

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.932>

<https://orcid.org/0000-0002-3638-4216>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Sigitas Palikša

Kryptingas M-MuLV atvirkštinės
transkriptazės savybių keitimas taikant
kompartmentalizuotų ribosominių
kompleksų metodą

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2008 – 2012 metais studijuojant doktorantūroje Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute, dirbant UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centre ir vėliau savarankiškai. Mokslinius tyrimus rėmė UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“. **Disertacija ginama eksternu.**

Moksliniai konsultantai:

dr. Remigijus Skirgaila (UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“, gamtos mokslai, biochemija – N 004)

dr. Giedrius Sasnauskas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – dr. Mindaugas Zaremba (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

dr. Rūta Gerasimaitė (Makso Planko institutas, Vokietija, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

prof. dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

prof. dr. Saulius Serva (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

dr. Giedrius Vilkaitis (Vilniaus universitetas Gyvybės mokslų centras, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2026 m. birželio mėn. 3 d. 13 val. Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 223 4377; el. paštas info@gmc.vu.lt

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.932>

<https://orcid.org/0000-0002-3638-4216>

VILNIUS UNIVERSITY

Sigitas Palikša

Directed Evolution of the M-MuLV Reverse Transcriptase using the Compartmentalized Ribosome Display

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2008 and 2012 while studying at the former Institute of Biotechnology, Vilnius University, and working at the Research and Development department at UAB Thermo Fisher Scientific Baltics, and later individually. The research was supported by UAB Thermo Fisher Scientific Baltics.

The dissertation is defended on an external basis.

Academic Consultants:

Dr. Remigijus Skirgaila (UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Dr. Giedrius Sasnauskas (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Dissertation Defence Panel:

Chairman – Dr. Mindaugas Zaremba (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004)

Members:

Dr. Rūta Gerasimaitė (Max Planck Institute, Germany, Natural Sciences, Biochemistry, N 004),

Prof. Dr. Rolandas Meškys (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004),

Prof. Dr. Saulius Serva (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004),

Dr. Giedrius Vilkaitis (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1 pm on June 3th in Room R401 of the Life sciences center, Vilnius University. Address: Sauletekio ave. 7, Vilnius, Lithuania, Phone: +370 5 223 4377; E-mail info@gmc.vu.lt

SANTRUMPOS

AMV	– paukščių mieloblastozės virusas (<i>angl. avian myeloblastosis virus</i>)
AT	– atvirkštinė transkriptazė
BSA	– jaučio serumo albuminas (<i>angl. bovine serum albumin</i>)
cpm	– registruotų signalų skaičius per minutę (<i>angl. counts per minute</i>)
CRD	– kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodas (<i>angl. compartmentalized ribosome display</i>)
CSR	– autoreplikacija kompartmentuose (<i>angl. compartmentalized self-replication</i>)
dNTP	– deoksinukleozidų 5'–trifosfatai
DTT	– ditiotreitolis
EDTA	– etilendiamintetraacto rūgštis
FIV	– kačių imunodeficito virusas (<i>angl. feline immunodeficiency virus</i>)
FLV	– kačių leukemijos virusas (<i>angl. feline leukemia virus</i>)
kDNR	– kopijinė DNR
K_m	– Michaelio konstanta
M-MuLV	– pelių Moloney leukemijos virusas (<i>angl. Moloney murine leukemia virus</i>)
mRNR	– matricinė RNR
Ni-NTA	– nikelio - nitrilotriacto rūgštis
PACE	– fagų raiška pagrįstas nuolatinės evoliucijos metodas (<i>angl. phage assisted continuous evolution</i>)
PANCE	– fagų raiška pagrįstas nenuolatinės evoliucijos metodas (<i>angl. phage assisted non-continuous evolution</i>)
PE	– genų redagavimo kompleksas (<i>angl. prime editing</i>)
PDB	– baltymų struktūrų duomenų bazė (<i>angl. protein data bank</i>)
RMSD	– atstumų kvadratinis vidurkis (<i>angl. root mean square deviation</i>)
RNazė H	– ribonukleazė H
SD	– standartinis nuokrypis (<i>angl. standard deviation</i>)
SIV	– beždžionių imunodeficito virusas (<i>angl. simian immunodeficiency virus</i>)
TAE	– Tris acetato EDTA buferis
tRNR	– transportinė RNR

- UMI – unikalus molekulinis žymuo (*angl. unique molecular identifier*)
- WT – laukinis tipas (*angl. wild type*)
- XMRV – ksenotropinis pelių leukemijos virusas (*angl. Xenotropic murine leukemia-virus related virus*)
- ŽIV – žmogaus imunodeficitinio virusas

TURINYS

ĮVADAS.....	10
MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ VERTĖ.....	15
1 LITERATŪROS APŽVALGA.....	17
1.1 Pelių Moloney leukemijos viruso (M-MuLV) atvirkštinės transkriptazės struktūra ir funkcija	17
1.1.1 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės vaidmuo viruso replikacijoje	17
1.1.2 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės struktūrinės ypatybės.....	24
1.1.3 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės biocheminės savybės.....	31
1.2 Baltymų <i>in vitro</i> evoliucijos metodų apžvalga	38
1.2.1 <i>In vivo</i> ir <i>in vitro</i> atrankos metodų samprata	39
1.2.2 Bibliotekos ruošimo būdai.....	40
1.2.3 Baltymų <i>in vitro</i> evoliucijos pagrindinės strategijos	46
1.2.4 Kryptingas atvirkštinių transkriptazių savybių keitimas	65
2 MEDŽIAGOS IR METODAI.....	71
2.1 Prietaisai ir priemonės	71
2.2 Medžiagos.....	71
2.3 Metodai.....	73
2.3.1 Vektoriaus konstravimas	73
2.3.2 mRNR ruošimas <i>in vitro</i> transliacijai	74
2.3.3 kDNR padauginimas ir PGR fragmentų ruošimas atrankos eksperimentui.....	75
2.3.4 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų bibliotekos ruošimas.....	76
2.3.5 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų sekų nustatymas	77
2.3.6 Taškinių ir daugybinių M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų ruošimas.....	77
2.3.7 Baltymų gryninimas ir charakterizavimas	78

2.3.8	M-MuLV atvirkštinės transkriptazės aktyvumo matavimas	79
2.3.9	Kopijinės DNR sintezės skirtingose temperatūrose matavimas.....	79
2.3.10	Kopijinės DNR sintezės greičio matavimas	79
2.3.11	Tričiu žymėtos RNR sintezė ir gryninimas	80
2.3.12	Keturnario komplekso sintezė ir gryninimas	80
2.3.13	Keturnario komplekso disociacijos matavimas	81
2.3.14	Emulsijos ruošimas ir kDNR sintezė.....	81
2.3.15	kDNR gryninimas.....	82
2.3.16	Atvirkštinių transkriptazių tikslumo matavimas.....	82
2.3.17	Atvirkštinių transkriptazių termostabilumo matavimas.....	84
2.3.18	Sąveikos su substratu stiprumo nustatymas.....	85
2.3.19	kDNR sintezės efektyvumo matavimas.....	86
2.3.20	Procesyvumo matavimas	86
2.3.21	Kinetinė polimerazės reakcijos analizė	88
2.3.22	RNazės H aktyvumo matavimas.....	89
2.3.23	Duomenų analizė	89
2.3.24	Pilno ilgio M-MuLV atvirkštinės transkriptazės modelio kūrimas ir validavimas.....	89
3	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	91
3.1	Metodo savybių tyrimas	91
3.1.1	Keturnario komplekso stabilumo tyrimas.....	93
3.1.2	Principinis atrankos eksperimentas.....	95
3.2	Termostabilių M-MuLV AT mutantų atranka ir savybių tyrimas ...	97
3.2.1	Termostabilių M-MuLV AT mutantų atrankos rezultatai ..	98
3.2.2	Atrinktų mutantų aktyvumo skirtingose temperatūrose palyginimas.....	101
3.2.3	kDNR sintezė skirtingose temperatūrose naudojant atrinktus mutantus.....	102

3.2.4	Taškinių mutantų aktyvumo skirtingose temperatūrose palyginimas.....	103
3.2.5	Taškinių mutantų biocheminių savybių palyginimas	107
3.2.6	Daugybinių M-MuLV AT mutantų konstravimas ir apibūdinimas.....	110
3.3	Mažose dNTP koncentracijose veikiančių M-MuLV mutantų atranka ir savybių tyrimas	117
3.3.1	Mažose dNTP koncentracijose veikiančių M-MuLV mutantų atrankos rezultatai.....	117
3.3.2	Atrinktų M-MuLV mutantų RNazės H aktyvumas	120
3.3.3	Atrinktų M-MuLV mutantų kinetinė analizė pusiausvyros sąlygomis.....	120
3.3.4	Polimerazės aktyvaus centro mutantų procesyvumas ir sąveikos su substratu stiprumas.....	121
3.3.5	7,5 kb ilgio kDNR sintezės tyrimas.....	122
3.3.6	kDNR sintezės tikslumas.....	124
3.4	Rezultatų aptarimas	125
	IŠVADOS.....	142
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	143
	PADĖKA.....	163
	SUMMARY	164
	DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ DARBŲ SĄRAŠAS	219
	GYVENIMO IR MOKSLINĖS VEIKLOS APRAŠYMAS.....	221

ĮVADAS

Šiuolaikinė medicina, pramonė ir gamtos mokslai būtų neįsivaizduojami be gausybės baltymų panaudojimo. Baltymai išgaunami iš pačių įvairiausių šaltinių – nuo neląstelinių virusinių gyvybės formų iki žinduolių. Nepaisant to, gamtoje aptinkamas baltymų repertuaras nėra pakankamas. Daugumai metodų, produktų ar technologijų, taikomų minėtose srityse, reikalingi baltymai, pasižymintys pakeistomis ar pagerintomis savybėmis, kurios skiriasi nuo gamtinių, o kartais reikalingos visiškai naujos savybės. Dėl šios priežasties per keletą pastarųjų dešimtmečių mokslininkų pastangomis sukurta gausybė baltymų savybių keitimo būdų.

Išskiriamos dvi baltymų modifikacijos kryptys – cheminė ir genetinė. Taikant cheminio tipo modifikaciją, gali būti panaudojamos kai kurių aminorūgščių šoninės grandinės, taip pat baltymo N ir C galinės aminorūgštys. Tokiais būdais galima prijungti didelę įvairovę funkcinų grupių, kurios keičia baltymo biochemines savybes arba sudaro sąlygas tolesnei modifikacijai prijungiant norimus ligandus. Bene dažniausiai modifikuojama yra lizino, cisteino bei aromatinių aminorūgščių šoninėse grandinėse esančios funkcinės grupės (1). Naudojant šio tipo modifikaciją gali būti sudėtinga pažymėti tam tikras aminorūgščių pozicijas, ypač kai modifikuojamos dažnai pasitaikančios aminorūgštys. Cheminio tipo modifikacijai taip pat priskiriamas baltymų savybių keitimas įjungiant nekanonines aminorūgštis. Šiuo atveju pasitelkiamas baltymų transliacijos mechanizmas. Pasirinktose pozicijose įvedus STOP kodonus, vietoje jų įjungiamos gamtoje nesančios aminorūgštys ir taip išplečiamas biocheminių savybių spektras ar keičiamas baltymų specifiškumas. Visose kitose pozicijose baltymą koduojančio geno seka lieka nepakitusi.

Genetinei baltymų modifikacijos kryptčiai priskiriami visi metodai, kurie pagrįsti baltymą koduojančio geno sekos pakeitimu. Egzistuoja dvi genetinio baltymų savybių keitimo strategijos – racionalus dizainas ir kryptinga evoliucija. Racionalus dizainas, arba specifinė mutagenėzė (*angl. site-specific mutagenesis, site-directed mutagenesis*) yra modifikacijos būdas, suteikiantis galimybę pakeisti norimas iš anksto numatytas pozicijas baltymo sekoje ir gauti reikiamomis savybėmis pasižyminčius baltymus. Norint sėkmingai taikyti šį metodą, dažniausiai reikia turėti detalios informacijos apie tikslinio baltymo ar jo homologų struktūros ir funkcijos ryšį.

Pastaraisiais metais tobulinami mašininiai mokymusi pagrįsti skaičiuojamosios biologijos metodai leidžia sukurti modelius, prognozuojančius įvairių aminorūgščių pakeitimų poveikį baltymo

stabilumui, aktyvumui ar kitoms savybėms (2,3). Sėkmingai veikiantiems modeliams reikalingas didelis jau sukauptų žinių bagažas, susidedantis iš eksperimentiškai patvirtintų duomenų apie įvairių taškinių ir daugybinių mutacijų poveikį baltymų savybėms. Apie kai kuriuos baltymus tokios informacijos nėra daug, todėl mašininio mokymusi paremtas baltymų savybių keitimas kol kas sunkokai realizuojamas. Vis dėlto tyrimai šioje srityje vystosi dideliais tempais ir tikėtina, jog ateityje mašininio mokymusi pagrįsti metodai taps pagrindiniu baltymų savybių keitimo įrankiu. Kaip to patvirtinimas yra 2024 metų Nobelio chemijos srities premija, komiteto sprendimu paskirta D. Baker už indėlį į baltymų skaičiuojamosios biologijos sritį bei D. Hassabis ir J. Jumper už baltymų struktūrų prognozavimo įrankį Alphafold (4).

Palyginus su racionaliū dizainu, visiškai kitokiu principu yra pagrįsta kryptingos evoliucijos, dar vadinamos *in vitro* evoliucija, strategija. Atliekant kryptingos evoliucijos eksperimentą, daugeliu atvejų nėra būtina detali informacija apie baltymo struktūrą ar funkciškai svarbių aminorūgščių pozicijas, o pagrindinė užduotis yra sudaryti tokias sąlygas, kuriomis būtų išlaikomas genotipo – fenotipo ryšys ir sukliamas evoliucinis spaudimas, leidžiantis atrinkti pageidaujamomis savybėmis pasižyminčius mutantus. Tokiu būdu kryptingos evoliucijos eksperimentas atkartoja natūraliai gamtoje vykstančius evoliucijos procesus. Evoliucijos varomoji jėga yra pasikartojantys kintamumo, atrankos ir paveldimumo ciklai. Šis principas galioja ne tik klasikinėje Darvinistinėje evoliucijos sampratoje, tačiau gali būti perkeliamas ir į molekulinį lygį bei pritaikomas pageidaujamoms baltymų funkcijoms atrinkti.

