. Šios struktūros skatina konidijų formavimąsi ir jų prikibimą prie įvairiausių paviršių. Lazdelės formos struktūrą daugiausiai sudaro baltymai hidrofobiniai – maža baltymų šeima, kuriai būdingas konservatyvios aštuonios cisteino liekanos. *A. fumigatus* atveju

buvo vizualizuotas lazdelės formos struktūrų sluoksnis ir parodyta, kad *rodA* genas dalyvauja formuojant šio pelėsinio grybo konidijų paviršinį sluoksnį. Pastebėta, kad *A. fumigatus* konidijose egzistuoja dviejų tipų hidrofobinai – RodA ir RodB, kurių dydžiai atitinkamai siekia ~16 kDa ir ~14 kDa, tačiau konidijas formuoja tik RodA baltymas (Valsecchi et al., 2018). Šiame baigiamajame darbe dėmesys skirtas būtent RodA baltymui.

3.3.1. *rodA* geno aptikimas taikant PGR metodą

RodA baltymą koduojančio geno *rodA* aptikimui buvo naudota anksčiau išskirta genominė DNR. PGR reakcijai atlikti naudoti specifiniai pradmenys, skirti būtent šio geno sričiai – tiesioginis pradmuo RodA1 ir atvirkštinis pradmuo RodA2. Šių pradmenų sekos ir PGR reakcijos sąlygos adaptuotos iš literatūros šaltinių. Remiantis literatūroje pateikta informacija, produkto dydis turėtų būti 488 bp.

PGR produktai buvo vizualizuojami elektroforetiškai, naudojant 1 % agarozės gelį. Pagal 13 pav. pateiktus rezultatus matoma, jog gauti PGR produktų dydžiai siekia 500 bp, todėl daroma prielaida, jog *rodA* geną pavyko padauginti. Toliau PGR produktų fragmentai buvo išpjauti iš agarozinio gelio ir išgryninti naudojant „Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit“ rinkinį pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išgryninti PGR produktai vėliau buvo naudojami ligavimui/klonavimui ir transformacijai.

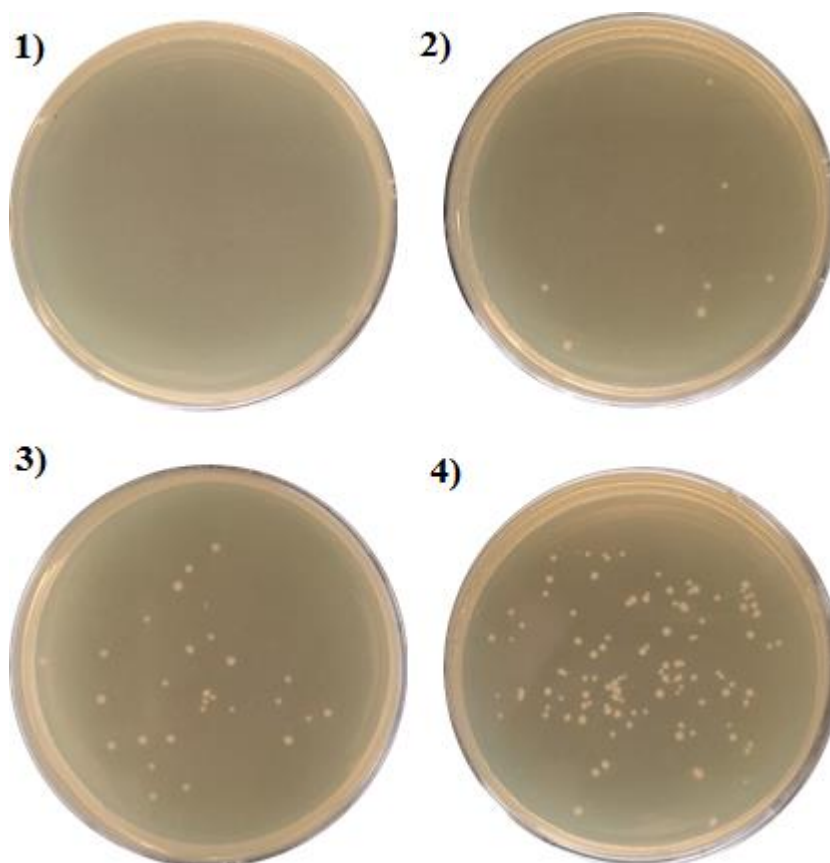


13 pav. PGR rezultatai naudojant RodA1-RodA2 pradmenis. M.M. – molekulinės masės žymuo, 1 – 26 dienas auginto *A. fumigatus rodA* geno fragmentas, 2 – 19 dienų auginto *A. fumigatus rodA* geno fragmentas

3.3.2. PGR produkto ligavimas į pJET1.2 vektorių, klonavimas ir transformacija

Su išgrynintais PGR produktais buvo atliekama ligavimo ir klonavimo reakcija, naudojant „CloneJET PCR Cloning Kit“ rinkinį iš Thermo Fisher Scientific pagal gamintojo protokolą. Klonavimui atlikti panaudotas pJET1.2 vektorius.

Klonuotas genas vėliau buvo transformuojamas į *E. coli* DH10β bakterinį kamieną. Transformuotos ląstelės su plazmidėmis buvo išsėtos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu, kurio galutinė koncentracija siekė 100 µg/ml. Mėginiai buvo sėjami tiek nekoncentruoti, tiek koncentruoti, nucentrifugavus ir nupylus supernatantą. Tai yra svarbu siekiant pamatyti, koks yra transformacijos efektyvumas. Kontrolinėje lėkštelėje buvo išsėtos tik kompetentinės ląstelės, neturinčios plazmidės. Gauti rezultatai pateikti 14 pav.:



14 pav. *E. coli* DH10β bakterijų augimas ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu. 1) Kontrolinė lėkštelė, 2) Transformantai su 26 dienas auginto *A. fumigatus* plazmide, 3) Transformantai su 19 dienų auginto *A. fumigatus* plazmide, c) Koncentruoti transformantai su 26 dienas auginto *A. fumigatus* plazmide. Lėkštelė, kurioje yra koncentruoti transformantai su 19 dienų auginto *A. fumigatus* plazmide nėra, nes išaugo tik viena kolonija

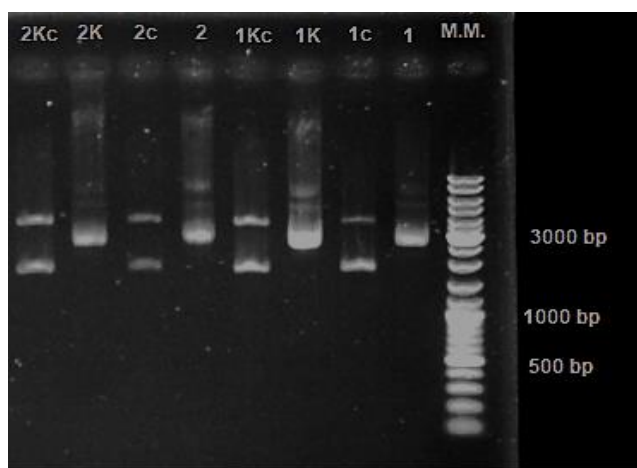
Pagal gautus rezultatus matoma, kad transformacija sėkminga, kadangi kontrolinėje lėkštelėje kompetentinės ląstelės neišaugo, nes neturi geno, apsprendžiančio atsparumą

ampicilinui. Iš kiekvienos lėkštelės vėliau buvo ruošama naktinė kultūra skystoje LB terpėje su ampicilinu. Transformantų augimas buvo stebimas pagal terpės drumstumą.

3.3.3. Plazmidinės DNR išskyrimas ir jos karpymas restrikcijos endonukleazėmis

Iš transformantų, turinčių *rodA* geną, naktinės kultūros mėginių buvo gryninama plazmidinė DNR pro kolonėlę, naudojant „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ iš Thermo Fisher Scientific pagal gamintojo pateiktą protokolą. Rezultatai tikrinti elektroforezės būdu ant 1 % agarozės gelio.

Išgrynintos plazmidinės DNR mėginiai buvo karpomi restrikcijos endonukleazėmis XbaI ir BglI, siekiant patikrinti ar plazmidė tikrai įsiterpė į *E. coli* DH10β kamieno genomą. 15 pav. pavaizduoti restrikcijos endonukleazėmis karpytų plazmidžių fragmentai ant 1 % agarozės gelio.



15 pav. Plazmidžių karpymo restrikcijos endonukleazėmis rezultatai. M.M. – molekulinės masės žymuo; 1 – 19 dienų auginto *A. fumigatus* plazmidė; 1c – 19 dienų auginto *A. fumigatus* sukarpyta plazmidė; 1K – 19 dienų auginto *A. fumigatus* plazmidė, koncentruota; 1Kc – 19 dienų auginto *A. fumigatus* sukarpyta plazmidė, koncentruota. 2 – 26 dienas auginto *A. fumigatus* plazmidė; 2c – 26 dienas auginto *A. fumigatus* sukarpyta plazmidė; 2K – 26 dienas auginto *A. fumigatus* plazmidė, koncentruota; 2Kc – 26 dienas auginto *A. fumigatus* sukarpyta plazmidė, koncentruota

Remiantis 15 pav. pateiktais rezultatais, visų plazmidžių dydžiai siekia 3000 bp, o sukarpytų plazmidžių fragmentų dydžiai yra apie 2000 bp ir 4000 bp. Manoma, kad plazmidės dydis siekia tik 3000 bp dėl to, jog ji yra superspiralės formoje. Po karpymo restrikcijos endonukleazėmis gauti fragmentai nesutapo su teoriškai apskaičiuotais fragmentų dydžiais, todėl daroma prielaida, jog įvyko dalinis karpymas. Kadangi karpymas įvyko, daroma prielaida, jog plazmidė sėkmingai įsiterpė į ląstelių genomą.

3.3.4. Plazmidinės DNR su klonuotu *rodA* genu sekoskaitos analizė

Išgrynintos plazmidinės DNR mėginiai buvo siunčiami 18S ribosominės RNR sekoskaitai pagal pJET1.2F ir pJET1.2R pradmenis. Gautos sekos buvo apdorojamos pašalinant persiklojančius pikus ir „triukšmą“ bei analizuojamos NCBI duomenų bazėje. Išanalizavus visas sekas gauta, jog tiriamasis genas yra būtent *rodA*. Rezultatų apibendrinimas pateiktas 16 pav.:

Aspergillus fumigatus isolate GM02/52 hydrophobin (rodA) gene, complete sequence

Sequence ID: [HQ127306.1](#) Length: 490 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 447 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
806 bits(436)	0.0	444/447(99%)	3/447(0%)	Plus/Minus

16 pav. Plazmidinės DNR sekoskaitos rezultatai

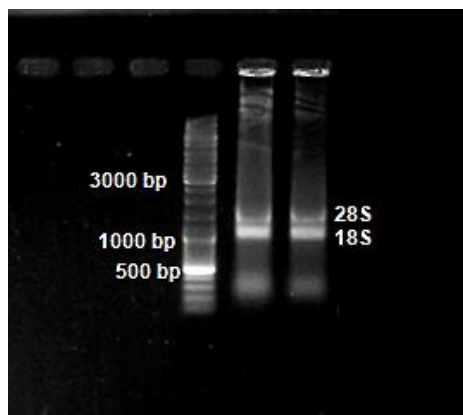
3.4. Kopijinės DNR sintezė

1994 metais tyrėjų Thau et al. atliktas tyrimas lyginant *A. nidulans* ir *A. fumigatus* genų *rodA* sekas ir jų ypatumus, atskleidė, jog *A. fumigatus rodA* gene yra egzonų ir intronų. Straipsnio duomenimis, sekoje aptikti trys egzonai (334, 89, 54 bp) bei du intronai (49 ir 46 bp) (Thau et al., 1994). Šiame magistriniame darbe siekiama rekombinantinio baltymo ekspresijos sistemą perkelti į bakterinį kamieną. Kadangi prokariotai turi tik egzonus, atsirado būtinybė pašalinti nekoduojančias *rodA* geno sritis. Šiam tikslui įgyvendinti buvo gryninama suminė RNR ir sintetinama kopijinė DNR, kurios mėginiai vėliau buvo nusiųsti sekoskaitai. Taip pat buvo įsigyta plazmidė, turinti *rodA* geną – šiam tikslui geno seka buvo adaptuota iš literatūros šaltinių, todėl kopijinės DNR sekoskaitos rezultatai toliau panaudojami sekų palyginimui. Plazmidė buvo įsigyta kartu su genu dėl to, jog ekspresijos sistemoje privalo būti sritis, koduojanti ubikvitiną – tai yra labai svarbu gryninant rekombinantinį baltymą, kadangi suliejimas su ubikvitinu padidina ir rekombinantinių hidrofobinių tirpumą.