Istorinėmis *in vitro* evoliucijos metodo ištakomis yra laikomas 1967 metais publikuotas Špygelmano (Sol Spiegelman) ir kolegų atliktas eksperimentas, kurio metu buvo pademonstruotas molekulių evoliucijos principas. Daug sykių kartojant bakteriofago RNR padauginimą *in vitro* sąlygomis, RNR molekulė sutrumpėjo daugiau nei 20 kartų, tačiau išlaikė minimalią struktūrą, būtiną amplifikacijai (5). Prabėgus daugiau nei pusei šimtmečio, sukurta gausybė kryptingos evoliucijos metodų, kuriuos galima išskirstyti į dvi grupes – didelės apimties patikros (*angl. high throughput screening*) ir atrankos (*angl. selection*).

Didelės apimties patikros metodų pagrindinis bruožas yra visų biblioteką sudarančių narių patikrinimas, ieškant reikalingomis savybėmis pasižyminčių mutantų. Anksčiau tokio tipo patikra buvo daug reagentų ir laiko sąnaudų reikalaujantis procesas, tačiau pastaraisiais dešimtmečiais sparčiai besivystanti mikroskopsčių technologija leido reikšmingai atpiginti mikrolašelių gamybos ir rūšiavimo įrangą bei padidinti jos efektyvumą (6,7).

Alternatyva didelės apimties patikros principui yra atranka pagrįsti metodai. Vykdam atrankos eksperimentą, nėra reikalo tikrinti visus mutantinių baltymų biblioteką sudarančius narius, tačiau būtina sudaryti tokias sąlygas, kad išliktų reikiamomis savybėmis pasižymintys variantai. Išskiriami trijų tipų atrankos metodai, priklausomai nuo to, koku principu yra susiejamas genotipas ir fenotipas – kovalentiniu ryšiu, nekovalentiniu ryšiu, arba *in vitro* kompartmentalizacijos būdu.

Tarp atrankos metodų svarbią reikšmę užima metodai, kuriems būdingas mutantinių baltymų bibliotekos susiejimas su juos koduojančiais genais kovalentiniu ar nekovalentiniu ryšiu ir, dažnai atvejais, baltymų bibliotekos eksponavimas ant biologinių struktūrų paviršiaus. Šiai grupei priskiriami fagų raiškos (*angl. phage display*), ribosominių kompleksų arba ribosomų raiškos (*angl. ribosome display*), mRNR ir DNR raiškos (*angl. mRNA display, DNA display*) metodai. Šių technologijų reikšmę liudija ir 2018 metų Nobelio premija chemijos srityje, paskirta F. Arnold už didelės apimties patikros principu pagrįstus tyrimus bei G. Smith bei G. Winter už fagų raiškos metodo išvystymą (8).

Daug sėkmingų kryptingos evoliucijos eksperimentų atlikta pasitelkiant ribosominių kompleksų metodą, kurio savybės gerai tinka atrinkti baltymams, pasižymintiems padidintu sąveikos su taikiniu stiprumu ir specifiskumu. Nors naudojant ribosominių kompleksų metodą buvo sukurta gausybė įvairios paskirties antikūnų, pasižyminčių didelio stiprumo specifine sąveika su antigenu (9), iš esmės šį metodą galima taikyti įvairių baltymų sąveikos su ligandais keitimui, įskaitant ir DNR ar RNR polimerazių sąveiką su substratu. Pastaruoju atveju svarbu pažymėti, kad vien tik didinant fermento sąveikos su nukleorūgštimis stiprumą, negalima tikėtis atrinkti optimaliomis savybėmis pasižyminčio mutanto, kadangi tinkamas susirišimas su substratu yra tik viena iš daugelio savybių, reikalingų efektyviai veikiančiai polimerazei. Dėl šios priežasties kryptingos evoliucijos eksperimentas turėtų būti vykdomas taikant sąlygas, kuo tiksliau sutampančias su tomis, kuriose naudojamas tikslinis baltymas.

Ribosominių kompleksų metodo atveju, mutantinis baltymas yra keturnario komplekso sudėtyje susirišęs su ribosoma, tRNR bei baltymą koduojančia mRNR, todėl jo sąveika su substratu gali būti stipriai apribota. Norint pasiekti, kad baltymas galėtų laisvai tirpale sąveikauti su substratu, reikėtų suardyti kompleksą, tačiau tuomet būtų prarasta sąsaja tarp konkretaus mutantinio baltymo ir jį koduojančios mRNR.

Šią užduotį pavyko išspręsti Thermo Fisher Scientific Baltics (tuometinės įmonės UAB „Fermentas“) Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės

plėtos centro mokslininkų komandai, vadovaujant dr. R. Skirgailai. Mutantinių baltymų biblioteka, esanti keturnario komplekso sudėtyje buvo patalpinta į kompartmentus, suformuojant emulsiją, sudarytą iš vandens lašelių alyvoje. Suformuojamų lašelių skaičius parenkamas taip, kad į vieną lašelį patektų tik viena mutantinio baltymo molekulė, esanti komplekso sudėtyje, arba lašelis liktų tuščias. Suardžius keturnarį kompleksą, baltymas gali laisvai sąveikauti su substratu, o genotipo – fenotipo ryšys išlaikomas fizinio barjero dėka. Tokiu būdu apjungiant aukščiau aprašytą ribosomų raiškos metodą ir *in vitro* kompartmentalizacijos technologiją, buvo sukurtas kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodas. Eksperimentų rezultatus publikuojant tarptautinėje mokslinėje spaudoje, metodui pavadinti buvo pasirinktas CRD (*angl. compartmentalized ribosome display*) pavadinimas.

Šiame darbe buvo pademonstruotos kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodo galimybės. Pirmiausia buvo ištirtos paties metodo savybės – išbandytas ribosomų raiškos būdu paruošto keturnario komplekso stabilumas įvairiose sąlygose bei nustatytas prasiturtinimo koeficientas, parodantis, kuri dalis funkciškai neaktyvių atvirkštinės transkriptazės mutantų pašalinama atliekant vieną atrankos ciklą. Toliau buvo atliktas evoliucijos eksperimentas, kiekvieno atrankos etapo metu didinant atvirkštinės transkripcijos reakcijos temperatūrą. Tokiu būdu gauta termostabilių M-MuLV AT mutantų kolekcija, ištirtos atrinktų AT variantų biocheminės savybės. Kitame evoliucijos eksperimente buvo sudarytos sąlygos, kuriose turėjo būti atrenkami AT variantai, efektyviai sintetinantys kDNR molekulę, esant mažoms dNTP koncentracijoms. Atlikus septynis atrankos ciklus buvo ištirtos atrinktų mutantų biocheminės savybės ir nustatytas ryšys tarp eksperimento metu suformuotų evoliucinio spaudimo sąlygų ir įgytų mutacijų.

DARBO TIKSLAS:

Pritaikyti kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodą M-MuLV atvirkštinės transkriptazės savybių keitimui bei nustatyti ryšį tarp sukuriamo evoliucinio spaudimo ir atrinkamų mutantų savybių.

UŽDAVINIAI:

1. Ištirti kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodo savybes: nustatyti keturnario komplekso stabilumą ir praturtinimo koeficientą.
2. Įvykdyti termostabilių M-MuLV AT mutantų atranką ir ištirti atrinktų mutantų savybes.
3. Įvykdyti mažoje dNTP koncentracijoje veikiančių M-MuLV AT mutantų atranką ir ištirti atrinktų mutantų savybes.

GINAMIEJI TEIGINIAI:

1. Kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodas yra tinkamas kryptingam M-MuLV atvirkštinės transkriptazės savybių keitimui, nes sudaro galimybes laisvai sąveikauti baltymui ir substratui eksperimento metu bei leidžia analizuoti dideles mutantų bibliotekas.
2. Atrankos eksperimento metu mutantų biblioteka palaipsniui praturtina labiausiai evoliucinio spaudimo sąlygas atitinkančiais nariais. Tokiu būdu vyksta prisitaikymas prie pasikeitusios aplinkos, panašus į gamtoje vykstančius procesus.

MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ VERTĖ

Šiame darbe buvo naudojamas kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodas, sukurtas Thermo Fisher Scientific Baltics (tuometinės įmonės UAB „Fermentas“) Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centro laboratorijoje, apjungiant dvejų iš anksčiau žinomų technologijų – ribosomų raiškos ir *in vitro* kompartmentalizacijos savybes.

Vykdam šį darbą, pademonstruotos metodo galimybės keisti M-MuLV atvirkštinės transkriptazės, t.y. nuo RNR priklausomos DNR polimerazės savybes. Ribosomų raiškos technologija, kurios pagrindu buvo sukurtas kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodas, dažniausiai taikoma baltymų, pasižyminčių stipresne sąveika su substratu atrankai. Tuo tarpu vykdam šį tyrimą buvo pademonstruota galimybė keisti ne tik sąveikos su substratu stiprumą, bet ir kinetines fermento savybes, tokias kaip K_m vertė.

Atlikus eksperimentą, skirtą termostabilių atvirkštinės transkriptazės variantų atrankai, šalia žinomų mutacijų buvo aptikta gausybė naujų iki šiol neištyrinėtų aminorūgščių pakeitimų, iš kurių dauguma pasižymėjo padidinta sąveika su RNR/DNR substratu ir tokiu būdu padidino baltymo stabilumą aukštesnėse temperatūrose. Didžiausią reikšmę termostabilumui turinčios mutacijos buvo panaudotos gerai žinomų ir plačiai naudojamų komercinių atvirkštinių transkriptazių kūrimui.

Kitame eksperimente buvo sudarytos sąlygos, kuriose turėjo išlikti atvirkštinės transkriptazės mutantai, sugebantys sintetinti kDNR esant mažoms dNTP koncentracijoms. Didžioji dalis eksperimento metu atrinktų mutantų baltymo aktyviajame centre esančiame motyve turėjo pakeitimus, dėl kurių atvirkštinė transkriptazė efektyviai veikia net ir esant mažai dNTP koncentracijai reakcijos mišinyje. Dėl šių mutacijų M-MuLV AT aktyvusis centras tapo panašus į ŽIV ir kai kurių kitų atvirkštinių transkriptazių aktyvųjį centrą. Buvo parodyta, kad šio atrankos eksperimento metu baltymas įgijo tokius pokyčius, kurie atkartojo gamtinės evoliucijos eigoje vykstančius procesus.

Šiame darbe aptiktos ir iširtos mutacijos buvo panaudotos ir kitų mokslininkų grupių. Kuriant vis naujesnius genų redagavimo įrankius, David Liu vadovaujama mokslininkų grupė sukonstravo molekulinį kompleksą, susidedantį iš Cas9 nukleazės mutanto, turinčio nikazės aktyvumą, M-MuLV atvirkštinės transkriptazės ir RNR, nukreipiančios visą kompleksą link DNR taikinio (10). Naudojant šį genų redagavimo įrankį nėra įvedami dvigrandžiai trūkiai, todėl neįjungiami DNR reparacijos mechanizmai. Pirmos kartos kompleksas savo sudėtyje turėjo laukinio tipo M-MuLV atvirkštinę

transkriptazę. Vēliu ģ M-MuLV AT baltymā buvo ģvesta sāveikā su substratu stiprinanċiū mutacijū, kurios aptiktos ir iširtos vykdant būtent šioje disertacijoje aprašytā termostabiliū mutantū atrankā. Šitaip buvo sukurtas didesniu efektyvumu pasižymintis antros kartos genū redagavimo (*angl. Prime Editing*) ģrankis (10).

Vykdant tolimesnius genū redagavimo kompleksū tyrimus pastebēta, kad jū veikimas didele dalimi priklauso nuo M-MuLV AT aktyvumo, kuris gali būti nepakankamas lāstelēse esant mažoms dNTP koncentracijoms. Tuo tikslu M-MuLV AT buvo modifikuota ģvedant aktyvaus centro mutacijas, aptiktas ir ištyrinētas šioje disertacijoje aprašomame atrankos eksperimente. Vienos iš aktyvaus centro mutacijū ģvedimas reikšmingai pagerino komplekso efektyvumą (11). Tokie darbai parodo, kad šioje disertacijoje aprašyti tyrimai aktualūs iki šiol.

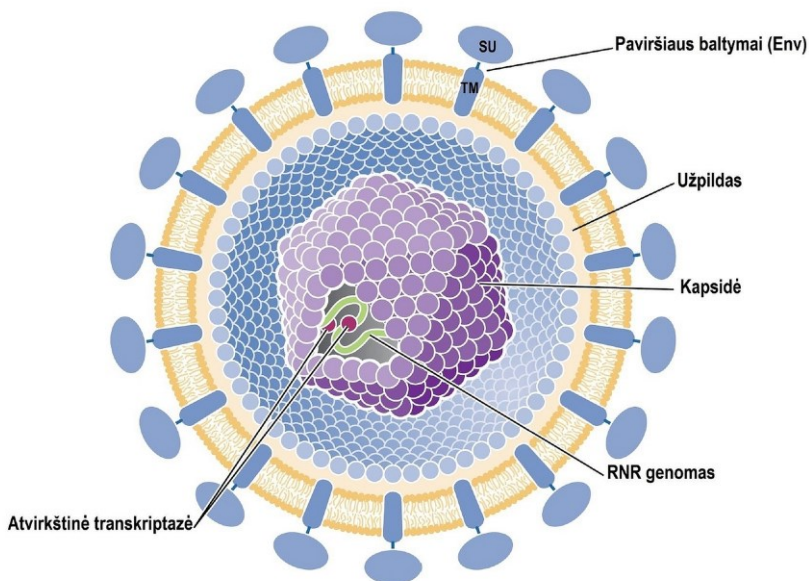
1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Pelių Moloney leukemijos viruso (M-MuLV) atvirkštinės transkriptazės struktūra ir funkcija

Atvirkštinė transkriptazė yra DNR polimerazė, ypatingai svarbi retrovirusų vystymosi cikle. Šio fermento atradimas 1970 metais pakeitė iki tol nusistovėjusį mąstymą, kad gamtoje genetinė informacija keliauja tik viena kryptimi: iš DNR į RNR transkripcijos metu, po to į baltymus translacijos metu (12,13). Atradimo reikšmė buvo įvertinta netrukus – jau 1975 metais jo autoriams įteikta Nobelio premija (14). Atvirkštinės transkriptazės pavadinimas, kurį jai suteikė atradėjai, nurodo vieną iš šio fermento aktyvumų - nuo RNR priklausomą DNR sintezę (RDDP, RNA - dependent DNA polymerase). Vėliau buvo parodyta, kad šis fermentas turi ir kitus aktyvumus – jis gali veikti kaip nuo DNR priklausoma DNR polimerazė (DDDP, DNA – dependent DNA polymerase) ir kaip ribonukleazė H. Visi minėti aktyvumai reikalingi retroviruso replikacijos metu virusinę viengrandę RNR paversti į dvigrandę DNR, kuri vėliau integruojama į šeimininko genomą.