3.4.1. *A. fumigatus* suminės RNR išskyrimas ir kopijinės DNR sintezė. Produkto ligavimas į pJET1.2 vektorių, klonavimas ir transformacija

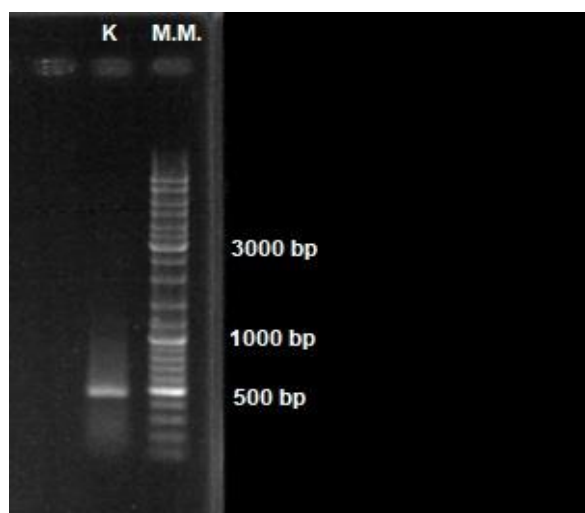
Suminei RNR išskirti pelėsinis grybas *A. fumigatus* buvo auginamas mėnesį. Išskyrimui naudotas rinkinys „Quick-RNA™ MiniPrep“ iš Zymo Research pagal gamintojo pateiktą protokolą. Išskirta suminė RNR buvo tikrinama elektroforetiškai ant 3 % agarozės gelio. Pagal 17

pav. pateiktus rezultatus gerai matomi 28S ir 18S fragmentai – jie parodo, jog suminę RNR pavyko išskirti. 28S fragmentas nėra labai ryškus, todėl manoma, jog RNR iki vizualizavimo elektroforetiškai galėjo dalinai degraduoti. Nepaisant to gauti mėginiai toliau buvo panaudoti kopijinės DNR sintezei.



17 pav. Suminės RNR elektroforezės vaizdas

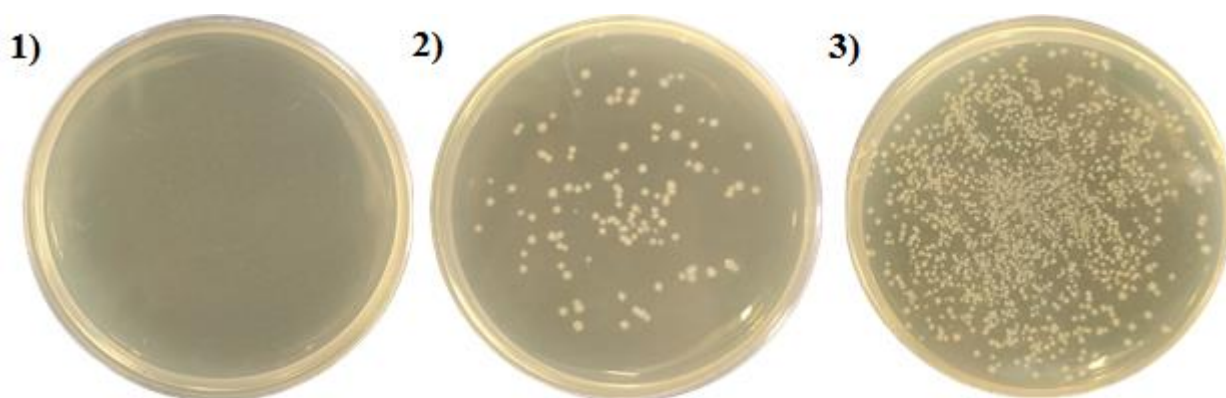
Kopijinės DNR sintezė toliau buvo atliekama vykdant atvirkštinės transkripcijos reakciją panaudojant suminę RNR kaip matricą. Reakcijai atlikti naudotas „SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System“ rinkinys iš Thermo Fisher Scientific pagal gamintojo pateiktą protokolą. Viename PGR cikle buvo atliekama atvirkštinė transkripcija ir gauto fragmento amplifikacija. Galutinis produktas buvo vizualizuojamas ant 1 % agarozės gelio (18 pav.).



18 pav. Kopijinės DNR elektroforezės vaizdas

Pagal 18 pav. pateiktus rezultatus matoma, jog kopijinės DNR dydis siekia 500 bp. Dydis atitinka tyrėjų Pedersen et al. (Bell-Pedersen et al., 1996) susintetintos kopijinės DNR dydį.

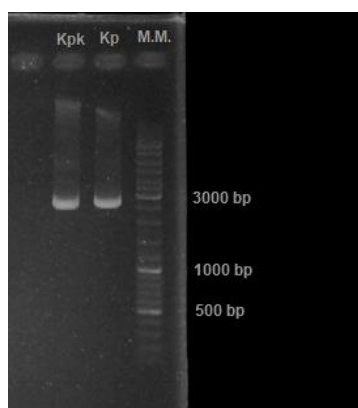
Toliau kopijinė DNR buvo išgryninta, liguota pagal bukų galų protokolą, klonuota į klonavimo vektorių pJET1.2 ir transformuota į *E. coli* DH10β bakterinį kamieną. Gauti transformantai buvo auginami ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu, kurio galutinė koncentracija terpėje buvo 100 µg/ml. Iš užaugusių transformantų vėliau buvo paruošta naktinė kultūra, kurioje augimas vertintas pagal terpės drumstumą. Transformacijos rezultatai pateikti 19 pav.:



19 pav. Transformuotų *E. coli* DH10β bakterijų augimas ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu. 1) Kontrolė; 2) Transformantai su įterpta kopijinės DNR plazmide; c) Transformantai su įterpta kopijinės DNR plazmide, koncentruoti

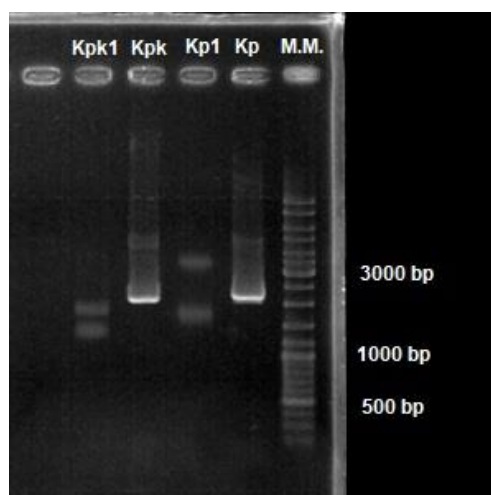
3.4.2. Kopijinės DNR plazmidžių išskyrimas ir karpymas restrikcijos endonukleazėmis

Iš išaugintos transformantų naktinės kultūros buvo išskirta plazmidinė DNR tuo pačiu rinkiniu, kuris buvo minėtas anksčiau. Gauti rezultatai vizualizuoti ant 1 % agarozės gelio ir pateikti 20 pav.



20 pav. Išskirtos plazmidinės DNR elektroforezės vaizdas. M.M. – molekulinės masės žymuo; Kp – kopijinės DNR plazmidė; Kpk – kopijinės DNR plazmidė iš koncentruotos transformantų kultūros

Pagal gautus rezultatus matoma, jog gautų plazmidžių dydžiai siekia ~2700 bp. Manoma, kad plazmidė yra superspiralės formoje. Kadangi plazmidinę DNR pavyko išskirti, buvo atliktas karpymas XbaI ir BglI restrikcijos endonukleazėmis, siekiant įsitikinti, jog kopijinę DNR sėkmingai pavyko įterpti į bakterijų genomą. Gauti restrikcijos rezultatai pateikti 21 pav. Teoriškai plazmidės dydis turėtų būti 3474 bp, o restrikcijos endonukleazių XbaI ir BglI kirpimo vietos atitinkamai turėjo būti 877 bp ir 2615 bp. Restrikcijos endonukleazės turėjo perkirpti plazmidę taip, jog gautų fragmentų dydžio skirtumo agarozės gelyje nesimatyti. Remiantis 21 pav. pateiktais rezultatais matoma, jog šiuo atveju kopijinės DNR plazmidė sukarpyta daugmaž 2000 bp ir 4000 bp dydžio fragmentais, o kopijinės DNR plazmidė, išskirta iš koncentruotos kultūros sukarpyta maždaug 2000 ir 2500 bp dydžio fragmentais. Manoma, jog abejais atvejais galėjo įvykti dalinis karpymas, tačiau nepaisant to, mėginiai buvo išsiųsti sekoskaitai.



21 pav. Karpymo restrikcijos endonukleazėmis rezultatai. M.M. – molekulinės masės žymuo; Kp – kopijinės DNR plazmidė; Kp1 – kopijinės DNR sukarpyta plazmidė; Kpk – kopijinės DNR plazmidė, koncentruota; Kpk1 – kopijinės DNR sukarpyta plazmidė, koncentruota

3.4.3. Kopijinės DNR sekoskaita ir rezultatų analizė

Labai dažnai lyginamų sekų homologai pametami arba neaptinkami todėl, nes tarpusavyje lyginamos DNR sekos. Baltymų (arba „išverstos“ DNR) sekų lyginimas yra daug jautresnis metodas nei DNR sekų lyginimo. DNR sekų lyginimas turi 5–10 kartų trumpesnę evoliucijos laikotarpį – retai aptinkama homologija po daugiau nei 200–400 milijonų metų skirtumo. Tuo tarpu lyginant baltymų (arba „išverstos“ DNR) sekas, galima nustatyti homologiją sekose, kurios paskutinį kartą turėjo bendrą protėvį prieš daugiau nei 2,5 milijardo metų (Pearson, 2013).