1.1.1 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės vaidmuo viruso replikacijoje

Pelių Moloney leukemijos virusas (M-MuLV, Moloney Murine Leukemia Virus) priskiriamas retrovirusų šeimos ortoretrovirusų pošeimiui. Kartu su beždžionių, pelių ir kitais leukemijos bei sarkomos virusais M-MuLV sudaro gamaretrovirusų gentį. Pelių Moloney leukemijos viruso dalelių sandara yra panaši į kitų ortoretrovirusų pošeimiui priskiriamų virusų. Subrendęs M-MuLV yra 100 – 120 nm skersmens dalelė, turinti sferos formą, apgaubta dvigubo fosfolipidų sluoksnio. M-MuLV dalelės nėra rigidiškos – jų forma gali keistis (15). Virusio išorėje yra glikozilintų paviršiaus baltymų kompleksas, susidedantis iš susipynusių trijų Env (Envelope) baltymo molekulių (1 pav.). Env baltymas yra heterodimeras, sudarytas iš transmembraninio baltymo (TM, Transmembrane) ir paviršinio baltymo (SU, Surface). Paviršiaus baltymų kompleksas reikalingas viruso sąveikai su neinfekuotos šeimininko ląstelės paviršiuje esančiais receptoriais. Ši sąveika vyksta dėka SU baltyme esančio N – galinio RBD (Receptor Binding Domain) domeno (16). SU ir TM baltymai yra M-MuLV *Env* geno produktai, kurie, priešingai nei kiti M-MuLV baltymai, yra brandinami šeimininko ląstelės Goldžio komplekse, panaudojant nevirusinę proteazę (17).



1 pav. M-MuLV dalelės sandara. Parengta pagal (18).

M-MuLV dalelės šerdyje yra taisyklingos struktūros kapsidė, sudaryta iš CA (Capsid) baltymo. Pagal paplitusį modelį, šešios CA baltymo molekulės sąveikauja N – galiniais domenais, sudarydamos grotelių pavidalo struktūras, kurios jungiasi tarpusavyje, suformuodamos kapsidę (19). Erdvę tarp kapsidės ir fosfolipidinės membranos užima MA (Matrix) baltymas, kurio N – galinis glicinas yra modifikuojamas prijungiant miristoilo (C14) grandinę (20). Ilga hidrofobinė grandinė padeda baltymui prisijungti prie fosfolipidinės membranos. Panašiai kaip ir kituose retrovirusuose, M-MuLV MA baltymui būdinga aukštesnė domeninė organizacija, kuri gali keistis viruso dalelių brendimo metu (21). Viruso kapsidėje yra dvi viengrandės viruso genominės RNR kopijos, kurias supakuoja NC (Nucleocapsid) baltymas, turintis vieną konservatyvų 14 aminorūgščių cinko pirštų motyvą. NC baltymas yra specifiskas M-MuLV genominės RNR sekai, jis sąveikauja su Ψ (Psi – packaging signal) seka (22). MA, CA ir NC baltymai susiformuoja proteolitiškai skaidant Gag baltymą, kurį koduoja *gag* genas. Be išvardintų struktūrinių baltymų, *gag* genas koduoja ir P12 baltymą, kuris dalyvauja įvairiuose viruso gyvenimo ciklo etapuose. Šis baltymas kartu su CA ir kitais virusiniais bei ląstelės baltymais dalyvauja formuojant preintegracinį kompleksą, kurio paskirtis yra virusinės dvigrandės DNR integravimas į šeimininko genomą. P12 baltymo C – galinis domenas atsakingas už komplekso sąveiką su šeimininko ląstelės chromosoma (23,24). P12 baltymas

taip pat turi įtakos viruso kapsidės struktūrai ir stabilumui, taip pat atvirkštinės transkripcijos komplekso aktyvumui, už šias savybes yra atsakingas baltymo N – galinis domenas (25). Be to, P12 baltymas dalyvauja ir vėlesniame viruso gyvavimo ciklo etape, viruso dalelėms išsivaduojant iš šeimininko ląstelės (26,27).

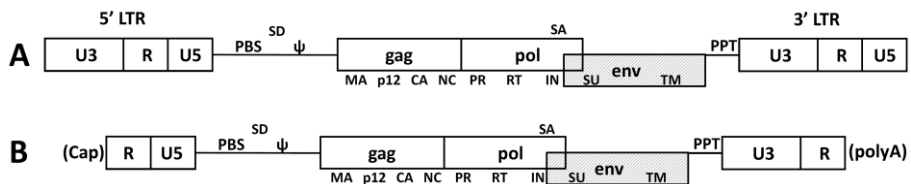
M-MuLV kapsidėje dar yra trys baltymai, turintys fermentinius aktyvumus - proteazė (PR), integrazė (IN) ir atvirkštinė transkriptazė (AT). Šie fermentai yra *gag-pol* geno ir, atitinkamai, Gag-Pol baltymo produktai. Proteazės funkcija yra Gag ir Gag-Pol baltymų skaidymas virusinės dalelės brendimo metu. Šis fermentas yra aspartato proteazė, funkciškai aktyvi ji būna tik homodimero formoje (28). Kiti du viruso kapsidės baltymai turi po keletą fermentinių aktyvumų. Integrazė, įeinanti į preintegracinio komplekso sudėtį turi nukleazinį aktyvumą, reikalingą virusinės DNR 3' – galų suformavimui ir grandinės perkėlimo aktyvumą, kuris panaudojamas įstatant viruso DNR į šeimininko chromosomą (29). Atvirkštinė transkriptazė turi jau aptartus du polimerazinius ir RNazės H aktyvumus. M-MuLV atvirkštinė transkriptazė yra 75 kDa molekulinės masės monomeras (30), nors daugumos retrovirusų atvirkštinės transkriptazės yra heterodimerai, pavyzdžiui, gausiai ištyrinėta ŽIV – 1 atvirkštinė transkriptazė yra heterodimeras, susidedantis iš 66 kDa ir 51 kDa subvienetų (31).

M-MuLV kapsidėje taip pat yra dvi kopijos ~8,3 kb ilgio virusinės RNR, kuri koduoja paminėtus viruso baltymus, o taip pat turi nekoduojančias reguliatorines sekas, reikalingas atvirkštinės transkripcijos reakcijai, RNR pakavimui į nukleokapsidę ir integravimui į šeimininko ląstelės chromosomą (2 pav.). Abiejuose RNR galuose yra identiški 68 bazių ilgio R (Repeated) regionai. Už 5' gale esančio R regiono yra U5 seka ir 18 bazių ilgio seka, vadinama pradmens sėdimo vieta (PBS – PrimBinding Site). PBS seka yra vieta, nuo kurios prasideda atvirkštinė transkripcija, ši seka yra komplementari 18 paskutinių prolino tRNR bazių (32).

Retrovirusų genomine RNR turi tas pačias modifikacijas, kaip ir šeimininko ląstelės mRNR: 5' gale neįprastu fosfortriesteriniu ryšiu prijungtą 7-metilganoziną, vadinamą Cap modifikacija, ir poliadenilinį traktą 3' gale. Nepaisant to, į viruso daleles yra selektyviai pakuojama būtent viruso genomine RNR, o šeimininko ląstelės RNR viruso dalelėse aptinkami labai nedideli kiekiai (33). Šį selektyvumą lemia Ψ (Psi – Packaging signal) seka, esanti už pradmens sėdimo vietos PBS. Ψ seka turi nedidelį motyvą, kuris lemia viruso RNR molekulių dimerizaciją, dėl kurios į viruso daleles patenka po dvi RNR kopijas. Minėtas motyvas sąlygoja ir specifiškos antrinės

struktūros susiformavimą, reikalingą sąveikai su NC baltymu formuojantis viruso dalelėms (34).

Virusinės RNR 3' gale yra ~15 bazių ilgio polipurininis traktas PPT (Polypurine tract), turintis svarbią funkciją atvirkštinės transkripcijos metu. Atvirkštinei transkriptazei susintetinus pirmąją (“minus”) DNR grandinę, likusi virusinė RNR yra suskaidoma dėka atvirkštinės transkriptazės RNazės H aktyvumo, tačiau polipurininis traktas yra atsparus RNazei H. Jis išlieka susirišęs su “minus“ DNR grandine ir tarnauja pradmeniu antros grandinės sintezei (35). Iš karto už PPT sekos yra dar vienas nekoduojantis elementas, 448 bazių ilgio U3 regionas. Po atvirkštinės transkripcijos, kurios metu viengrandė RNR yra paverčiama dvigrande DNR, U3 regionas kartu su U5 ir R sekomis sudaro LTR (Long Terminal Repeat) motyvą (32).



2 pav. Pelių leukemijos proviruso dvigrandės DNR (A) ir viruso genominės RNR (B) struktūra. (A) Proviruso dvigrandės DNR galuose yra pasikartojantys regionai 5' LTR (long terminal repeat) ir 3' LTR, kuriuos sudaro U3, R ir U5 sekos. Regulatorinės sekos – pradmens surišimo vieta PBS (primer binding site), brendimo (splaisingo) donorinė seka SD (splicing donor), splaisingo akceptorius seka SA (splicing acceptor), pakavimo signalas ψ (Psi - packaging signal) ir polipurininis traktas PPT (polypurine tract). Baltymus koduojančios sekos - *gag* koduoja baltymus MA (matrix), p12, CA (capsid), NC (nucleocapsid), *pol* koduoja baltymus PR (protease), RT (reverse transcriptase) ir IN (integrase), *env* koduoja paviršiaus baltymus SU (surface) ir TM (transmembrane). (B) Viruso viengrandė genominė RNR yra poliadenilinta 3' gale ir turi Cap modifikaciją 5' gale. Parengta pagal (32,35).

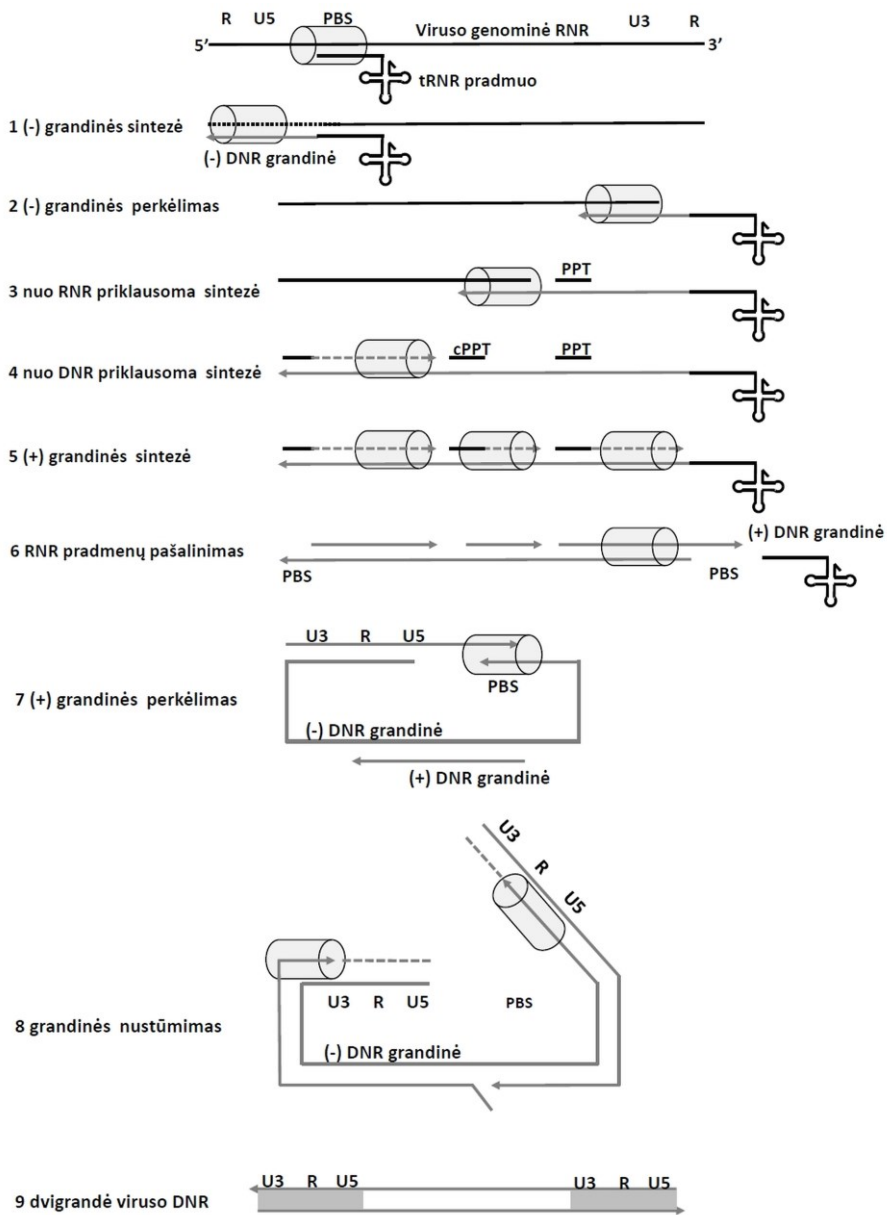
Centrinėje RNR molekulės dalyje yra sekos, koduojančios tris M-MuLV baltymų liejinius (polibaltymus) – Gag, kuris yra visų viruso dalelės struktūrinių baltymų pirmtakas, Pol, iš kurio virusinės proteazės dėka gaminami fermentinius aktyvumus turintys baltymai ir Env, iš kurio gaminami paviršiniai M-MuLV baltymai (32). Pilno ilgio virusinė RNR yra naudojama Gag-Pol ir Gag baltymų sintezei. Gag-Pol polibaltymas gaunamas dėka translacijos supresijos, ignoruojant terminacijos kodoną UAG – šis

kodonas palaikomas glutamino kodonu. Transliacijos supresiją nulemia specifinė RNR antrinė struktūra, esanti už UAG terminacijos kodono (36). Env baltymas, priešingai nei prieš tai paminėti baltymai, yra transliuojamas ne nuo pilno ilgio virusinės RNR, bet nuo splaisuotos RNR (35).

Pelių Moloney leukemijos viruso replikacijos ciklas prasideda, kai M-MuLV infekuoja pelių ar žiurkių T ir B limfocitus - ląsteles, kurioms būdingas dalijimasis. Nesidalijančių, diferencijuotų ląstelių šis virusas negali sėkmingai infekuoti (35). Infekcijos pradžioje subrendusios viruso dalelės prisitvirtina prie šeimininko ląstelės receptorių, panaudodamos paviršiaus baltymą SU. Po to vyksta transmembraninio TM baltymo konformaciniai pokyčiai, kurie lemia šeimininko ląstelės ir viruso membranų susiliejimą. Citoplazmoje esanti viruso dalelė išsivaduoja iš kapsidės apvalkalo, o atvirkštinės transkripcijos metu viengrandės „plius“ RNR molekulės yra paverčiamos į dvigrandės DNR molekules. Viruso genominė DNR įterpiama į preintegracinio komplekso sudėtį, kuris sąveikauja su šeimininko ląstelės chromosoma. Virusinės DNR integracija į šeimininko ląstelę vyksta mitozės metu, nes preintegracinis kompleksas, sudarytas iš virusinės DNR ir baltymų nesugeba praeiti branduolio membranos (24,37). Šeimininko ląstelės branduolyje veikiantis transkripcijos aparatas sintetina virusinę RNR, kuri eksportuojama iš branduolio į citoplazmą. Citoplazmoje vyksta viruso baltymų sintezė ir virusinių dalelių susirinkimas. Iš ląstelės išsivaduoja dar nepilnai subrendusios M-MuLV dalelės, o brendimas vyksta virusinei proteazei fragmentuojant virusinių baltymų pirmtakus (polibaltymus) (35,38).

Atvirkštinės transkripcijos metu, kaip minėta, virusinė viengrandė „plius“ RNR paverčiama į dvigrandę DNR molekulę (3 pav.). M-MuLV infekcijos atveju, šis procesas prasideda, kai ląstelės citoplazmoje esanti prolino tRNR 3' galu prisijungia prie 18 bazių ilgio PBS sekos (32,39,40). Kiti virusai naudoja kitokias šeimininko ląstelės tRNR, pavyzdžiui, Rouso sarkomos viruso atvirkštinė transkriptazė DNR sintezės inicijavimui pasitelkia triptofano tRNR (40). RNR 3'-OH galas pratęsiamas, tokiu būdu nukopijuojant viruso RNR 5' gale esančias U5 ir R sekas. Susiformavęs DNR/RNR hibridas yra hidrolizuojamas dėka M-MuLV atvirkštinės transkriptazės RNazės H aktyvumo. Susintetinta ~160 bazių ilgio „minus“ viengrandė DNR turi R regioną, kuris komplementarus RNR molekulės 3' gale esančiam R regionui. DNR – RNR hibrido susiformavimas yra kito atvirkštinės transkripcijos etapo pradžia. Kadangi retrovirusai turi dvi genominės RNR kopijas, šis „minus“ DNR grandinės perkėlimas gali vykti tiek nuo vieno tos pačios molekulės galo į kitą, tiek tarp skirtingų RNR molekulių (tarpmolekulinis procesas). Grandinės perkėlimas gali vykti dar

tebesitęsiant pirmojo „minus“ DNR fragmento sintezei (39). Susiformavus naujam DNR – RNR hibridui, atvirkštinė transkriptazė sintetina „minus“ DNR grandinę pradėdant nuo RNR molekulės 3' galo, tuo pat metu fragmentuodama RNR grandinę dėka RNazės H aktyvumo. RNazės H aktyvumas visos RNR pilnai nepašalina – išlieka 13 nukleotidų ilgio polipurininis traktas (PPT), susirišęs su susintetinta „minus“ DNR. PPT seka yra virusinės RNR molekulės 3' dalyje. Šio trakto atsparumą RNazės H poveikiui lemia unikalios jo ir aplinkui esančių sekų struktūrinės ypatybės: prieš polipurininį traktą DNR/RNR hibrido molekulėje yra didelio laipsnio linkis, o ties pačia PPT seka ir joje DNR/RNR hibridas įgyja dvigrandę DNR būdingą B formą, todėl negali būti RNazės H substratu (41). Išlikęs polipurininis traktas yra pradmuo „plus“ DNR grandinės sintezei. „Plus“ grandinės sintezė vyksta kol pasiekiamas PBS seka ir nukopijuojami 18 tRNR^{Pro} nukleotidų, kurie buvo susirišę su PBS seka sintetinant pirmą grandinę, o likusi tRNR^{Pro} dalis yra pašalinama, nes susidaręs DNR/RNR hibridas yra matrica RNazei H. Toliau vyksta atvirkštinės transkriptazės katalizuojamas antrasis grandinės perkėlimas. Šios reakcijos metu „plus“ grandinės fragmentas prisilydo prie komplementarios sekos, esančios beveik pilno ilgio „minus“ grandinės 3' gale. Tokiu būdu susidaro žiedinė molekulė, o nuo DNR priklausomo DNR polimerazės ir grandinės nustumimo aktyvumų dėka atvirkštinė transkriptazė suformuoja pilno ilgio dvigrandę DNR molekulę, galuose turinčią LTR sekas (32,39).



3 pav. Atvirkštinės transkripcijos eiga. RNR pavaizduota juoda spalva, DNR – pilka spalva. Rodyklėmis pavaizduota DNR sintezės kryptis. Pilkos spalvos cilindras žymi M-MuLV atvirkštinę transkriptazę. Parengta pagal (39).

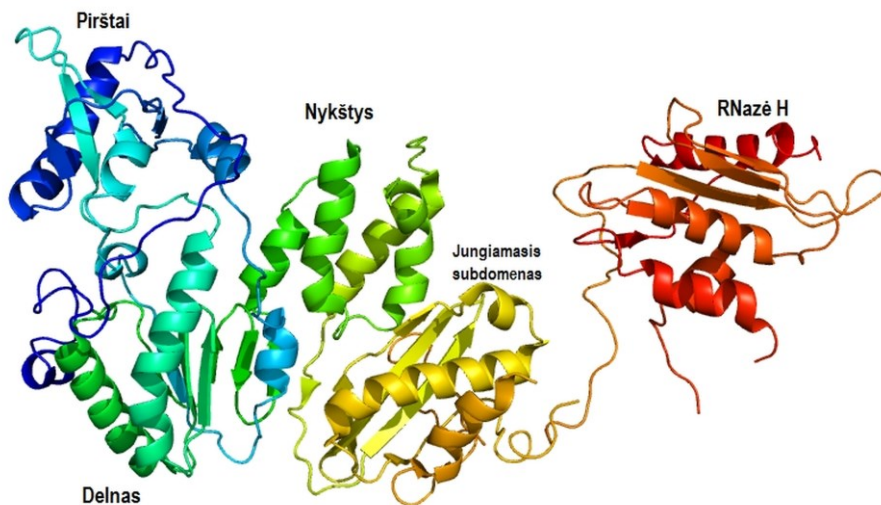
1.1.2 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės struktūrinės ypatybės

M-MuLV atvirkštinė transkriptazė, kaip ir kitų retrovirusų polimerazės, yra multifunkcinis fermentas, pasižymintis nuo RNR priklausomos DNR polimerazės, nuo DNR priklausomos DNR polimerazės, RNazės H aktyvumais, o taip pat atliekantis grandinės perkėlimo ir grandinės nustūmimo funkcijas. Šie aktyvumai, kaip aprašyta praeitame skyriuje, reikalingi viruso viengrandės RNR pavertimui į dvigrandę DNR. Natūralu, kad daugiafunkcinė fermento prigimtis yra susijusi su griežta tretine baltymo struktūra.

M-MuLV atvirkštinė transkriptazė yra 75 kDa dydžio monomeras, turintis polimerazės domeną baltymo N – gale ir RNazės H domeną C – gale. M-MuLV atvirkštinė transkriptazė, kaip ir MMTV (pelės krūties auglio viruso, mouse mammary tumor virus) bei BIV (jaučio imunodeficito viruso, bovine immunodeficiency virus) atitinkami fermentai priklauso monomerinių atvirkštinių transkriptazių grupei (42,43). M-MuLV AT baltymo atskirų fragmentų kristalinės struktūros pasirodė prieš daugiau nei du dešimtmečius (44,45), o pirmoji pilno M-MuLV atvirkštinės transkriptazės polimerazės domeno struktūra buvo publikuota 2004 (30). Tiesa, norėdami gauti baltymo kristalus, tinkamus struktūros nustatymui, autoriai turėjo padidinti atvirkštinės transkriptazės tirpumą, nukirpdami 23-jų baltymo N – gale esančių aminorūgščių fragmentą ir įvesdami vieną mutaciją (L435K). Be to, tinkami kristalai susidarė tik atvirkštinei transkriptazei sąveikaujant su 14 bp ilgio dvigrandės DNR fragmentu. Buvo parodyta, kad M-MuLV AT turi polimerazėms būdingus pirštų, delno ir nykščio subdomenus, taip pat jungiamąjį subdomeną ir RNazės H domeną. Pirmiems keturiems domenams sudaryti elektronų tankio žemėlapiai buvo geros kokybės, tuo tarpu detalus RNazės H domeno modelio sudaryti nepavyko (30). Kokybišką RNazės H domeno tretinę struktūrą nustatyti pasisekė kristalizuojant šį domeną atskirai (46). Tiesa, tinkama kristalų kokybė pasiekta tik pašalinus svarbų struktūrinį elementą – vieną iš penkių α -spiralių, vadinamą C – spirale. Vėliau buvo publikuota komplekso, kurį sudaro M-MuLV AT ir STOP kodonus reguliuojantis veiksnys eRF1, struktūra (47). Šio komplekso kristalai susidarė pašalinus jau minėtą 23-jų aminorūgščių fragmentą, esantį baltymo N – gale. Vis dėlto tai yra pirmoji kristalografijos būdu gauta tretinė M-MuLV AT baltymo struktūra, kurioje kartu yra ir polimerazės, ir RNazės H domenai (4 pav.). RNazės H domeno konformacinis lankstumas yra būdingas monomerinėms atvirkštinėms transkriptazėms, priešingai negu dimerinėms (48). Dėl šios priežasties, gauti pilnos sudėties baltymo tretinę struktūrą

pavyko tik M-MuLV atvirkštinei transkriptazei esant komplekso sudėtyje, nes tokiu būdu buvo sumažintas RNazės H domeno konformacinis judrumas (47).

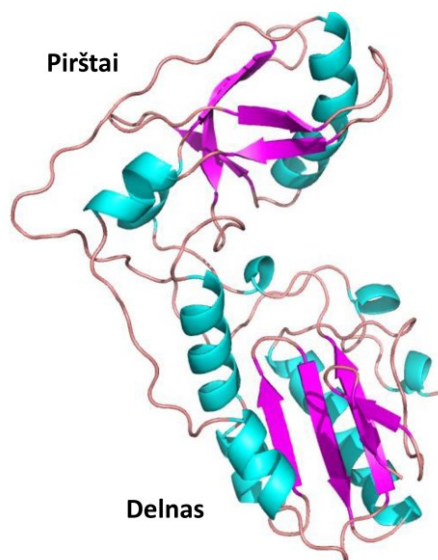
M-MuLV atvirkštinės transkriptazės baltymo molekulė yra 90 x 45 x 50 Å dydžio. Šiam baltymui priklausantys pirštų, delno ir nykščio subdomenai būdingi daugeliui polimerazių (4 pav.). Minėti subdomenai formuoja savotiškos struktūros plyšį, kurio paviršiuje dominuoja teigiamai įkrautų aminorūgščių šoninės grandinės. Plyšio funkcija yra sąveika su substratu ir tinkamas jo nukreipimas į fermento aktyvųjį centrą (30).



4 pav. Pilno ilgio M-MuLV molekulės struktūra, nuspalvinta vaivorykštės principu nuo mėlynos spalvos N - gale iki raudonos spalvos C – gale. Pirštų subdomenas nuspalvintas mėlyna ir žydra spalva, delno subdomenas – žydra ir žalia spalva, nykščio subdomenas – žalia spalva, jungiamasis subdomenas – geltona spalva ir RNazės H domenas – raudona spalva. PDB kodas 5DMQ. Paruošta pagal (47).