Būtent dėl šios priežasties po sekoskaitos gauta kopijinės DNR seka pirmiausiai buvo apdorota ApE programine įranga, siekiant pašalinti „triukšmą“ ir persiklojančius pikus. Kaip jau buvo minėta anksčiau, tolimesniuose magistrinio darbo tyrimuose naudotas išsigytas genas, kuriame hidrofobino RodA seka buvo adaptuota iš literatūros šaltinių. Pertvarkyta kopijinės DNR seka pirmiausia buvo lyginama su seka, adaptuota iš literatūros. Šiam tikslui naudotas NCBI duomenų bazėje esantis įrankis „*blastn*“. Gauti rezultatai pateikti 22 pav.:

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	ENA AAB07707 AAB07707.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> hydrophobin	551	551	38%	6e-161	87.47%	480	Query_460921

22 pav. Kopijinės DNR sekoskaitos rezultatų lyginimas su literatūroje pateikta seka

Toliau sutvarkyta kopijinės DNR seka buvo „išversta“ į baltymo seką, naudojant *EMBOSS Transeq* įrankį. Gauta seka buvo perkeliama į NCBI duomenų bazėje esantį „*blastp*“ įrankį ir atlikus analizę gauta, jog išversta kopijinės DNR seka dalinai atitinka hidrofobino seką (23 pav.).

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	hydrophobin [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	64.7	64.7	28%	4e-10	62.22%	97	CAD28411.1
☒	hydrophobin [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	64.3	64.3	28%	5e-10	62.22%	96	CAD28415.1
☒	hydrophobin [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	58.2	58.2	20%	2e-07	75.76%	116	CAD28404.1
☒	hydrophobin [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	51.2	51.2	25%	4e-05	78.05%	91	CAD28405.1
☒	rodlet A [<i>Aspergillus fumigatus</i>]	47.0	47.0	24%	0.002	76.92%	89	ABX89262.1
☒	hydrophobin [<i>Aspergillus omanensis</i>]	44.3	44.3	21%	0.035	60.00%	126	BAI94604.1

23 pav. „Išverstos“ kopijinės DNR sekos analizės rezultatai

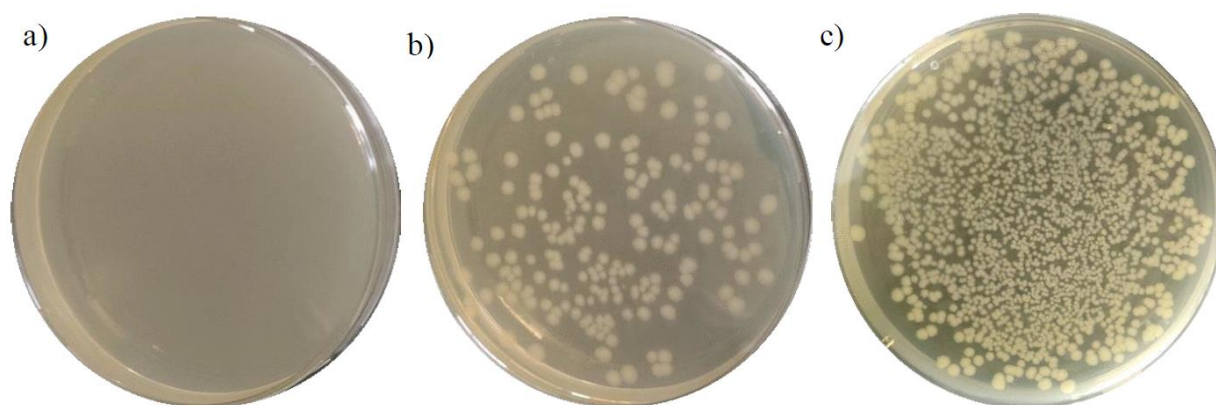
Tuo tarpu analizuojant iš literatūros šaltinio adaptuotą seką, gauta daug daugiau įvairių rezultatų, apimant ir kitas rūšis, ne tik *A. fumigatus*. Tačiau įdomu tai, kad iš literatūros adaptuotos sekos panašumas su tomis pačiomis sekomis (jų pavadinimai parodyti 23 pav.) yra ženkliai didesnis, nei išverstos kopijinės DNR. Nepaisant to, manoma, jog tokią kopijinę DNR būtų galima klonuoti į ekspresijos vektorius, dėl to, jog sekų panašumas gana aukštas.

3.5. Rekombinantinio baltymo RodA ekspresija

3.5.1. Plazmidės transformacija

Šiam baigiamajam magistro darbui buvo įsigyta plazmidė, turinti RodA baltymą koduojantį geną *rodA* be intronų. Genas buvo įterptas į ekspresijos vektorių Champion™ pET SUMO, dėl kurio gaunamas didžiausias tirpių baltymų kiekis. Taip yra dėl to, nes ekspresijos vektoriuje yra sulieti nedideli, su ubikvitinu susiję modifikatoriai (SUMO). Priešingai nei ubikvitinas, SUMO dalyvauja baltymų stabilizavime ir lokalizavime *in vivo*.

Gauta plazmidė, turinti įterptą *rodA* geną be intronų, transformuota į *E. coli* BL21 (DE3) bakterinį kamieną. Transformantai auginti ant agarizuotos LB terpės su kanamicinu, kurio galutinė koncentracija terpėje 50 µg/ml. Transformacijos rezultatai pateikti 24 pav.:



24 pav. Transformuotų *E. coli* BL21 (DE3) bakterijų augimas ant agarizuotos LB terpės su kanamicinu. a) Kontrolė; b) Transformantai su įterpta plazmide; c) Transformantai su įterpta plazmide, koncentruota kultūra

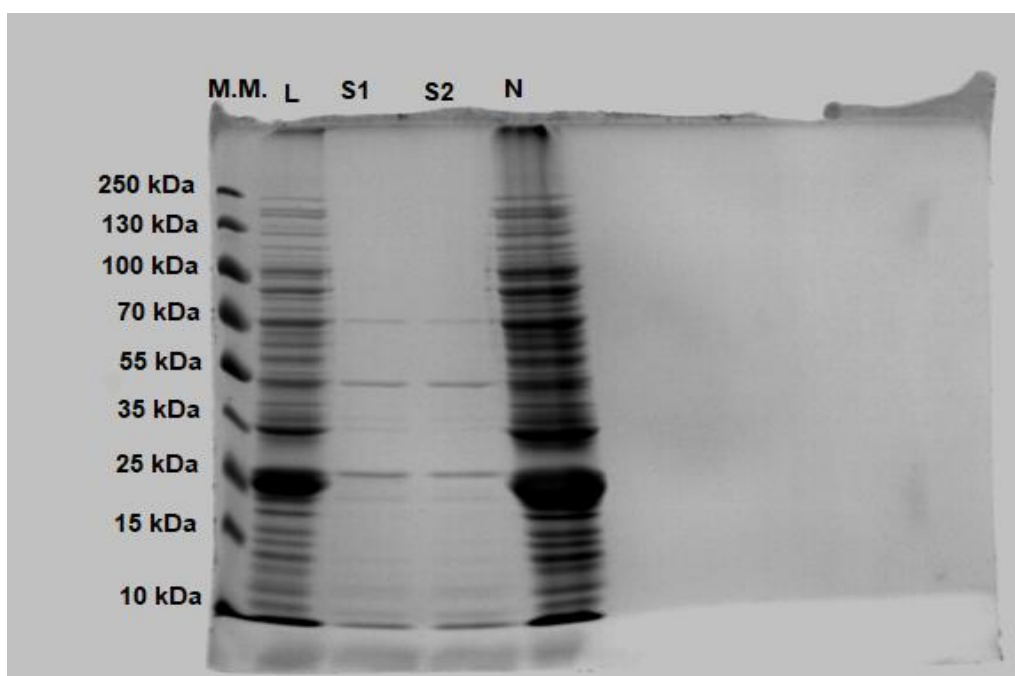
Pagal 24 pav. pateiktus rezultatus matoma, jog plazmidė buvo sėkmingai įterpta į *E. coli* BL21 (DE3) bakterinį kamieną. Iš užaugusių transformantų vėliau užsėta naktinė kultūra. Kitą dieną buvo pamatuotas užaugusios kultūros optinis tankis ir paskaičiuotas reikalingas tūris persėjimui, jog šviežios kultūros pradinis optinis tankis būtų maždaug 0,05 O.V.

3.5.2. Baltymų raiškos indukcija naudojant IPTG. Raiškos įvertinimas SDS-PAGE metodu

Šviežiai užsėta transformantų kultūra buvo paauginta iki tol, kol jos optinis tankis pasiekė 0,6 O.V. Tuomet į terpę buvo pridedama 0,5 M IPTG tirpalo, kurio galutinė koncentracija terpėje

siekė 0,5 mM. Po indukcijos kultūra buvo dar paauginama keletą valandų ir biomasė surinkta centrifuguojant.

Kadangi yra žinoma, jog šio rekombinantinio baltymo atveju po indukcijos susidaro intarpiniai kūneliai, atsirado būtinybė tą patikrinti. Surinkta biomasė buvo suspenduojama buferiniame tirpale (0,5 M NaCl, 20 mM TRIS-HCl, pH 7,9) ir ardoma ultragarsiniu sonikatoriumi – po ardymo paimtas lizato mėginys palyginimui SDS-PAGE būdu. Vėliau mėginys nucentrifuguojamas, nuosėdos atskiriamos nuo supernatanto – paimamas 1 ml supernatanto palyginimui. Nuosėdos suspenduojamos buferiniame tirpale (50 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, pH 8), inkubuojamas kambario temperatūroje ir nucentrifuguojamas. Paimamas nuosėdų mėginys. Su surinktais mėginiais buvo atlikta SDS-PAGE elektroforezė, kurios rezultatai pateikti 25 pav.:

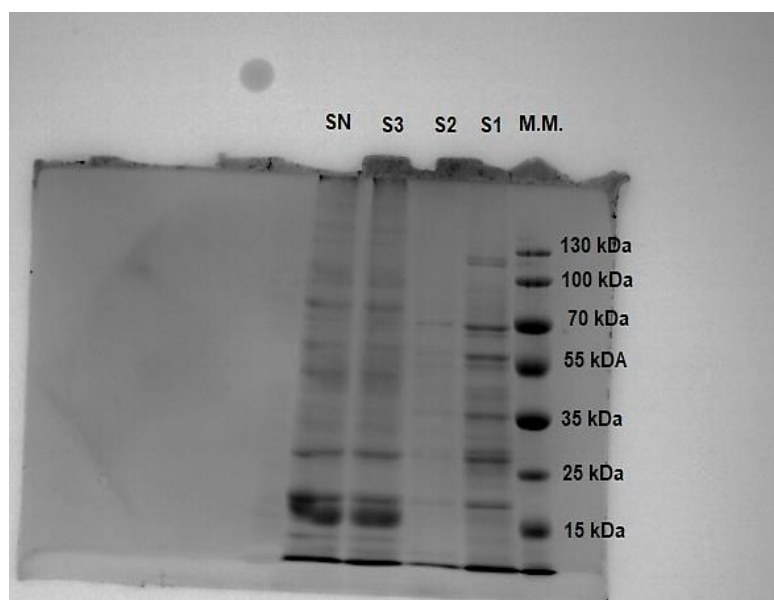


25 pav. Rekombinantinio RodA baltymo raiškos tikrinimas SDS-PAGE metodu. M.M. – molekulinės masės žymuo, L – lizato mėginys, S1 – supernatantas po pirmojo centrifugavimo; S2 – supernatantas po antrojo centrifugavimo; N - nuosėdos

Kaip jau buvo minėta anksčiau, RodA baltymo dydis yra 16 kDa. Šiuo atveju matomas ekspresuojamo baltymo dydis siekia maždaug 25 kDa. Taip gali būti dėl SUMO žymės molekulinio svorio arba prieš elektroforezę baltymas nebuvo visiškai denatūruotas ir išlaikė vieną ar dvi disulfidines jungtis. Remiantis 25 pav. pateiktais rezultatais pastebima, jog supernatanto mėginiuose ekspresuojamo rekombinantinio baltymo RodA nėra, todėl daroma išvada, jog baltymas ekspresuojamas intarpiniuose kūneliuose.