Pirštų ir delno subdomenai yra mažiausiai judrios baltymo molekulės dalys, turinčios nemažai konservatyvių ir struktūriškai svarbių motyvų. Aminorūgščių grandinė kelis kartus “perveria” abu šiuos domenus - pirštams priskiriamos aminorūgštys, esančios 41 – 124 ir 159 – 194 pozicijose, tuo tarpu delnui priklauso 24 – 40, 125 – 158 ir 195 – 274 aminorūgštys. Pirštų subdomenas turi β – lakštą, kuris sudarytas iš penkių stipriai persipynusių β – juostų, o aplink šį lakštą išsidėsto trys α – spiralės (5 pav.). Delno subdomenas taip pat turi β – lakštą, kuris sudarytas iš keturių antiparaleliai išsidėsčiusių β – juostų, o šalia yra dvi ilgos α – spiralės. Abu šie struktūriniai elementai yra

centrinėje delno subdomeno dalyje, o juos supa plaukų segtuką sudarančios dvi β – juostos ir keturios nedidelės α – spiralės (5pav.). Pirštų ir delno subdomenų struktūros sutvirtinamos vandenilniais ryšiais, susidaranciais tarp pagrindinės aminorūgščių grandinės atomų (44). Delno subdomene išsidėstęs baltymo aktyvusis centras, kuriame yra atvirkštinėms transkriptazėms būdingas konservatyvus YXDD motyvas, užimantis atitinkamai 222 – 225 pozicijas. Artimoje aktyviojo centro aplinkoje yra ir pirštų subdomeniui priskiriamų aminorūgščių (R110, N119) šoninių grandinių (30).



5 pav. M-MuLV AT polimerazinio domeno pirštų ir delno subdomenų tretinė struktūra. α – spiralės pažymėtos žydra spalva, β – juostos – violetine spalva. PDB kodas 1MML. Parengta pagal (44).

Nykščio ir jungiamajam subdomenam priskiriamos atitinkamai 276 – 361 ir 362 – 474 aminorūgštys (30). Šiuose struktūriniuose elementuose konservatyvių sekų nėra daug – tarp M-MuLV ir ŽIV atvirkštinių transkriptazių yra tik 10% identiškų aminorūgščių. Nepaisant to, tretinės šių subdomenų struktūros yra gana konservatyvios, nes abiemis minėtomis atvirkštinėms transkriptazėms būdingi panašūs motyvai. Nykščio subdomenas turi tris nedideles α – spirales – trijų, penkių ir septynių aminorūgščių ilgio. Nykštys vaidina svarbų vaidmenį surišant atvirkštinės transkriptazės substratą. Tiksliau, nykštyje yra mažojo griovio surišimo motyvas, kuris sąveikauja su sintetinama DNR grandine, tai yra grandine, kurioje yra

pradmuo (30,48). Mažoji griovio surišimo motyvui priskiriamos R298, E302, T306 aminorūgštys. Jungiamasis subdomenas sudarytas iš 17 aminorūgščių turinčios α – spiralės, aplink kurią yra keletas β – juostų. M-MuLV atvirkštinės transkriptazės jungiamasis subdomenas turi net 32 aminorūgščių mobilų jungtuką, kuris jungia RNazės H ir polimerazės domenų. Linkeris suteikia RNazės H domenui didelį konformacinį lankstumą polimerazės domeno atžvilgiu. Dėl šios priežasties, nustatyti RNazės H domeno struktūrą pavyko tik kristalizuojant šį domeną atskirai (46). Kaip jau minėta, buvo publikuota ir pilnos M-MuLV atvirkštinės transkriptazės struktūra (47), tačiau pastarasis darbas labiau skirtas šio baltymo sąveikai su STOP kodonus reguliuojančiu veiksmu eRF1. Abiejų minėtų RNazės H struktūrų centrinėje dalyje nėra svarbaus vienuolikos aminorūgščių fragmento. Lim su kolegomis publikuojamoje struktūroje visai nėra C α – spiralės, Tang su bendraautoriais pateiktoje struktūroje trūksta didesnės C α – spiralės dalies ir dar kelių šalia esančių aminorūgščių (46,47). Tuo tarpu Zhou su kolegomis yra paskelbęs XMRV (Ksenotropinio pelių leukemijos viruso, Xenotropic murine leukemia-virus related virus) atvirkštinės transkriptazės pilno RNazės H domeno struktūrą, kurioje su gera skiriamąja geba matoma ir C α – spiralė (49).

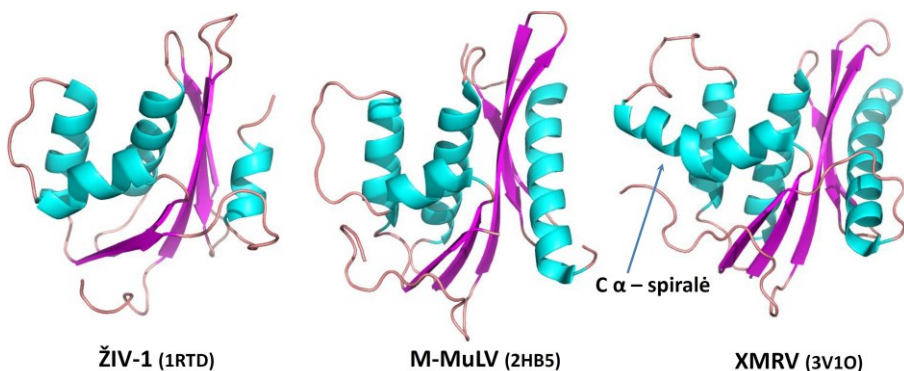
Svarbu pažymėti, kad M-MuLV atvirkštinė transkriptazė yra labai artima minėtai XMRV atvirkštinei transkriptazei. Šių fermentų polimerazės ir jungiamasis domenai yra beveik identiški – skiriasi tik penkios aminorūgštys (48), o RNazės H domenai labai panašūs – identišku aminorūgščių yra virš 80% (46,49). Žinoma, abiejų baltymų RNazės H domenų tretinės struktūros taip pat panašios. Įdomu tai, kad Lim su bendraautoriais publikuota M-MuLV atvirkštinės transkriptazės RNazės H tretinė struktūra, nustatyta pasiekus 1,6 Å skiriamąją gebą, yra panaši į ŽIV-1, *E. coli*, *T. thermophilus* HB8, *B. halodurans* ir kitų žinomų DNR/RNR hibridą skaidančių RNazių struktūras, nors sekų panašumas yra mažas. Pavyzdžiui, M-MuLV RNazė H turi 26% ir 18,5% identišku aminorūgščių, lyginant atitinkamai su *E. coli* ir ŽIV-1 RNazėmis H (46). Be to, kai kurie kiti nukleazinių aktyvumą turintys baltymai, tokie kaip *T. maritima* UvrC endonukleazės domenas, *P. furiosus* argonautų baltymo PIWI domenas ar *E. coli* Tn5 transpozazė, taip pat pasižymi tretine struktūra, artima M-MuLV RNazei H (50). Visi šie baltymai, nors ir priklausantys evoliuciškai nutolusiems organizmams, pagal struktūrinius požymius priskiriami RNazės H šeimai.

Ne visos aminorūgštys M-MuLV RNazės H ΔC struktūroje, publikuotoje Lim ir bendraautorių, yra matomos – nėra atitinkamai keturių ir šešių aminorūgščių N – galinio ir C – galinio fragmento, bei penkių aminorūgščių kilpos, esančios regione P636 – K640, vadinamos H – kilpa. Ši kilpa pasižymi

dideliu konformaciniu lankstumu, kuris apsunkena jos aptikimą kristalinėje struktūroje.

M-MuLV AT RNazės H centre yra mišraus tipo β - lakštas, susidedantis iš penkių β – juostų, apsuptas keturių α – spiralių. Kaip jau minėta, vienos iš spiralių, būtent C spiralės, nėra Lim su bendraautoriais paskelbtoje struktūroje (PDB kodas 2HB5), tačiau apie šios spiralės poziciją galima spręsti iš XMRV RNazės H struktūros (PDB kodas 3V1O) (46,49) (6 pav.). M-MuLV RNazė H turi hidrofobinę šerdį, būdingą ir kitoms atvirkštinėms transkriptazėms, kurią sudaro tiek β – juostose, tiek α – spiralėse esančių aminorūgščių šoninės grandinės.

M-MuLV AT RNazės H sritis, atsakinga už sąveiką su substratu, turi teigiamą krūvį. Sąveikos su RNR/DNR hibridu paviršių sudaro šoninės grandinės, daugiausia ateinančios iš lizino ir arginino – R534, Q559, R560, R585, K609, K612, N613, K614. Sąveika tarp RNazės H ir RNR/DNR substrato yra nespecifiška, nes aminorūgščių šoninės grandinės sudaro ryšius su RNR arba DNR grandinės fosfatais ir RNR ribozės 2' – OH grupėmis. Tuo tarpu aktyvus centras, katalizuojantis substrato hidrolizę, turi daugiau neigiamą krūvį (46). M-MuLV AT RNazės H aktyvųjį centrą sudaro konservatyvios aminorūgštys Asp524, Glu562, Asp583 ir Asp653, priklausančios DEDD motyvui, kuris būdingas šio tipo nukleaziniams fermentams. Aktyvusis centras koordinuoja du Mg^{2+} jonus. Vienas iš Mg^{2+} jonų vadinamas aktyvuojančiu. Jo pagrindinė funkcija yra nukleofilinės OH⁻ grupės formavimas. Antrasis metalo jonas reikalingas pereinamosios būsenos fermento substrato kompleksui stabilizuoti, taip pat jis skatina fosforilo grupės pernešimą (46,51).



6 pav. ŽIV-1, M-MuLV ir XMRV atvirkštinėms transkriptazėms priklausančių RNazės H domenų tretinės struktūros.

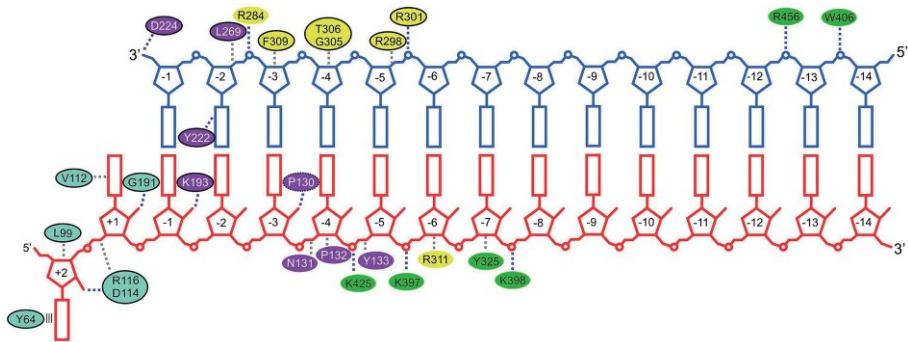
Įdomu tai, kad M-MuLV AT RNazės H domenas, atskirtas nuo polimerazės domeno, sugeba vykdyti savo funkciją. Taip pat ir N-galinis polimerazės domenas, atskirtas nuo RNazės H domeno, išlaiko reikšmingą dalį polimerazės aktyvumo (52), o kai kuriais duomenimis, RNazės H domeno pašalinimas netgi padidina polimerazės aktyvumą (53). Anksčiau paminėta C α spiralė taip pat nėra būtina RNazės H nukleaziniui aktyvumui. C α spiralės neturi dimerinės atvirkštinės transkriptazės, tokios kaip Rouso sarkomos viruso ar ŽIV-1 atvirkštinės transkriptazės. Pašalinus C α spiralę, M-MuLV atvirkštinė transkriptazė išlaiko RNazės H aktyvumą, tačiau atskyrus šio mutantinio baltymo polimerazės ir RNazės H Δ C domenus, pastarasis praranda nukleazinį aktyvumą (53). Palyginimui, ŽIV-1 RNazė H, ekspresuojama atskirai nuo polimerazės, taip pat neturi nukleazinio aktyvumo, o jį įgyja tik įterpus C spiralę (46). Šie tyrimai rodo, kad C spiralė, kuri yra išsikišusi iš RNazės H struktūros ir nepriklauso anksčiau minėtam teigiamą krūvį turinčiam sąveikos paviršiui, atlieka svarbų vaidmenį sąveikaujant su substratu.

Kalbant apie M-MuLV AT polimerazinio domeno sąveiką su substratu, struktūrinės informacijos šiuo klausimu nėra daug. Nors yra publikuota keletas struktūrų, kuriose M-MuLV atvirkštinės transkriptazės N – galinis domenas sąveikauja su dvigrande DNR, tačiau šiose struktūrose DNR aiškių kontaktų su polimerazės aktyvaus centro aminorūgštimis nesudaro. Be to, substrato padėtis aktyvaus centro atžvilgiu stipriai skiriasi, palyginus su ŽIV-1 – DNR kompleksu ar kitomis panašiomis struktūromis (48). Dėl šių priežasčių, apie M-MuLV AT sąveiką su substratu galima būtų spręsti pasitelkiant jau minėtos XMRV AT komplekso su RNR/DNR hibridu struktūrą (PDB kodas 4KHQ). XMRV AT polimerazės domenas ir jungiamasis subdomenas nuo atitinkamų M-MuLV AT struktūrinių dalių skiriasi tik penkiomis aminorūgštimis (P30L, L234Q, Q238R, D422N, L463M), todėl šiuos fermentus galima laikyti beveik identiškais (48).

Minėtoje struktūroje RNR/DNR hibridas yra patalpintas teigiamai įkrautame substrato surišimui skirtame kanale, jis sudaro kontaktus su visais baltymo subdomenais. Visi kontaktai, išskyrus vieną, yra sudaromi tarp baltymo aminorūgščių ir RNR/DNR fosfodiesterinio karkaso, kas liudija apie nuo sekos nepriklausomą atvirkštinės transkriptazės ir substrato sąveikos pobūdį. Fermentas uždengia 16 RNR grandinės (matricos) nukleotidų ir 14 DNR grandinės (pradmens) nukleotidų. Ties fermento aktyviu centru ir nykščio subdomenu esantis substratas turi A tipo konformaciją, ties jungiamuoju domenu atsidūrusio substrato konformacija yra tarpinė tarp A ir B tipų. RNR/DNR hibrido trajektorija ties fermento aktyviu centru šioje

struktūroje visiškai persidengia su ŽIV-1 – DNR komplekse esančio substrato trajektorija, kas liudija apie tai, kad atvirkštinių transkriptazių aktyvusis centras yra struktūriškai konservatyvus (48,54).