3.5.3. Intarpinių kūnelių tirpinimas ir rekombinantinio RodA baltymo gryninimas

Surinkta transformantų po indukcijos biomasė toliau buvo naudojama intarpinių kūnelių tirpinimui. Šiam tikslui buvo naudotas keletas lizės buferinių tirpalų, turinčių 8 M karbamido. Viso proceso metu mėginys buvo ardomas ultragarsiniu sonikatoriumi ir centrifuguojamas keletą kartų, po kiekvieno centrifugavimo buvo išsaugoma dalis supernatanto analizei SDS-PAGE elektroforezės būdu. Gauti intarpinių kūnelių tirpinimo rezultatai SDS-PAGE metodu pateikti 26 pav. Pagal gautus rezultatus matoma, jog intarpiniai kūneliai buvo sėkmingai ištirpdyti. Tikslinio baltymo dydis gelyje ~16 kDa. Po paskutinio centrifugavimo surinktas supernatantas toliau buvo naudojamas rekombinantinio baltymo RodA gryninimui.

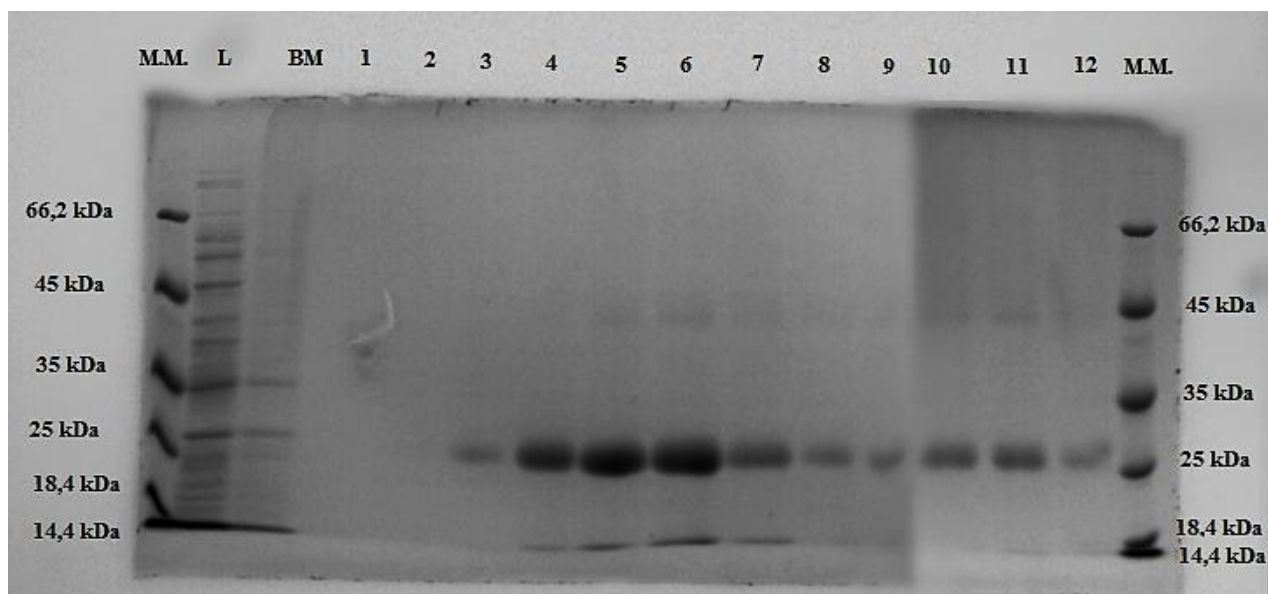


26 pav. Intarpinių kūnelių tirpinimo tikrinimo SDS-PAGE rezultatai. M.M. – molekulinės masės žymuo, S1 – supernatantas po pirmojo centrifugavimo, S2 – supernatantas po antrojo centrifugavimo, S3 – supernatantas po trečiojo centrifugavimo, SN – supernatantas su nuosėdomis

Išardytų intarpinių kūnelių supernatantas buvo filtruojamas pro 0,22 μ m filtrą, siekiant pašalinti likusias ląstelių nuolaužas. Rekombinantinio baltymo RodA gryninimas buvo vykdomas afininės chromatografijos būdu, naudojant HisTrap™ HP 1 ml kolonėlę. Gryninimo metu buvo parinktos denatūruojančios sąlygos, nes remiantis literatūroje pateikta informacija, rekombinantinis RodA baltymas yra susilankstęs taip, jog histidino uodegėlė yra pasislėpusi baltymo struktūros vidinėje dalyje ir negali sąveikauti su sorbentu.

Rekombinantinio RodA baltymo gryninimas vykdytas dviem būdais – laipsniška gradientine eliucija ir smūgine eliucija. Laipsniška gradientinė eliucija buvo taikoma siekiant

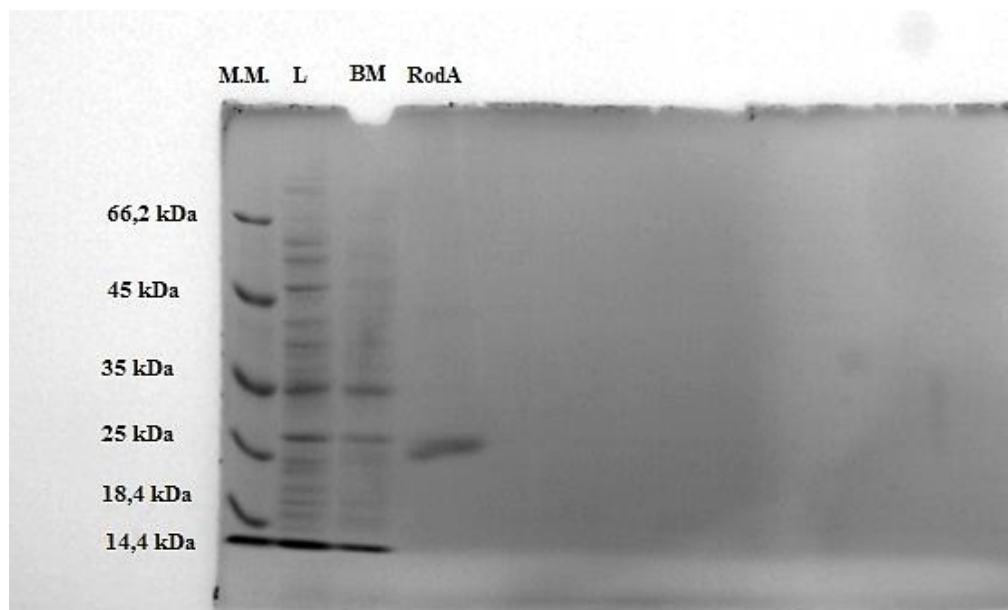
pamatyti, ties kokia imidazolo koncentracija prasideda tikslinio baltymo eliucija – tai yra svarbu norint atlikti smūginę eliuciją ir susirinkti didesnį baltymo kiekį, kuris yra reikalingas tolimesnei analizei. Laipsniškos gradientinės eliucijos rezultatai pateikti 27 pav. Pagal gautus rezultatus matoma, jog rekombinantinio baltymo eliucija prasideda jau tuomet, kai imidazolo koncentracija prisijungimo buferiniame tirpale pasiekia 100–150 mM. Didžiausias baltymo kiekis eliuojasi tuomet, kai imidazolo koncentracija siekia 150–250 mM.



27 pav. Laipsniškos gradientinės eliucijos rezultatai. M.M. – molekulinės masės žymuo, L – ląstelių prieš indukciją su IPTG lizatas, BM – kolonėlę „prašokęs“ nesorbuotų baltymų mėginys, 1 – eliuento, turinčio 25 mM imidazolo antra frakcija, 2 – eliuento, turinčio 50 mM imidazolo antra frakcija, 3 – eliuento, turinčio 100 mM imidazolo pirma frakcija, 4 – eliuento, turinčio 100 mM imidazolo antra frakcija, 5 – eliuento, turinčio 150 mM imidazolo pirma frakcija, 6 – eliuento, turinčio 150 mM imidazolo antra frakcija, 7 – eliuento, turinčio 200 mM imidazolo pirma frakcija, 8 – eliuento, turinčio 200 mM imidazolo antra frakcija, 9 – eliuento, turinčio 250 mM imidazolo pirma frakcija, 10 – eliuento, turinčio 0,5 M imidazolo antra frakcija, 11 – eliuento, turinčio 0,5 M imidazolo pirma frakcija, 12 – eliuento, turinčio 250 mM imidazolo antra frakcija

Vykdamas smūginę eliuciją praplovimo buferiniame tirpale buvo pasirinkta 75 mM imidazolo koncentracija, kadangi laipsniškos gradientinės eliucijos metu, baltymas eliuavosi prie maždaug 100 mM – tai palyginus saugi riba, norint kaip įmanoma mažiau prarasti tikslinio baltymo. Smūginės eliucijos rezultatai pateikti 28 pav.

Toliau išgrynintas baltymas buvo dializuojamas prieš buferinį tirpalą, turintį oksiduoto ir redukuoto glutationų porą. Dializė buvo atliekama siekiant atkurti baltymo natyvią struktūrą su teisingomis disulfidinėmis jungtimis, kurios buvo pašalintos gryninimo metu.



28 pav. Smūginės RodAs eliucijos rezultatai. M.M. – molekulinės masės žymuo, L – ląstelių prieš indukciją su IPTG lizatas, BM – kolonėlę „prašokę“ nesorbuoti baltymai, RodA – rekombinantinis baltymas RodA

3.5.4. Išgryninto rekombinantinio baltymo RodA koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

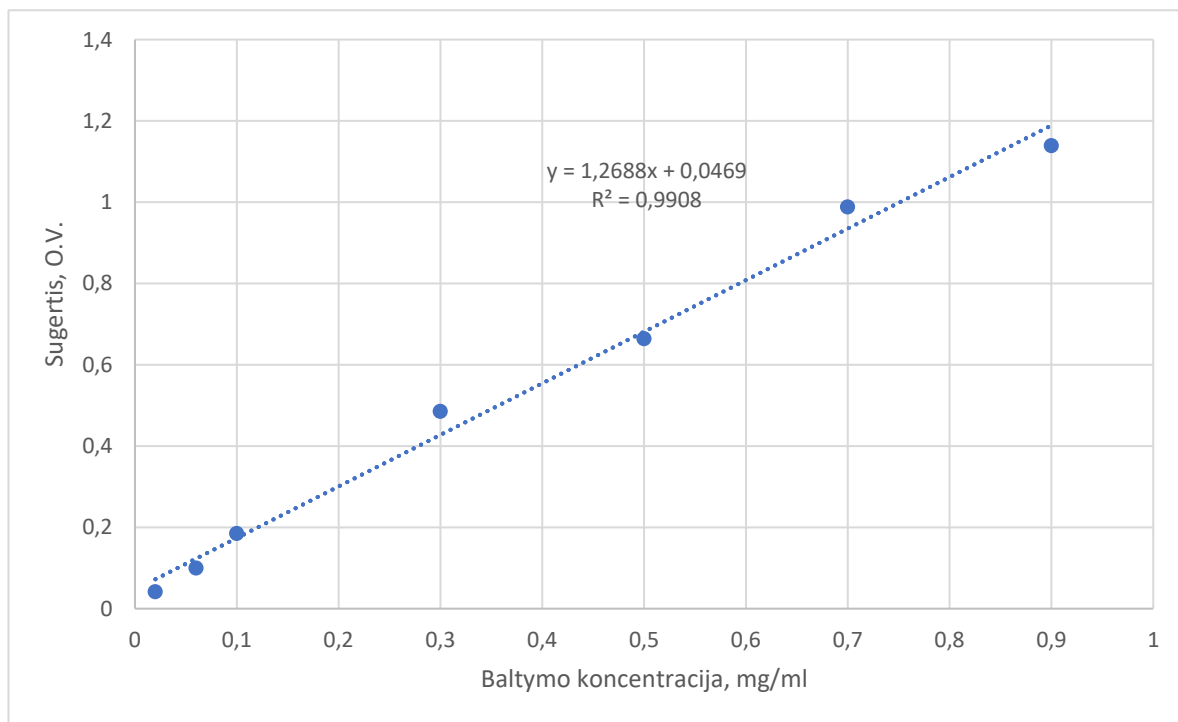
Išgryninus rekombinantinį RodA baltymą ir įvertinus jo grynumą, toliau buvo atliktas koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu. Koncentracijai nustatyti buvo brėžiama JSA kalibracinė kreivė, kuriai sudaryti iš standartinio 1 mg/ml JSA tirpalo buvo paruošti skirtingų koncentracijų mėginiai, sumaišyti su Bradfordo reagentu ir matuoti spektrofotometriškai prie 595 nm bangos ilgio. Matavimų rezultatai buvo apdoroti naudojant „Microsoft Excel“ programinę įrangą. Gauti rezultatai pavaizduoti 1 grafike.

Iš kalibracinės kreivės gauta tiesės lygtis (1), kurią taikant apskaičiuota baltymo RodA koncentracija, pamatavus jo sugertį 595 nm bangos ilgyje.

$$y = 1,2688x + 0,0469 \quad (1)$$

Čia:

- x – baltymo koncentracija, mg/ml
- y – baltymo sugertis 595 nm bangos ilgyje, O.V.



1 grafikas. Kalibracinė kreivė

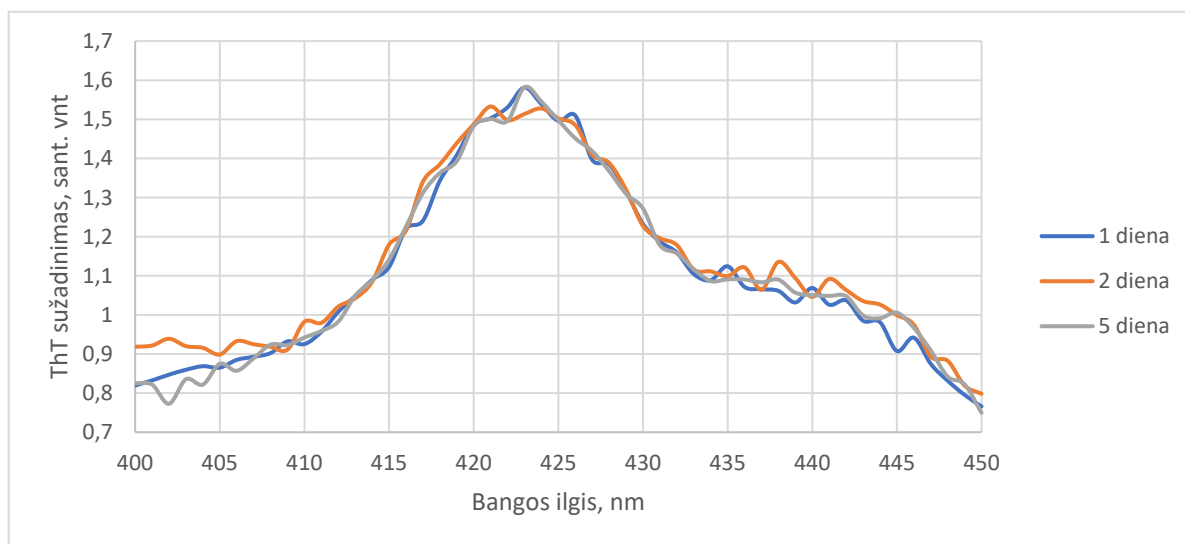
Taikant sudarytos kalibracinės kreivės lygtį ir išmatuotą RodA baltymo sugertį prie 595 nm bangos ilgio, buvo gauta, jog baltymo koncentracija tirpale yra 0,196 mg/ml.

3.5.5. Rekombinantinio baltymo RodA aktyvumo tyrimas naudojant Tioflaviną T

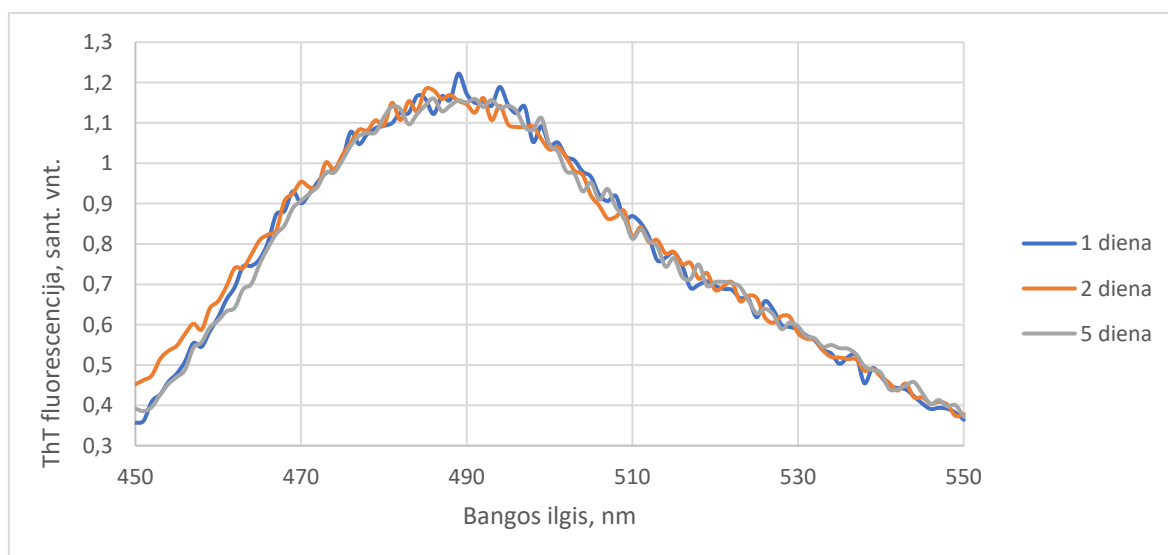
Rekombinantinio baltymo RodA aktyvumo matavimui buvo naudojamas dažas Tioflavinas T (ThT). Šis dažas naudojamas amiloidinių fibrilių tyrimuose. Gera žinoma, jog I klasės hidrofobinai, įskaitant ir baltymą RodA, natyvioje būsenoje geba formuoti į amiloidines fibriles panašias struktūras. Remiantis šia informacija buvo padaryta prielaida, jog jeigu po dializės rekombinantinis baltymas RodA atgavo savo aktyvumą, jis formuos į amiloidus panašias struktūras ir gebės sąveikauti su ThT – matuojant fluorescenciją bus matomas pikas.

Tiriamieji mėginiai savo sudėtyje turėjo 50 µg/ml rekombinantinio baltymo RodA ir 40 µM/ml ThT dažo. Tarp matavimų paruošti mėginiai buvo stipriai kratomi, kad padidėtų oro–tirpalo sąsaja. Hidrofobinas RodA, lygiai taip pat, kaip ir RodB ar RodC pasižymi amiloido formavimuisi būdinga kinetika, o sigmoidinė forma susideda iš trijų fazių: pradinė lag fazė, atitinkanti branduolio susidarymą, po kurios seka greita amiloido susidarymo ir pailgėjimo fazė bei paskutinė – stacionari fazė. RodA ir RodB, kurie tokiomis sąlygomis greitai suformuoja amiloidus, branduolių susidarymo fazė yra beveik nepastebima (Pham et al., 2018).

Fluorescencijos sužadinimas RodA baltymui yra prie 415 nm bangos ilgio, o emisija prie 484 nm bangos ilgio. Matuojant parinktas jautris buvo 600 voltų – parinkus didesnę jautrumą, programa rodė labai aukštą fluorescenciją ir duomenys buvo iškreipti. Matavimai buvo atliekami 3 kartus: mėginių paruošimo dieną, praėjus 17 valandų ir praėjus trims paroms. Sužadavimo ir emisijos spektrai pateikti atitinkamai 2 ir 3 grafikuose:



2 grafikas. ThT sužadavimo spektrai.



3 grafikas. ThT emisijos spektrai.

Išanalizavus gautus spektrus, pastebėti sužadavimo ir emisijos pikų poslinkiai. Kaip minėta, sužadavimo pikas turėjo būti 415 nm, tačiau šių matavimų atveju jis pasislinko ties 423 nm, o emisijos pikas iš 484 nm pasislinko link 489 nm. Remiantis literatūrine analize, šių pikų

poslinkiai nėra reikšmingi ir parodo, jog tirpale buvo susiformavusios fibrilės, kurios sąveikavo su ThT dažu. Pikų pokyčiai, pastebėti per keletą dienų pateikti 13 lentelėje:

13 lentelė. ThT sužadinimo ir emisijos pikų poslinkiai laikui bėgant

	Sužadinimas 423 nm	Emisija 489 nm
1 diena	1,58142	1,22223
2 diena	1,51367	1,15448
5 diena	1,58234	1,15601

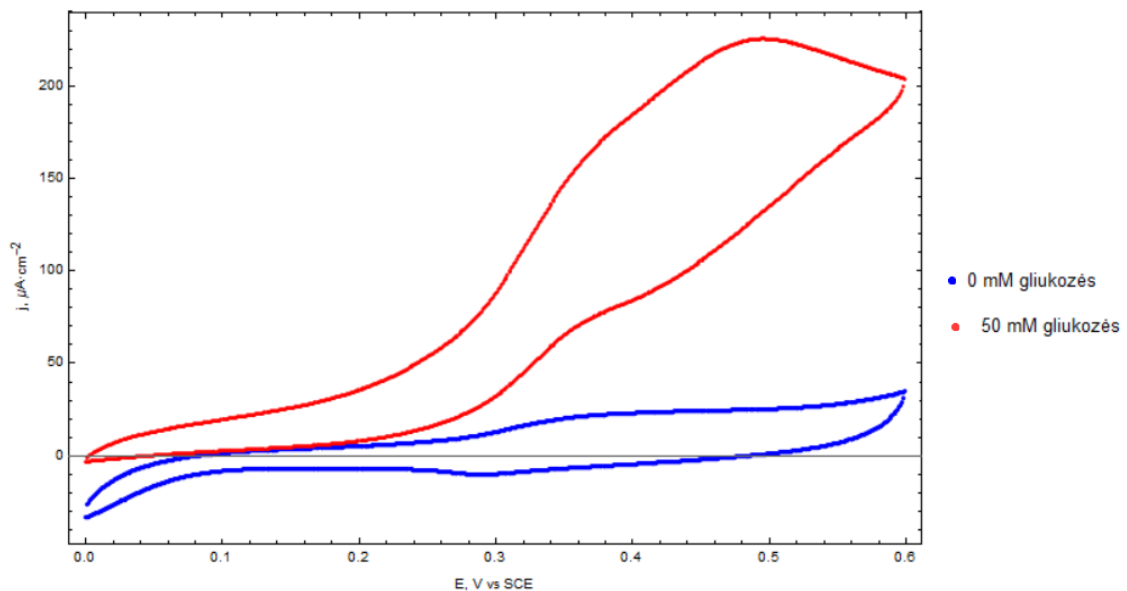
Pagal lentelėje pateiktus pikų pokyčius bėgant laikui matoma, jog mėginio su ThT dažu inkubacija neturėjo įtakos fibrilių formavimuisi. Dėl nežymių skirtumų tarp pikų daroma prielaida, kad inkubacija nepadidino fibrilių kiekio baltymo mėginyje. Nepaisant to, gauti rezultatai parodė, jog baltymas po dializės buvo aktyvus.