XMRV ir RNR/DNR substrato komplekse esanti RNR grandinė turi dvių nukleotidų išsikišimą, be to, 5' – gale esantis nukleotidas yra „išsuktas“ (7 pav.). Šį nukleotidą stabilizuoja stekingo sąveika tarp Y64 aromatinio žiedo ir minėto nukleotido bazės, o taip pat L99 sąveika su ribozės žiedu. Buvo parodyta, kad M-MuLV atvirkštinės transkriptazės Y64 aminorūgštis yra atsakinga už grandinės nustūmimo aktyvumą (55,56).



7 pav. XMRV atvirkštinės transkriptazės aminorūgščių sąveika su RNR/DNR hibridu. Mėlynuose ovaluose yra pažymėti pirštų subdomeniui priklausančių aminorūgščių numeriai, violetiniuose – delno, geltonuose – nykščio, o jungiamajam domeniui priklausančių aminorūgščių numeriai pažymėti žaliuose ovaluose.

Su +2 pozicijoje esančio nukleotido ribozės 2' – OH grupe sąveikauja ir D114 bei R116 aminorūgščių šoninės grandinės. R116 šoninė grandinė yra išsikišusi iš baltymo paviršiaus ir formuoja savotišką smaigą, kurio funkcija yra nukreipti RNR (matricos) grandinę tinkama trajektorija taip, kad +1 nukleotido bazė atsidurtų arti ateinančio dNTP. Šį smaigą stabilizuoja tarpusavio sąveika tarp D114 ir R116. Su +1 nukleotido baze sąveikauja V112 šoninė grandinė, o su 2' – OH grupe ryšius sudaro G191. Įdomu tai, kad G191 iš pirštų subdomeno, taip pat K193 ir P130 iš delno subdomeno sudaro vandenilinius ryšius atitinkamai su +1, -1 ir -3 nukleotidų ribozės hidroksilo grupėmis. Minėtos sąveikos apsprendžia savotišką atvirkštinės transkriptazės specifiškumą – matrica pasirenkama ne DNR, o RNR grandinė, dėl šios priežasties atvirkštinės transkriptazės turi didesnę giminingumą RNR/DNR substratui, palyginus su dvigrande DNR. RNR grandinės nukleotidai, esantys

pozicijose nuo -4 iki -8 sudaro nemažai kontaktų su delno ir jungiamojo domenu aminorūgštėmis (48).

DNR grandinė (pradmuo) sudaro kontaktus su trijų atvirkštinės transkriptazės subdomenų aminorūgštėmis. Sąveikai su pradmeniu yra svarbus guanidino grupės iš R284 ryšys su fosfato grupe, taip pat pradmens -3, -4 ir -5 pozicijų nukleotidai daugiausia van der Valso tipo sąveikomis siejasi su nykštyje esančios alfa spiralės aminorūgštėmis R298, R301, G305, T306, o -3 nukleotido ribozės žiedas pasižymi stekingo sąveika su F309 aromatinio žiedu. Šios aminorūgštys įsiterpia į mažąjį RNR/DNR hibrido griovį. Didelė pradmens dalis nuo -6 iki -12 nukleotido nesudaro kontaktų su aminorūgštėmis, tačiau 5' – gale esantys nukleotidai kontaktuoja su jungiamojo subdomeno aminorūgštėmis. Manoma, kad šie kontaktai turi reikšmę atvirkštinei transkriptazei sąveikaujant su polipurininiu traktu (48). Nors aprašyti aminorūgščių kontaktai su RNR/DNR hibridu yra nustatyti XMRV atvirkštinės transkriptazės komplekse su substratu, remiantis sekų ir struktūrų panašumu galima daryti prielaidą, kad daugelis jų būdingi ir M-MuLV atvirkštinei transkriptazei.

1.1.3 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės biocheminės savybės

M-MuLV atvirkštinė transkriptazė yra daugiafunkcinis fermentas, turintis nuo RNR priklausomos DNR polimerazės, nuo DNR priklausomos DNR polimerazės, terminalinės transferazės, RNazės H, grandinės nustūmimo (*angl. strand displacement*) ir grandinės perkėlimo (*angl. strand transfer*) aktyvumus, kurie panaudojami atvirkštinės transkripcijos metu.

Polimerazinis M-MuLV AT aktyvumas apibūdinamas tokiais savybėmis kaip specifiskumas substratui, sintezės tikslumas, greitis, procesyvumas. Kadangi M-MuLV AT turi dvejopą polimerazinį aktyvumą, išvardintos savybės gali skirtis priklausomai nuo matricos – DNR ar RNR. M-MuLV atvirkštinė transkriptazė yra DNR polimerazė, kuri savo struktūrinėmis ir katalizinėmis savybėmis turi daug panašumų į kitus šio tipo fermentus. M-MuLV AT substratas yra matricos – pradmens dupleksas. DNR sintezės metu pradmuo yra pratęsiamas dėka polimerazinio aktyvumo, formuojant 3' – 5' fosfodiesterinį ryšį tarp pradmens 3' – gale esančios hidrosilo grupės ir į grandinę įtraukiamo nukleotido. Kaip įprasta, sintezė vyksta 5' – 3' kryptimi, nukleotidai į ilgėjančią grandinę įtraukiami pagal komplementarumo principą. Polimerazės reakcija vyksta esant divalencio metalo jonų. Nors dažniausiai *in vitro* reakcijose naudojami Mg^{2+} katijonai, tačiau M-MuLV atvirkštinės transkriptazės polimerazinis aktyvumas yra

stipresnis esant Mn^{2+} jonų (57,58). Katalizei reikalingi du katijonai, kuriuos koordinuoja fermento aktyviajame centre esančių trijų asparto rūgščių D150, D224 ir D225 šoninių grandinių karboksilo grupės (58). Metalo jonai aktyvuoja 3' – OH grupę, kuri vykdo įeinančiame dNTP esančio α – fosfato nuleofilinę ataką. Sintetiniai pradmenys, neturintys 3' – OH, negali būti pratęsimi, tai pat kaip ir natyvos DNR molekulės, kurių gale yra įtrauktas nukleotidų analogas, neturintis hidroksilo funkcinės grupės. Šia savybe paremtas nukleotidų analogų panaudojimas ŽIV-1 atvirkštinės transkriptazės blokavimui (39). Nors natūralus M-MuLV AT substratas yra viruso genomine RNR, tačiau šio fermento aktyvumui įvertinti dažnai naudojami poli(rA)–oligo(dT), poli(dA)–poli(dT), poli(rC)–oligo(dG) ir kitokie homopolimeriniai substratai (39,58,59). Kaip ir kitos DNR polimerazės, M-MuLV AT gerai diskriminuoja ribonukleozidų trifosfatus, į sintetinamą grandinę įtraukdama tik deoksiribonukleotidus. Tokį specifiškumą lemia netoli aktyvaus centro esančio fenilalanino F155 šoninės grandinės aromatinis žiedas, kuris sudaro erdvinį trukdžius ribozės žiedą turintiems nukleozidų trifosfatams patekti į aktyvųjį centrą. Įvedus vieną mutaciją, pavyzdžiui, F155V, M-MuLV atvirkštinę transkriptazę galima paversti gana efektyvia RNR polimeraze, kuri turėtų ir DNR polimerazės aktyvumą (60). F155 atitikmenį turi ir kitų virusų atvirkštinės transkriptazės (39).

Kaip ir daugeliui polimerazių, neturinčių 3' – 5' egzozonukleazinio aktyvumo, M-MuLV atvirkštinei transkriptazei būdingas polimerazinis aktyvumas, kurio dėka modifikuojamas susintetintos kDNR grandinės 3' – galas, pridėdamas iš keleto nukleotidų sudarytą „uodegą“ be matricos. M-MuLV atvirkštinė transkriptazė yra linkusi pridėti 1 – 2 deoksicitidinus, tačiau reakcijos mišinyje esant Mn^{2+} jonų terminalinės transferazės aktyvumas stiprėja ir prie kDNR prijungiami dažniausiai 3 – 4 deoksicitidiniai (61). Dėka šio stipraus nuo matricos nepriklausomo polimerazinio aktyvumo M-MuLV AT gali modifikuoti ir dvigrandės DNR molekules, suformuodama išsikišusius 3' – galus. Efektyviausiai yra prijungiami dA, mažiau efektyviai dG, dT ir dC nukleotidai. Įdomu tai, dC, dG ir dT prijungimo aktyvumą stimuliuoja komplementarus nukleotido, atitinkamai dGMP, dCMP ir dAMP buvimas reakcijos mišinyje (62). Terminalinės transferazės aktyvumas kartu su grandinės perkėlimo savybe yra plačiai pritaikomas vienos ląstelės RNR sekoskaitos eksperimentuose ruošiant kDNR grandinę. Šiuo atveju naudojamos patobulintos atvirkštinės transkriptazės, tokios kaip Superscript IV ar Maxima H Minus. Reikia pastebėti, kad šių fermentų terminalinės transferazės aktyvumui Mn^{2+} jonai nėra reikalingi ir todėl nenaudojami (63,64,65)

Svarbiausios polimerazę apibūdinančios savybės yra procesyvumas, sintezės greitis ir tikslumas. M-MuLV atvirkštinė transkriptazė nėra procesyvus fermentas. Susirišusi su matrica ir pradmeniu, M-MuLV AT vieno sintezės ciklo metu generuoja 20 – 40 nukleotidų ilgio grandinę, po to disocijuoja nuo substrato (66). Palyginimui, AMV atvirkštinės transkriptazės procesyvumas, nustatytas naudojant tą pačią matricą siekia 400 nukleotidų ir daugiau, tai yra net keliasdešimt kartų didesnis (66). Šį skirtumą daugiausia lemia didesnis AMV atvirkštinės transkriptazės giminingumas substratui, nuo kurio tiesiogiai priklauso fermento procesyvumas. Vienoda RNR matrica taip pat yra svarbi, norint palyginti skirtingų atvirkštinių transkriptazių procesyvumus, nes RNR molekulėje susidaranti antrinė struktūra gali stipriai nulemti vieno susirišimo metu susintetinamų nukleotidų skaičių (39). Kitas veiksnys, turintis įtakos nustatytam atvirkštinių transkriptazių procesyvumui, yra reakcijos temperatūra. Plačiai žinoma apie temperatūros poveikį RNR antrinių struktūrų susiformavimui (67,68). Taip pat įtakos turi buferio sudėtis, ypač vienvalečių ir divalečių jonų koncentracija, kuri veikia ne tik antrinių RNR struktūrų susidarymą (69), bet ir baltymo sąveikos su substratu stiprumą (70). M-MuLV AT procesyvumas yra panašus į daugelio termofilinių (71,72) ir kai kurių mezofilinių (73) polimerazių, taikomų įvairiose molekulinės biologijos srityse, procesyvumą.

Vertinant sintezės greitį, svarbu atkreipti dėmesį į tai, kokiomis sąlygomis jis nustatytas ir kokiais parametrais apibūdinamas. Polimerazinių aktyvumą turinčių fermentų sintezės greitis dažniausiai yra išreiškiamas į sintetinamą grandinę įtraukiamų nukleotidų skaičiumi per laiko vienetą. Tokia išraiška yra lengvai suprantama ir patogi, tačiau skirtingomis sąlygomis nustatytų fermentų sintezės greičiai yra sunkiai palyginami. Ši fermento savybė dažniausiai nustatinėjama optimaliomis sąlygomis, todėl nustatytas greitis turėtų būti artimas maksimaliam sintezės greičiui V_{max} , kuris parodo, kiek molių substrato fermentas paverčia produktu per laiko vienetą. Vis dėlto tikrąją V_{max} reikšmę galima tik apskaičiuoti teoriškai, išmatavus reakcijos greitį esant didėjančioms substrato koncentracijoms ir pritaikius Lineweaver-Burk transformaciją (74). Šis parametras rodo maksimalų įmanomą reakcijos greitį, esant didelei substrato koncentracijai ir visoms fermento molekulėms susirišus su substratu. Polimeraziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų substratu gali būti laikoma tiek matrica, tiek įeinantys deoksinukleozidų trifosfatai. Pavyzdžiui, Arezi ir Hogrefe yra išmatavę M-MuLV AT maksimalų sintezės greitį, didindami matricos koncentraciją reakcijos mišinyje (75).

Kadangi maksimalus reakcijos greitis V_{\max} priklauso nuo baltymo koncentracijos $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E]_{\text{total}}$ (74), tiksliausiai fermento vidinę savybę – katalizinių įvykių skaičių per sekundę nurodo katalizinė konstanta k_{cat} , kartais vadinama baltymo apsisukimų skaičiumi. Priklausomai nuo eksperimento sąlygų, M-MuLV atvirkštinės transkriptazės k_{cat} , nustatyta substratu naudojant dTTP, gali svyruoti gana plačiame intervale nuo 0,13 (s^{-1}) (76) iki 2,5 (s^{-1}) (58). Palyginimui, M-MuLV AT apsisukimų skaičius yra didesnis už ŽIV-1 (76,77), bet panašus į kai kurių kitų fermentų apsisukimų skaičių (78).

M-MuLV atvirkštinė transkriptazė, kaip ir kitų retrovirusų atitinkami fermentai, pasižymi mažu tikslumu. Didelis klaidų dažnis yra būdingas daugumai polimerazių, priklausančių RNR genomą turintiems virusams. Tuo tarpu DNR virusų, tokių kaip bakteriofagas λ , polimerazės yra tikslesnės (79,80). Netiksliai vykstanti replikacija lemia didelį mutacijų kiekį virusų genomuose, kartu tai yra viena iš pagrindinių savybių, suteikianti virusams atsparumą evoliuciniam spaudimui. M-MuLV AT neturi klaidų taisymui skirto 3' – 5' egz nukleazinio aktyvumo, tačiau klaidingų nukleotidų įtraukimą į sintetinamą grandinę galėtų lemti ir kitos baltymo savybės (39). Atvirkštinių transkriptazių tikslumas matuojamas naudojant įvairius fermentinius *in vitro* arba genetinius metodus. Populiariausi fermentiniai metodai yra inkubavimas naudojant tik vieną arba tris iš keturių nukleozidų trifosfatų reakcijos mišinyje (58,59), taip pat pradmens, turinčio nesuporuotą nukleotidą, pratęsimo reakcija (76). Vykdamas šio tipo eksperimentus, reakcijos produktai analizuojami vykdamas elektroforezę poliakrilamidiniuose geliuose. Genetinio tipo metodas yra plačiai žinomas *lacZ α* komplementacijos sistemos panaudojimas (81).