3.6. Rekombinantinio baltymo RodA pritaikymas

3.6.1. Gliukozės oksidazės elektrocheminio aktyvumo nustatymas ciklinės voltamperometrijos būdu

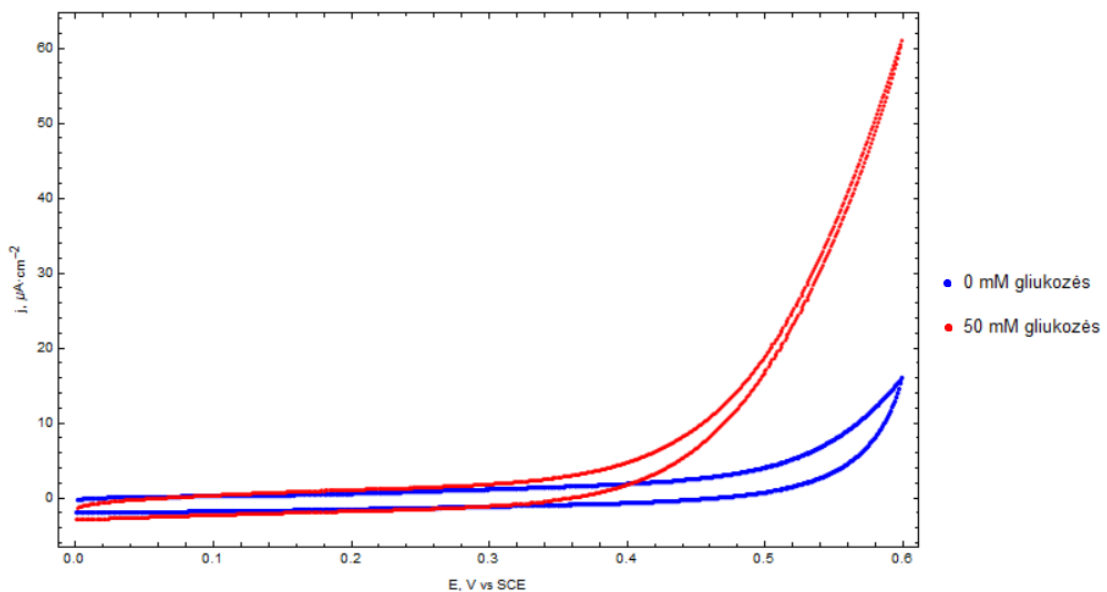
Aukso elektrodas su imobilizuota gliukozės oksidaze (Au/GOx) ir aukso elektrodas su rekombinantiniu RodA baltymu kaip matrica ir imobilizuota gliukozės oksidaze (Au/RodA/GOx) eksperimento metu buvo naudoti fermento elektrocheminio aktyvumo nustatymui ciklinės voltamperometrijos (CV) metodu. Darbiniame 0,1 M fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 6,8), esant 5 mV/s potencialo skleidimo greičiui, potencialo intervale nuo 0 iki 0,6 V buvo atlikta CV analizė.

Iš 29 pav. pateikto CV grafiko matoma, jog buferiniame tirpale be gliukozės oksidazės oksiduojamo substrato, t.y. gliukozės, elektrodas generavo srovę visame potencialo skleidimo intervale, kuri ties 0,6 V vs SCE pasiekė maksimalią $35,39 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovę. Į darbinį tirpalą pridėjus 50 mM gliukozės, Au/GOx biojutiklis pradėjo generuoti didėjančią srovę, kuri ties 0,485 V vs SCE pasiekė maksimalią reikšmę, lygią $224,98 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$. Srovės pokytis, kuris lygus $189,59 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, pastebėtas dėl gliukozės oksidazės substrato oksidacijos.



29 pav. Au/GOx elektrodo CV analizės rezultatai: darbinis buferinis tirpalas be gliukozės ir su 50 mM gliukozės

Au/RodA/GOx elektrodo atveju (30 pav.), kuomet darbiniam buferiniam tirpalui nebuvo gliukozės, potencialo skleidimo intervale nuo 0 iki 0,6 V vs SCE generavo srovę, kurios kilimas pastebėtas ties maždaug 0,45 V vs SCE. Ties 0,6 V vs SCE potencialu pasiekta maksimali $16,11 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovė. Pridėjus į tirpalą 50 mM gliukozės, Au/RodA/GOx biojutiklis potencialo režiuose nuo 0 iki 0,6 V vs SCE generavo srovę, kuri pradeda staigiai kilti ties maždaug 0,3 V vs SCE ir ties 0,6 V vs SCE potencialu pasiekė maksimalią $61,07 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovę. Toks $44,96 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovės padidėjimas pastebėtas dėl to, jog GOx katalizavo gliukozės oksidaciją.

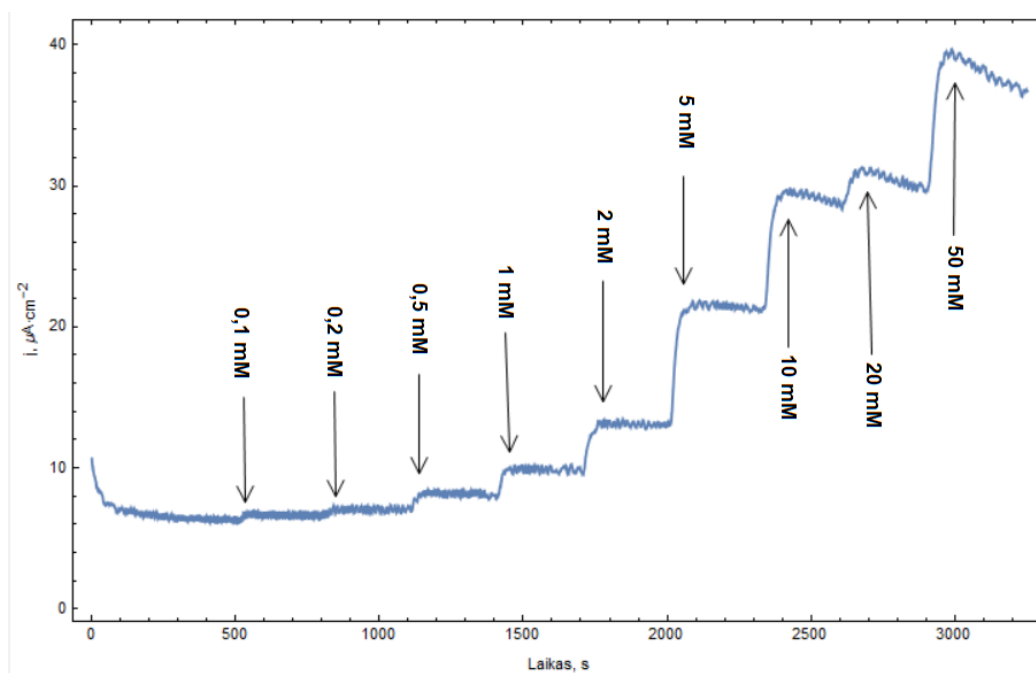


30 pav. Au/RodA/GOx elektrodo CV analizės rezultatai: darbinis buferinis tirpalas be gliukozės ir su 50 mM gliukozės

Tarpusavyje palyginus gautus CV rezultatus Au/GOx ir Au/RodA/GOx elektrodų atveju, pastebima, jog elektrodas su rekombinantiniu RodA baltymu sugeba generuoti pakankamai aukštas sroves. Gautos CV kreivės parodo, jog fermentas sėkmingai imobilizuotas ir yra aktyvus.

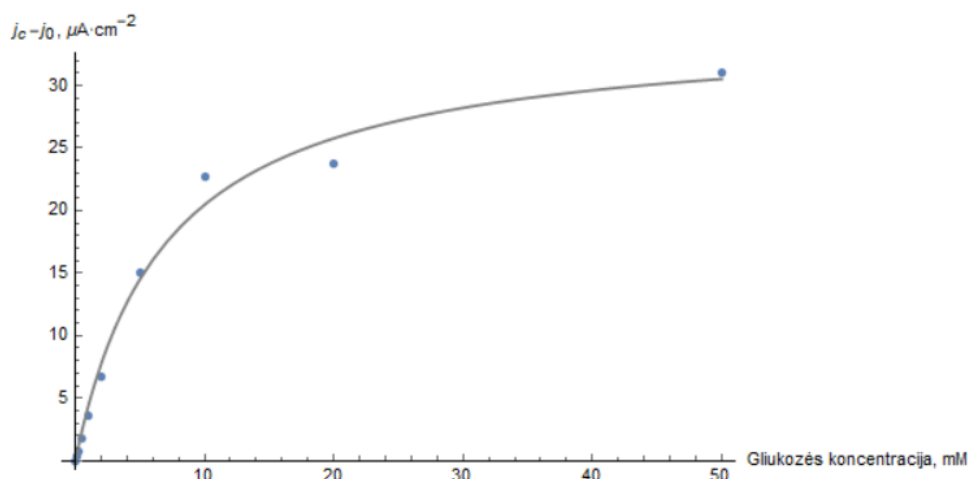
3.6.2. Kinetinių parametrų ir jautrio nustatymas

Au/GOx ir Au/RodA/GOx biojutikliai buvo tiriami chronoamperometrijos (CA) metodu. Tyrimo metu buvo palaikomas fiksuotas 0,4 V vs SCE potencialas. Iš 31 pav. matoma, jog Au/GOx biojutiklis darbiname buferiniame tirpale be gliukozės oksidazės substrato nusistovi ties nekintančia $6,2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ srove. Didinant gliukozės koncentraciją nuo 0 iki 50 mM pastebimas srovės didėjimas. Pridėjus pirmąją gliukozės koncentraciją 0,1 mM pastebimas nežymus srovės padidėjimas nuo $6,2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ iki $6,7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Pasiekus didžiausią, 50 mM gliukozės koncentraciją, Au/GOx generavo $39,6 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ srovę. Šie rezultatai parodo, jog toks srovės pokytis priklauso nuo gliukozės koncentracijos, nes ant elektrodo paviršiaus esanti GOx oksiduoja gliukozę.