Pastarajame dešimtmetyje plačiai išplitus naujos kartos sekoskaitos metodams atsiranda įvairių jų taikymų. Didelio našumo sekoskaitos platformos ir analizės algoritmai leidžia identifikuoti retas mutacijas, atsirandančias polimerazėms sintetinant nukleorūgštis, todėl yra kuriamos įvairios metodikos, pritaikančios šias galimybes fermentų tikslumui matuoti (82,83). Panaudodami naujos kartos sekoskaitos galimybes Ellefson su kolegomis išmatavo, kad M-MuLV atvirkštinė transkriptazė įveda vieną klaidingą nukleotidą kas 11000 – 48000 nukleotidų, priklausomai nuo matricos (83). Kiti autoriai, pritaikydami klasikinę *lacZ α* komplementacijos testą nustatė, kad M-MuLV AT tikslumas yra 1 klaida iš 36000, esant 0,24 mM laisvų Mg^{2+} jonų koncentracijai reakcijos mišinyje (81). Verta paminėti, kad M-MuLV AT tikslumas nepriklauso nuo Mg^{2+} jonų koncentracijos - padidinus Mg^{2+} koncentraciją iki 5,6 mM, fermento tikslumas išlieka nepakitęs. Tuo tarpu ŽIV atvirkštinės transkriptazės tikslumą stipriai lemia

metalo jonų koncentracija reakcijos mišinyje – esant 5,6 mM Mg^{2+} koncentracijai, klaidų dažnis yra 1/12000, o sumažinus Mg^{2+} koncentraciją iki 0,24 mM, klaidų dažnis sumažėja 9 kartus (81). Šis skirtumas tarp paminėtų fermentų paaiškinamas tuo, kad M-MuLV ir ŽIV atvirkštinės transkriptazės priklauso skirtingų genčių retrovirusams. M-MuLV yra onkoretrovirusas, infekuojantis ląsteles, kurioms būdingas intensyvus dalijimasis, todėl jose yra didelės dNTP ir Mg^{2+} jonų koncentracijos. Tuo tarpu ŽIV infekuoja susiformavusias imuninės sistemos ląsteles, kurioms nereikalinga daug dNTP ir metalo jonų, todėl ŽIV atvirkštinė transkriptazė tiksliai DNR sintezę vykdo tik esant mažoms Mg^{2+} koncentracijoms (76,81). Kitaip tariant, fiziologinėmis sąlygomis nustatytas ŽIV AT tikslumas yra panašus arba dar didesnis nei M-MuLV AT tikslumas.

M-MuLV atvirkštinė transkriptazė, kaip ir kitų retrovirusų analogiški fermentai, dalyvauja grandinės perkėlimo (*angl. strand transfer, strand switch*) procese. Grandinės perkėlimu vadinamas įvykis, kurio metu sintetinama DNR grandinė yra perkeliama į kitą vietą, esančią arba toje pačioje matricos molekulėje arba kitoje molekulėje. Kadangi Moloney pelių leukemijos virusas turi dvi “plius” RNR molekules, perkėlimas gali būti tiek vidumolekulinis, tiek tarpmolekulinis. Sintetinant viruso dvigrandės DNR genomą vyksta du grandinės perkėlimai (3 pav.), kuriuos sąlygoja atvirkštinės transkriptazės pristabdymas ties antrinėmis struktūromis ir RNazės H aktyvumas. Grandinės perkėlimai sintezės metu gali vykti ir atsitiktinai, spontaniškai. Tokiais atvejais jie gali būti insercijų, delecijų, duplikacijų priežastimi (39,84).

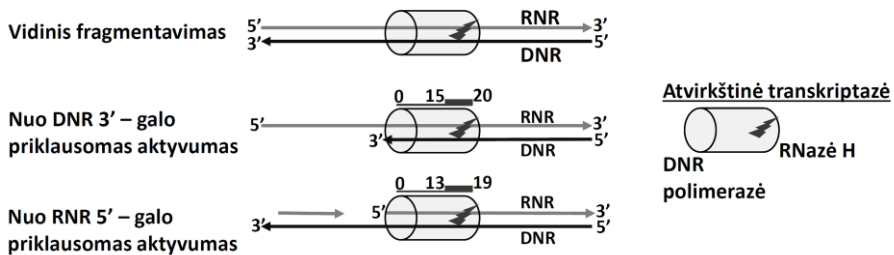
M-MuLV atvirkštinei transkriptazei taip pat būdingas grandinės nustūmimo (*angl. strand displacement*) aktyvumas, kuris, kaip ir grandinės perkėlimo aktyvumas, yra panaudojamas viruso RNR genomą paverčiant į dvigrandę DNR. Atvirkštinės transkripcijos metu RNazės H aktyvumo dėka generuojami RNR fragmentai; kai kurie iš jų dėl ilgio ne visada lengvai disocijuoja nuo matricos, todėl sintetinant DNR grandinę šie fragmentai turi būti nustumiami. Taip pat nuo matricos grandinės gali būti pašalinami ir DNR fragmentai. M-MuLV atvirkštinei transkriptazei sintetinant DNR molekulę *in vivo* sąlygomis, grandinės nustūmimo procese dalyvauja ir paties viruso nukleokapsidės baltymas NC (nucleocapsid). Cinko pirštų motyvų dėka šis baltymas sąveikauja su nukleorūgščių grandinėmis ir palengvina grandinės nustūmimo procesą. NC baltymo pridėjimas į reakcijos mišinį *in vitro* pagerina DNR ir RNR grandinės nustūmimo greitį atitinkamai 1,7 ir 2 kartus (85). Nenaudojant pagalbinio baltymo, M-MuLV atvirkštinė transkriptazė taip pat gana efektyviai sugeba nustumti tiek RNR, tiek DNR fragmentus. Nors

reakcijos greitis, nustatytas atvirkštinei transkriptazei vykdant grandinės nustūmimą yra gerokai mažesnis nei nustatytas nesant kliūčių ant matricos, vis dėlto fermentas vykdydamas grandinės nustūmimą sugeba susintetinti ilgesnius nei 0,5 kb ilgio fragmentus. Įdomu pastebėti, kad sintezė vykdoma nustumiant RNR grandinę vyksta 5 – 6 kartus lėčiau palyginus su reakcija, kurios metu nustumiamą DNR grandinę (85). Su DNR ar RNR fragmentais, atsidūrusiais prieš atvirkštinę transkriptazę, sąveikauja baltymo pirštų subdomenui priklausančios aminorūgštys. Buvo parodyta, kad šiam subdomenui priklausančios Y64 aminorūgštis pakeitimas panaikina grandinės nustūmimo aktyvumą (55,56).

Atvirkštinių transkriptazių RNazės H aktyvumas yra lokalizuotas atskirame domene (4 pav.). Šio endonukleazinio aktyvumo dėka atvirkštinės transkriptazės skaido RNR grandinę, esančią DNR – RNR heteroduplekse. RNR skaidoma į trumpesnius oligoribonukleotidus, paliekant 5' – fosfato ir 3' – hidroksilo grupes. Tokie oligoribonukleotidai yra atvirkštinės transkriptazės substratas vykdant „plius“ grandinės sintezę (3 pav.). Kaip jau minėta, RNazės H aktyvumui yra būtini divalenčio metalo jonai, kuriuos koordinuoja domeno aktyviame centre esančių asparto ir glutamo aminorūgščių liekanos. RNazė H atsitiktinai įveda trūkius tarp bet kurių ribonukleotidų RNR grandinėje, o RNR-DNR jungtį hidrolizuoja dažniausiai palikdama vieną ribonukleotidą (86). Pavyzdžiui, pašalinant tRNR pradmenį M-MuLV RNazė H dažnai palieką vieną ribonukleotidą susintetintos plus DNR grandinės 5' gale. Tuo tarpu M-MuLV atvirkštinei transkriptazei pratęsus PPT pradmenį (3 pav.), susidariusi RNR-DNR jungtis yra hidrolizuojama tiksliai, nepaliekant ribonukleotido DNR grandinėje (87).

Yra išskiriami trys RNazės H veikimo būdai, priklausantys nuo to, kaip atvirkštinė transkriptazė sąveikauja su DNR/RNR hibridu. Vykstant DNR grandinės sintezei, atvirkštinės transkriptazės polimerazės domenas sąveikauja su DNR pradmens 3' – galu. Tokiu atveju RNazės H domenas atsiduria 15 – 20 nukleotidų atstumu nuo pradmens 3' galo ir įveda trūkius RNR grandinėje (8 pav.). Vykstant DNR sintezei, trūkia RNR grandinėje įvedami retai, vidutiniškai kas 100 nukleotidų. Tokio RNazės H aktyvumo nepakanka, kad RNR grandinė būtų pilnai suskaidyta, nes susidarę RNR fragmentai nedisocijuoja nuo DNR. Žinoma, susidarančių RNR fragmentų ilgis priklauso nuo RNR molekulėje esančių antrinių struktūrų, kurios gali pristabdyti atvirkštinę transkriptazę sintezės metu (86). Vykdam atvirkštinės transkripcijos reakciją susidarantys ilgi RNR fragmentai, nedisocijuojantys nuo susintetintos DNR grandinės, gali būti pašalinti pasitelkiant nuo RNR 5'-galo priklausomą RNazės H veikimo būdą (8 pav.). Šiuo atveju M-MuLV AT

polimerazinis domenas sąveikauja su DNR grandine ties RNR fragmento 5' – galu, o RNazės H domenas įveda trūkius 13 – 19 nukleotidų atstumu nuo polimerazės domeno, nors aptinkama ir trumpesnių hidrolizės produktų, atsirandačių greičiausiai dėl fermento pasislinkimo link DNR grandinės 3' – galo. Atvirkštinės transkriptazės sąveikai su RNR fragmento 5' – galu reikalingas bent dviejų nukleotidų ilgio tarpas tarp RNR fragmentų. RNazės H aktyvumui iš dalies būdingas ir specifiskumas sekai, teikiama pirmenybė tam tikriems nukleotidams, esantiems +1 ir -2 pozicijose hidrolizuojamos jungties atžvilgiu (88). Šalia šių dviejų RNazės H veikimo būdų yra ir vidinės hidrolizės būdas (8 pav.). Atvirkštinei transkriptazei nebūtina sąveikauti su DNR pradmeniu ar RNR fragmento galu, ji gali susirišti ir su pilnai dvigrandžiu DNR-RNR hibridu ir RNazės H aktyvumo dėka hidrolizuoti RNR grandinę (86).



8 pav. Trys veikimo aktyvumai, būdingi atvirkštinių transkriptazių RNazės H domenui. RNR grandinė gali būti skaidoma atsitiktinai sekos viduje, taip pat RNazės H domenas gali būti nukreipiamas į RNR grandinę priklausomai nuo “paslėpto” DNR 3' – galo arba RNR 5' – galo. Parengta pagal (39).

Apibūdinant M-MuLV atvirkštinę transkriptazę svarbu paminėti ir kitas baltymo savybes, nesusijusias su polimerazės aktyvumu – tai sąveikos su substratu stiprumas ir termostabilumas. M-MuLV atvirkštinė transkriptazė yra mezofilinis baltymas. Naudojant laukinio tipo fermentą, atvirkštinė transkripcija *in vitro* vykdoma dažniausiai 37°C arba 42°C temperatūroje (85,89,90). Didžiausią polimerazinį aktyvumą laukinio tipo fermentas, vykdydamas kDNR sintezę, pasiekia 42 – 43 laipsnių temperatūroje (66,91). Tuo tarpu mutantinės atvirkštinės transkriptazės, neturinčios RNazės H aktyvumo, optimali reakcijos temperatūra yra keturiais laipsniais aukštesnė. Parodyta, kad laukinio tipo M-MuLV AT gyvavimo puslaikis 50°C temperatūroje nesiekia nė 3 minučių ir praktiškai nepriklauso nuo to, ar reakcijos mišinyje yra matricos. RNazės H „minus“ mutanto gyvavimo

puslaikis nesant matricos yra labai panašus į laukinio tipo baltymo, tačiau į reakcijos mišinį pridėjus DNR-RNR hibrido, gyvavimo puslaikis pailgėja 3 kartus (66). Termostabilumo padidėjimas sąveikaujant su ligandu ar substratu yra būdingas daugumai baltymų (92), o sąveikos stiprumas turėtų koreliuoti su termostabilumo padidėjimu. Tačiau abiejų M-MuLV AT variantų sąveikos su substratu stiprumas yra panašus, todėl termostabilumų skirtumas paaiškinamas tuo, kad laukinio tipo fermentas RNazės H aktyvumo dėka skaido DNR-RNR hibride esančią RNR grandinę, kitaip tariant, sunaikina substratą (66). M-MuLV atvirkštinė transkriptazė sąveikauja ne tik su DNR-RNR hibridu, bet ir su kitų tipų nukleorūgštimis – RNR, viengrande ir dvigrande DNR. Stipriausia šio baltymo sąveika yra su RNR pradmens – RNR matricos sistema, o silpniausia sąveika yra su viengrande RNR – K_d atitinkamai yra 1 nM ir 22 nM (66).