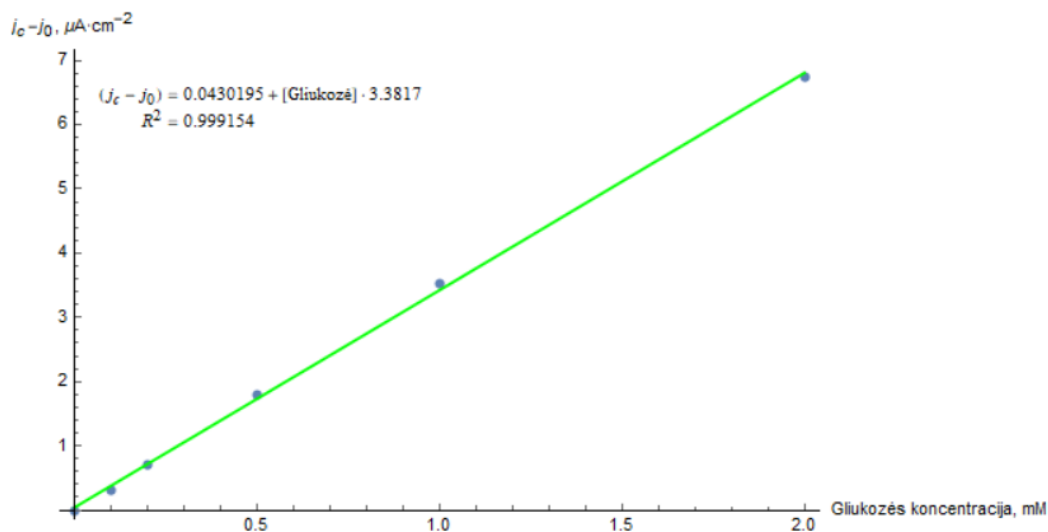
31 pav. Au/GOx biojutiklio generuojamų srovių pokytis laike, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms darbiname tirpale

Iš gautų duomenų gaunamas grafikas (32 pav.), kuriame parodytas biojutiklio Au/GOx generuojamas srovės pokytis priklausomai nuo gliukozės koncentracijos. Surinkti duomenys glodinti Michaelis-Menten modeliu ir nustatyta, jog imobilizuotos GOx ant aukso elektrodo K_M gliukozei yra 6,99 mM ir gali sugeneruoti maksimalią $34,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ srovę (I_{max}).



32 pav. Au/GOx biojutiklio generuojamų srovių pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos dariniame tirpale.

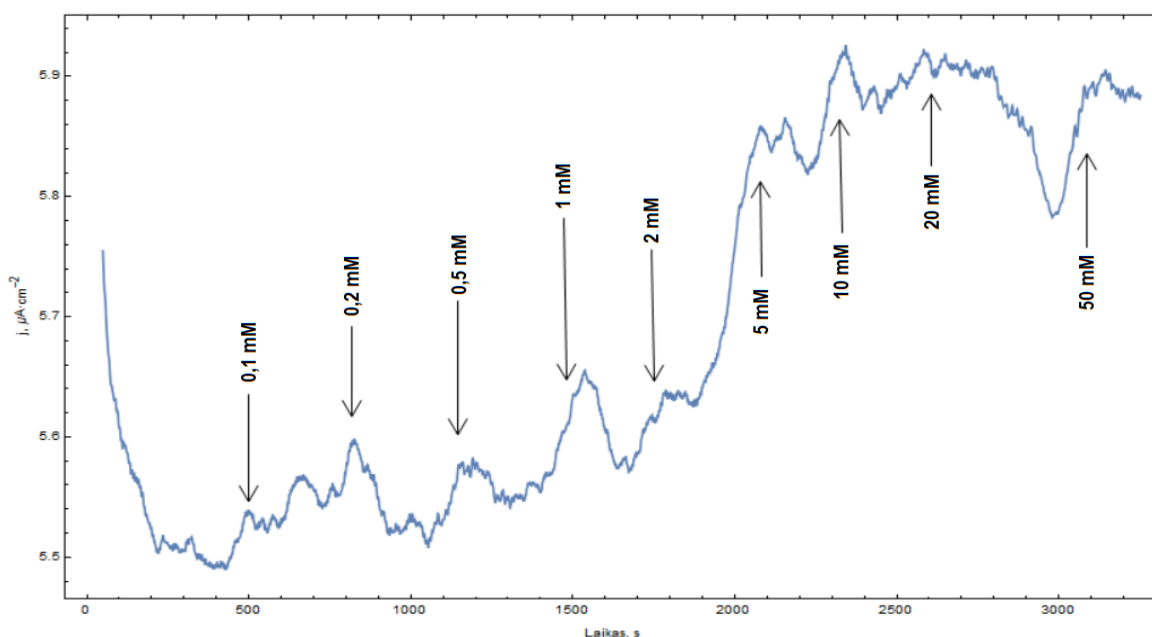
Tyrimo metu taip pat buvo nustatytas ir Au/GOx jautris. Iš srovės kitimo laike duomenų buvo gauta srovės pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (33 pav.). Gautieji duomenys buvo glodinami taikant tiesinį modelį, kur krypties koeficientas yra Au/GOx biojutiklio jautris – $3,38 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$.



33 pav. Au/GOx biojutiklio srovės pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Duomenys glodinti naudojant tiesinį modelį

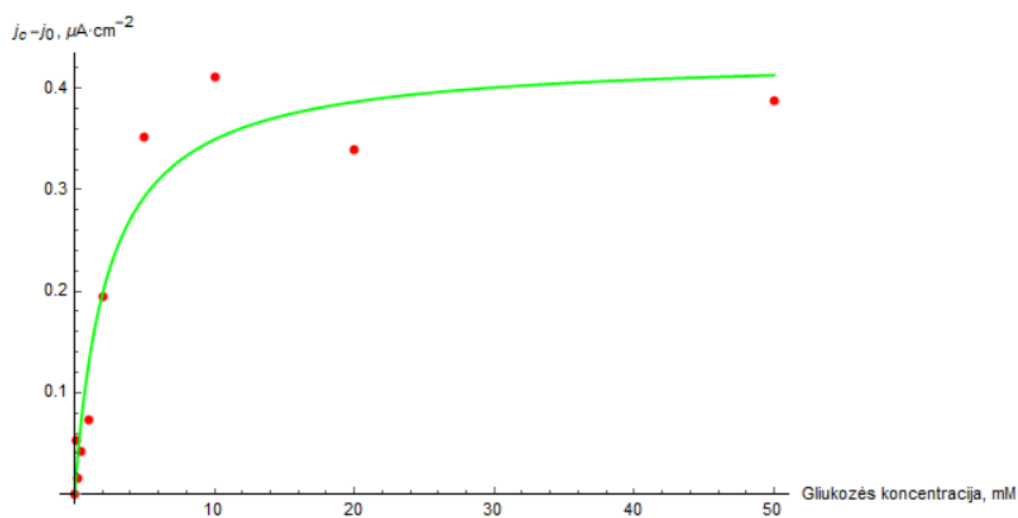
Au/RodA/GOx biojutiklio atveju (34 pav.) srovės nusistovėjimas pastebimas ties 400 sekundžių riba – joje generuojama pastovi $5,4 \mu A \cdot cm^{-2}$ srovė. Kai ir Au/GOx biojutiklio atveju buvo laipsniškai pridėjama gliukozės, kurios koncentracija dariniame buferiniame tirpale svyravo nuo 0 iki 50 mM. Pridėjus 0,1 mM gliukozės, srovės pokytis nepastebėtas. Pridėjus maksimalią, 50 mM gliukozės koncentraciją, biojutiklis generavo $5,9 \mu A \cdot cm^{-2}$ srovę. Toks srovės

pokytis parodo, jog Au/RodA/GOx biojutiklio paviršiuje esanti gliukozės oksidazė sėkmingai oksidavo tirpale esančią gliukozę – srovės pokytis priklausė nuo gliukozės koncentracijos, esančios tirpale.



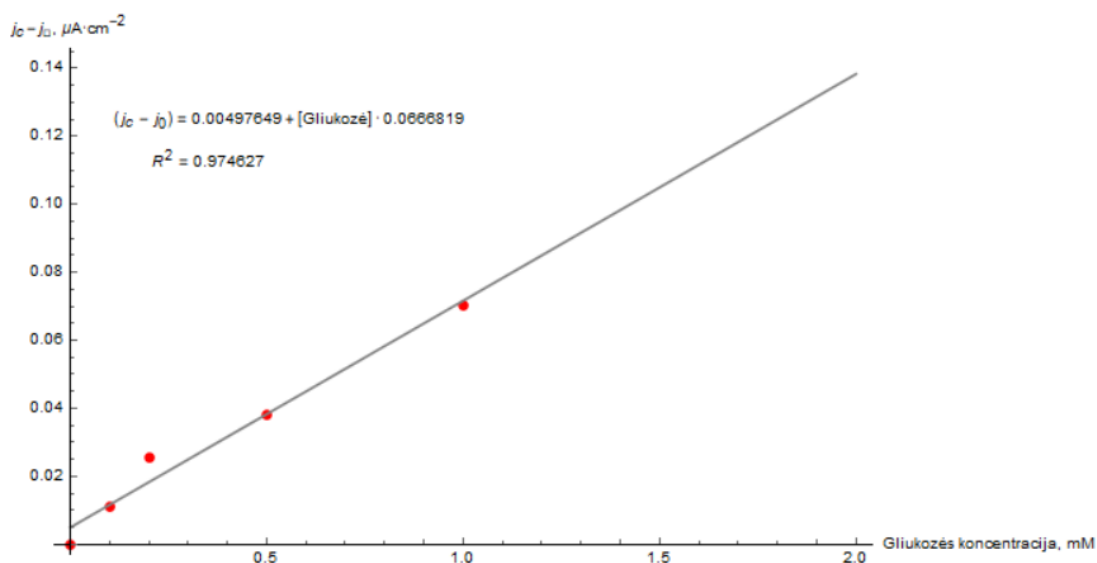
34 pav. Au/RodA/GOx biojutiklio generuojamų srovių pokytis laike, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms dariniame tirpale

Iš gautų srovės kitimo laike duomenų buvo gauta srovės pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (35 pav.). Surinkti duomenys buvo glodinami taikant Michaelis-Menten modelį. Buvo nustatyta, jog imobilizuotos GOx ant Au/RodA/GOx biojutiklio K_M reikšmė lygi 2,37 mM ir gali sugeneruoti maksimalią $0,432 \mu A \cdot cm^{-2}$ srovę (I_{max}).



35 pav. Au/RodA/GOx biojutiklio generuojamų srovių pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos dariniame tirpale

Iš srovės kitimo laike duomenų taip pat buvo gauta srovės pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (36 pav.). Gauti duomenys buvo glodinami pagal tiesinį modelį, kuriame krypties koeficientas yra Au/RodA/GOx biojutiklis jautris – $0,07 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.



36 pav. Au/RodA/GOx biojutiklio srovės pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Duomenys glodinti naudojant tiesinį modelį

Lyginant Au/GOx ir Au/RodA/GOx biojutiklių rezultatus, pastebėta, jog keičiantis gliukozės koncentracijai darbiname tirpale Au/GOx biojutiklis geba sugeneruoti 6,25 karto didesnę maksimalią srovę. Pagal glodintus duomenis naudojant Michaelis-Menten modelį, maksimali generuojama srovė Au/RodA/GOx biojutiklio atveju yra beveik 80 kartų mažesnė. Lyginant jautrį, Au/RodA/GOx biojutiklio atveju jis yra 48 kartais mažesnis. Tiek maksimalios srovės, tiek jautrio žemas reikšmės galima paaiškinti tuo, jog hidrofobinams suformavus monosluoksnį ant aukso elektrodo, sumažėja elektrodo pralaidumas. Taip pat gali būti, jog monosluoksnyje dalis imobilizuotų gliukozės oksidazės molekulių gali būti blokuojamos dėl baltymo konformacinių pokyčių.

Teoriškai laisvos gliukozės oksidazės K_M reikšmė yra apie 2,7 mM. Šiuo atveju, Au/RodA/GOx K_M reikšmė yra geresnė ir siekia 2,37 mM. Kuo žemesnė K_M reikšmė, tuo fermentas yra labiau afiniškas substratui, t.y. fermentui reikalingas mažesnis substrato kiekis, jog jis būtų pilnai prisotintas.

Išvados

1. Molekulinės biologijos metodais identifikuotas *A. fumigatus* sintetinamą hidrofobiną koduojantis atitinkamas genas. Šis *rodA* genas sėkmingai įklonuotas į *E. coli* kamieną.
2. Plazmidė su *rodA* genu raiškos vektoriuje Champion™ pET SUMO sėkmingai transformuota į *E. coli* BL21 (DE3) kamieną, atitinkamas baltymas po indukcijos buvo išgrynintas afininės chromatografijos metodu denatūruojančiomis sąlygomis, atlikta dializė natyviai baltymo struktūrai atkurti. Išgryninto baltymo koncentracija tirpale siekė 0,196 mg/ml.
3. Išgryninto rekombinantinio baltymo RodA su sulietu ubikvitinu dydis siekė 25 kDa, kas atitinka teorinius skaičiavimus. Taikant fluorimetrinius matavimus naudojant Tioflaviną T nustatyta, jog biologiškai aktyvus rekombinantinis RodA baltymas geba formuoti į amiloidines fibriles panašias struktūras. Biologiškai aktyvus baltymas buvo naudotas kaip matrica gliukozės oksidazės imobilizacijai. Parodyta, kad jis padidina šio fermento afiniškumą substratui gliukozei.

Andrijana Danytė

(Parašas)

Literatūros sąrašas

- Alexander, S., & Building, F. (2002). *Hydrophobins and the interactions between fungi and plants*. 3(5), 391–400.
- Ball, S. R., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2019). Hydrophobin Rodlets on the Fungal Cell Wall. In *The Fungal Cell Wall* (pp. 29–51).
- Bayry, J., Aïmanian, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., & Latge, P. (2012). Hydrophobins — Unique Fungal Proteins. *PLoS Pathogens*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002700>
- Bell-Pedersen, D., Dunlap, J. A. Y. C., & Loros, J. J. (1996). *Distinct cis-Acting Elements Mediate Clock, Light, and Developmental Regulation of the Neurospora crassa eas (ccg-2) Gene*. 16(2), 513–521.
- Boeuf, S., Throm, T., Gutt, B., Strunk, T., Hoffmann, M., Seebach, E., ... Richter, W. (2012). Engineering hydrophobin DewA to generate surfaces that enhance adhesion of human but not bacterial cells. *Acta Biomaterialia*, 8(3), 1037–1047. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.022>
- Carpenter, C. E., Mueller, R. J., Kazmierczak, P., Zhang, L., Villalon, D. K., & N. K. Van Alfen. (1992). Effect of a Virus on Accumulation of a Tissue-Specific Cell-Surface Protein of the Fungus Cryphonectria (Endothia) parasitica. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(6).
- Cox, P. W., & Hooley, P. (2009). Hydrophobins: New prospects for biotechnology. *Fungal Biology Reviews*, 23(1–2), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.09.001>
- de Francisco, B. R. (2021). *Self-assembly into functional amyloids of Aspergillus fumigatus hydrophobins*. Sorbonne Université.
- Fricker, M. D., Heaton, L. L. M., Jones, N. S., & Boddy, L. (2017). The Mycelium as a Network. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 335–367. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0033-2017>
- Gow, N. A. R., Latge, J.-P., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>
- Guy, O. J., & Walker, K. D. (2016). Graphene Functionalization for Biosensor Applications. In *Silicon Carbide Biotechnology* (Second Edition). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802993-0/00004-6>
- Hakanpää, J., Paananen, A., Nakari-setälä, T., Parkkinen, T., Penttilä, M., Linder, M. B., & Chem,

- J. B. (2004). Protein Structure and Folding: Atomic Resolution Structure of the HFBII Hydrophobin, a Self-assembling Atomic Resolution Structure of the HFBII Hydrophobin, a Self-assembling Amphiphile. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1). <https://doi.org/10.1074/jbc.M309650200>
- Hakanpää, J., Szilvay, G. R., & Kaljunen, H. (2006). Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI — The structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Science*, 15(9). <https://doi.org/10.1110/ps.062326706.play>
- Han, A. B. W. (2001). Hydrophobins: Multipurpose Proteins. *Annual Review Microbiology*, 55(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.625>
- Hektor, H. J., & Scholtmeijer, K. (2005). Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.05.004>
- Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316–1329. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1316>
- Jensen, B. G., Andersen, M. R., Pedersen, M. H., Frisvad, J. C., & Søndergaard, I. (2010). Hydrophobins from *Aspergillus* species cannot be clearly divided into two classes. *BMC Research Notes*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-344>
- Kallio, J. M., Linder, M. B., & Rouvinen, J. (2007). *Crystal Structures of Hydrophobin HFBII in the Presence of Detergent Implicate the Formation of Fibrils and Monolayer Films*. 282(39), 28733–28739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704238200>
- Kershaw, M. J., & Talbot, N. J. (1998). Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 33(1). <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.1022>
- Khalesi, M., Deckers, S. M., Gebruers, K., Vissers, L., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2012). *Cerevisia* Hydrophobins: Exceptional proteins for many applications in brewery environment and other bio-industries. *Cerevisia*, 37(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2012.04.002>
- Kwan, A. H. Y., Winefield, R. D., Sunde, M., Matthews, J. M., Haverkamp, R. G., Templeton, M. D., & Mackay, J. P. (2006). Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.0505704103>
- Lee, M. J., & Sheppard, D. C. (2016). The Cell Wall Polysaccharides of *Aspergillus fumigatus*. In *Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 147–165). https://doi.org/10.1007/978-3-319-27790-5_8
- Lienemann, M., Gandier, J., Joensuu, J. J., Iwanaga, A., Takatsuji, Y., & Haruyama, T. (2013). Structure-Function Relationships in Hydrophobins: Probing the Role. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 79(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.01493-13>
- Littlejohn, K. A., Hooley, P., & Cox, P. W. (2012). Food Hydrocolloids Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloids*, 27(2). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.018>
- Lo, V. (2018). *Hydrophobins: Biological application of fungal proteins*.
- Mankel, A., Krause, K., & Kothe, E. (2002). Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1408–1413. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1408-1413.2002>
- Mouyna, I., & Fontaine, T. (2014). Cell Wall of *Aspergillus fumigatus*: a Dynamic Structure. In *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis* (pp. 169–183). <https://doi.org/10.1128/9781555815523.ch14>
- Okumura, M., Saiki, M., Yamaguchi, H., & Hidaka, Y. (2011). Acceleration of disulfide-coupled protein folding using glutathione derivatives. 278(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08039.x>
- Opwis, K., & Gutmann, J. s. (2011). Surface modification of textile materials with hydrophobins. *Textile Research Journal*, 81(15), 1594–1602. <https://doi.org/10.1177/0040517511404599>
- Pearson, W. R. (2013). *An Introduction to Sequence Similarity (“ Homology ”) Searching*. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>
- Pille, A., Kwan, A. H., Cheung, I., Hampsey, M., Aimaganianda, V., Delepierre, M., ... Guijarro, J. I. (2015). 1H, 13C and 15N resonance assignments of the RodA hydrophobin from the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Biomolecular NMR Assignments*, 9(1). <https://doi.org/10.1007/s12104-014-9555-1>
- Rambaran, R. N., & Serpell, L. C. (2008). Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion*, 2(3), 112–117. <https://doi.org/10.4161/pri.2.3.7488>
- Ribitsch, D., & Guebitz, G. M. (2021). Tuning of adsorption of enzymes to polymer. In *Enzymatic Plastic Degradation* (1st ed., Vol. 648). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.010>
- Rillig, M. C. (2001). *Polymers and microorganisms*.
- Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2017). A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
- Sanders, W. B. (2002). The Mycota. In *The Bryologist* (Vol. 105). [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(2002\)105\[0502:\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(2002)105[0502:]2.0.co;2)
- Sanna, A. (2006). Characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobins HFBI and HFBII.

- Scézi, À. (1999). Origins, Phylogenies and Relationships in the Fungal Kingdom. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 46(2–3), 175–179.
- Stajich, J. E., Kahmann, R., Boone, C., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Klein, B. S., ... Cowen, L. E. (2020). Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. *MBio*, 11(3).
- Steinberg, G., Peñalva, M. A., Riquelme, M., Wösten, H. A., & Harris, S. D. (2017). Cell Biology of Hyphal Growth. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0034-2016>
- Stenbæk, J. (2015). *Bio-Sustainable Control of the Blue Stain Fungi Aureobasidium pullulans on Exterior Wood Coatings*.
- Sugui, J. A., Kwon-Chung, K. J., Juvvadi, P. R., Latgé, J. P., & Steinbach, W. J. (2015). *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019786>
- Sunde, M., Kwan, A. H. Y., Templeton, M. D., Beever, R. E., & Mackay, J. P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron*, 39(7), 773–784. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.08.003>
- Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., & Blake, C. C. F. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Journal of Molecular Biology*, 273(3), 729–739. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1348>
- Tekaia, F., & Latgé, J. P. (2005). *Aspergillus fumigatus*: Saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.017>
- Thomson, C. A., Olson, M., Jackson, L. M., & Schrader, J. W. (2012). A Simplified Method for the Efficient Refolding and Purification of Recombinant Human GM-CSF. 7(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049891>
- Tycko, R. (2004). Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(1), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.12.002>
- Valsecchi, I., Dupres, V., Stephen-Victor, E., Guijarro, J. I., Gibbons, J., Beau, R., ... Beauvais, A. (2018). Role of hydrophobins in *aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 4(1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof4010002>
- Van Bael, S. A. (2020). Fungal diversity. *Diversity*, 12(11), 1–2. <https://doi.org/10.3390/d12110437>
- Wessels, J. G. H. (1997). *Hydrophobins: Proteins that Change the Nature of the Fungal Surface* (Vol. 38).
- Wilson, A. M., Gabriel, R., Singer, S. W., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2021). Doing it

- alone: Unisexual reproduction in filamentous ascomycete fungi. *Fungal Biology Reviews*, 35, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.12.003>
- Wösten, H. A. B., & Scholtmeijer, K. (2015). Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1587–1597. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6319-x>
- Wosten, H. A. B., Schuren, F. H. J., & Wessels, J. G. H. (1994). *Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces*. 13(24), 5848–5854. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06929.x>
- Zhao, Z., Wang, H., Qin, X., Wang, X., Qiao, M., Anzai, J., & Chen, Q. (2009). Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.011>