1.2 Baltymų *in vitro* evoliucijos metodų apžvalga

Gamtoje randami baltymai ilgus metus trukusios evoliucijos dėka yra gerai prisitaikę vykdyti savo biologines funkcijas. Dalis iš jų, daugiausia fermentai, naudojami įvairiose šiuolaikinės biologijos, medicinos, biotechnologijos, diagnostikos srityse. Vis dėlto gamtoje randamų baltymų charakteristikos dažnai nėra optimalios minėtiems taikymams. Be to, didėjant metodų ir taikymų įvairovei, reikalingos ir visiškai naujos, gamtoje iki šiol neaptinkamos savybės.

Svarbią reikšmę šiuolaikiniuose gamtos moksluose užima DNR polimerazės, naudojamos sintetinti DNR ar RNR kopijas. Daugybė metodų neįsivaizduojami be polimerazės grandininės reakcijos, kuriai reikalingos termofilinės nuo DNR priklausomos DNR polimerazės. DNR polimerazės plačiai taikomos molekulinuose klonavimuose, klasikinėje ir naujos kartos sekoskaitoje, vieno nukleotido analizės metoduose, diagnostikoje (93). Atvirkštinės transkriptazės, sintetinančios DNR kopijas nuo RNR, naudojamos tiek kokybinėje RNR analizėje, tiek kiekybinėje AT-PGR.

Įvairiems metodams reikalingos skirtingos DNR polimerazių savybės – tikslumas, procesyvumas, termostabilumas. Molekulinio klonavimo eksperimentuose naudojami fermentai turėtų pasižymėti dideliu tikslumu padauginant ilgas DNR matricas. Kitiems metodams gali būti reikalingos DNR polimerazės, pasižyminčios stipriu DNR grandinės nustūmimo efektyvumu ar procesyvumu, taip pat pakeistu specifiškumu substratui. Dėl šios priežasties yra išvystyta įvairių metodų, skirtų modifikuoti baltymus, tokiu būdu tobulinant jų savybes.

1.2.1 *In vivo* ir *in vitro* atrankos metodų samprata

Egzistuoja dvi pagrindinės baltymų modifikacijos kryptys: cheminė ir genetinė. Cheminės modifikacijos principas – įvairių funkcinių grupių prijungimas prie baltymo aminorūgščių šoninių grandinių keičia baltymo savybes. Cheminės modifikacijos metu baltymo aminorūgščių seka išlieka nepakitusi. Tuo tarpu vykdant genetinę modifikaciją atliekamas baltymą koduojančio geno sekos pakeitimas, kuris lemia baltymo aminorūgščių sekos pokyčius. Gauti baltymai pasižymi kitokiomis savybėmis, palyginti su laukinio tipo baltymu.

Vienas iš genetinės baltymų modifikacijos būdų yra racionalus dizainas, arba kryptinga mutagenėzė, kurią vykdant įvedamos mutacijos į tam tikras iš anksto numatytas baltymą koduojančio geno vietas. Vis dėlto, norint sėkmingai keisti baltymo savybes šiuo metodu, dažnai reikalinga geros skiriamosios gebos baltymo tretinė struktūra, kurioje baltymas turėtų būti užfiksuotas sąveikaujantis su substratu, produktu ar inhibitoriaus molekule. Pastaraisiais metais populiarėja įvairūs kompiuterinio modeliavimo metodai, kuriais remiantis galima pagrįstai numatyti, kokius pakeitimus baltymo sekoje ir struktūroje reikia atlikti, norint pagerinti tam tikras savybes (2,3,94,95,96).

Šalia kryptingos mutagenėzės yra ir kitas baltymų tobulinimo būdas, vadinamas kryptinga evoliucija, arba *in vitro* evoliucija. Plačiaja prasme, *in vitro* evoliucija vadinami bet kokie laboratorijoje taikomi metodai, skirti atrinkti pageidaujamomis savybėmis pasižyminčius baltymus arba nukleorūgštis (97). Priešingai nei kryptingos mutagenėzės atveju, kryptingos evoliucijos metodų taikymui dažniausiai nebūtinai nuodugnios tretinės struktūros turėjimas ar gilus supratimas apie baltymo struktūros ir funkcijos ryšį. Kryptingos evoliucijos metodai pasižymi tuo, kad leidžia iš didelės atsitiktinai sugeneruotų mutantinių baltymų įvairovės atrinkti tinkamiausius konkrečioms sąlygoms variantus.

Evoliuciją galima apibūdinti kaip laipsnišką procesą, kurio metu dėl išorinio poveikio kinta populiacijos narių, turinčių tam tikrus paveldimus bruožus, dažnis. Evoliucijos varomoji jėga yra pasikartojantys kintamumo, paveldimumo ir atrankos ciklai. Šis principas galioja ne tik klasikinėje Darvinistinėje evoliucijos sampratoje, tačiau gali būti perkeliamas ir į molekulinį lygį bei pritaikomas tam tikroms molekulių funkcijoms evoliucionuoti. Evoliucijos metodais modifikuojamos DNR, RNR ir baltymų molekulės (97).

Baltymų evoliucijos eksperimentas susideda iš dviejų pagrindinių etapų: mutantų bibliotekos gavimo ir atrankos. Sėkmingam evoliucijos

eksperimentui reikalinga tokia mutantų biblioteka, kurioje yra pakankamai baltymo variantų, atitinkančių atrankos reikalavimus. Kita sėkmingai evoliucijai būtina sąlyga – efektyvus atrankos metodas, leidžiantis atrinkti norimų savybių baltymus, susietus su juos koduojančiomis nukleorūgštimis. Kitaip tariant, atrankos metu turi išlikti genotipo-fenotipo ryšys (98,99,100,101). Genotipo-fenotipo ryšys yra būtinas evoliucionuojant baltymus, nes baltymai negali būti amplifikuojami, galima amplifikuoti tik jų genus.

Gamtoje genotipas ir fenotipas yra susiję dėl to, kad tiek genai, tiek baltymai yra ląstelės viduje, nuo aplinkos fiziškai atskirti ląstelės membrana. Šia sąlyga remiasi *in vivo* metodai – bakterijų kolonijų atrinkimas pagal jų išorinius požymius arba pagal augimą ant auksotrofinės terpės. Tačiau tokių *in vivo* metodų neįmanoma naudoti kai kuriomis sąlygomis, pavyzdžiui, neįmanoma vykdyti atrankos tokiomis sąlygomis, kokiomis neauga ląstelės, sudėtinga atrinkinėti baltymus, kurie yra toksiški, o ypač *in vivo* metodų galimybes riboja žemas ląstelių transformacijos efektyvumas (bibliotekos dydis dažniausiai būna ne didesnis negu 10^7) (102).

Dėl šių priežasčių pastaraisiais metais dažniau naudojami *in vitro* evoliucijos metodai, galintys išspręsti minėtus trūkumus. *In vitro* sąvoka šiuo atveju vartojama siaurąja prasme, pabrėžiant, kad šiems metodams nebūdingas transformacijos etapas. *In vitro* metodų pagrindinis bruožas yra tas, kad mutantinių baltymų sintezei naudojamos ne ląstelės, o transliacijos, arba kartais transkripcijos - transliacijos sistemos, pagamintos iš *E. coli*, mielių ar kviečių gemalų ekstraktų. Pagrindinis *in vitro* metodų privalumas yra tas, kad, išvengiant ląstelių transformacijos, galima analizuoti žymiai didesnes bibliotekas – kartais net iki 10^{11} - 10^{13} molekulių (101,102). Bibliotekos dydį riboja nebent tirpalo tūris, telpantis į mėgintuvėlį. Be to, atranką galima vykdyti tokiomis sąlygomis, kurios netinka ląstelėms augti – galima naudoti minorines aminorūgštis, ekstremalias temperatūras, pH reikšmes. Tačiau šiomis sąlygomis genotipo-fenotipo ryšys turi būti pakankamai atsparus ir nesuirti (99,101).

1.2.2 Bibliotekos ruošimo būdai

Evoliucijos eksperimentas prasideda genų bibliotekos, koduojančios mutantinius baltymus, ruošimu. Kadangi aminorūgščių įvairovė yra didelė, palyginus su nukleotidų įvairove, neįmanoma paruošti bibliotekos, kuri turėtų visas galimas baltymų sudarančių aminorūgščių kombinacijas. Be to, iš visiškai atsitiktinių sekų sudaryta biblioteka turėtų nykstamai mažą dalį

mutantų, pasižyminčių fermentiniu aktyvumu ir dar mažiau mutantų, tenkinančių atrankos sąlygas. Dėl šios priežasties yra sukurta keletas strategijų, kaip paruošti optimalią genų biblioteką, kurioje būtų tiek užtikrintas didelis variantiškumas, tiek pakankamas aktyvių mutantų kiekis.

Žvelgiant istoriškai, seniausi būdai, skirti mutacijų įvedimui yra cheminiai reagentai arba fizinis poveikis. Pagrindiniai cheminiai junginiai, naudojami šiuo tikslu yra alkilinantys reagentai poliamidai (103), etilo metano sulfonatas (104), deamininantis reagentas azoto rūgštis, depurinantis reagentas skruzdžių rūgštis ir kiti junginiai - hidrazinas, natrio bisulfitas (105). Iš fizinių poveikių stiprią reikšmę DNR mutacijų įvedimui turi ultravioletinė spinduliuotė (106). Šie klasikiniai mutacijų įvedimo metodai vis dėlto pasižymi tam tikru mutacijų spektro tendencingumu (103,104).

Pastaruoju metu dažniausiai naudojami bibliotekų ruošimo būdai remiasi ne cheminėmis, o fermentinėmis reakcijomis. Šiai kategorijai galima priskirti *in vivo* mutagenezės metodus, kuriuos taikant pasinaudojama replikacijos fermentų įvedamomis klaidomis. Šiuo tikslu yra sukurta specialių mikroorganizmų kamienų, pasižyminčių dideliu spontaniškų mutacijų dažniu. Pavyzdžiui, *E. coli* XL-1 red kamienas sukurtas taip, kad replikacijos metu įvedamų klaidų dažnis daugiau nei 3000 kartų didesnis, palyginus su laukinio tipo kamieniu (107). Pagrindinis šio mutagenezės būdo trūkumas yra tas, kad replikacijos metu klaidos įvedamos ne tik į genų biblioteką, bet ir į šeimininko genomą. Šeimininko ląstelė gali toleruoti tik tam tikro lygio mutacinį foną, todėl taikant šį metodą galima pasiekti sąlyginai nedidelį pakeitimų kiekį tikslinėje bibliotekoje (101).

Minėtus *in vivo* metodų trūkumus daugeliu atvejų kompensuoja *in vitro* mutagenizacijos būdai, kurių įvairūs variantai buvo sukurti po polimerazės grandininės reakcijos atradimo. Šių metodų principas – PGR sąlygų pakeitimas, padidinantis į sintetinamą DNR grandinę klaidingai įtraukiamų nukleotidų kiekį. PGR sąlygos gali būti keičiamos įvairiškai – didinant Mg^{2+} jonų koncentraciją, pridėdant kito divalenčio metalo Mn^{2+} jonų, didinant polimerazės koncentraciją, prailginant reakcijos laiką, išbalansuojant dNTP sudėtį (108) ar naudojant dNTP analogus (109). Kadangi reakcijos metu mutacijos kaupiasi sulig kiekvienu ciklu, klaidų kiekį bibliotekoje galima padidinti ir vykdant daugiau PGR ciklų (101). Ruošiant genų bibliotekas, dažnai svarbu yra tolygus mutacijų pasiskirstymas per visą geno seką, o taip pat optimalus tranzicijų ir transversijų santykis. Bibliotekų ruošimui naudojamos DNR polimerazės pasižymi tam tikru tendencingumu įvedant mutacijas, todėl optimaliam mutacijų spektrui dažnai parenkamas

„išbalansuotas“ reakcijos mišinys, kuriame dNTP koncentracijos nėra vienodos (101).

Naudojant įvairius mutagenizacijos būdus paruoštos bibliotekos yra sudarytos iš narių, kurių didžioji dalis turi žalingas mutacijas – koduoja netirpius, nestabilius ar funkciškai neaktyvius baltymus, turi įvestus STOP kodonus ar skaitymo rėmelio poslinkio mutacijas. Dėl šios priežasties, norimų savybių baltymams atrinkti dažnai reikalingos didelės bibliotekos. Norint sukurti mažesnes savo apimtimi, tačiau kokybiškesnes bibliotekas, praturtintas aktyviais baltymo variantais, prieš vykdant atrankos eksperimentą yra patikrinamas bibliotekos narių funkcionalumas. Tiriamąjį baltymą koduojančių genų biblioteka suliejama su reporterio, dažniausiai GFP (green fluorescent protein) genu. Įvykdžius transkripciją ir translaciją, pagal GFP fluorescenciją atrenkami tik aktyvūs bibliotekos nariai, kurie nuo laukinio tipo baltymo skiriasi tuo, kad turi sukaupę įvairių neutralių mutacijų. Keletą kartų pakartojant mutagenizacijos ir atrankos etapus, gaunama biblioteka, praturtinta neutraliomis mutacijomis, kurios padės baltymui „išgyventi“ taikant evoliucinį spaudimą atrankos eksperimento metu (110).

Idealiu atveju, atsitiktinės mutagenezės metu įvedamos taškinės mutacijos, tam tikru dažniu tolygiai pasiskirsčiusios per visą geną. Tokio tipo bibliotekos dažniausiai kuriamos, kai yra nedaug informacijos apie tiriamojo baltymo struktūrinės ir biocheminės savybes. Vis dėlto kai kurie baltymai gali būti pakankamai gerai charakterizuoti, todėl įmanoma nesunkiai nusakyti aminorūgštis, kurios įeina į aktyvųjį centrą ar atsakingos už sąveiką su substratu. Pagrįstai manant, kad norimas savybes evoliucijos eksperimente dalyvaujančiam baltymui galima suteikti keičiant būtent šias aminorūgštis, kartais tikslinga sukurti didesnę mutacijų įvairovę atitinkamuose kodonuose. Šiuo tikslu naudojami įvairūs kryptingos mutagenezės būdai. Paprasčiausias metodas kryptingai mutagenizei yra oligonukleotidų, savo sekoje turinčių įvairių kodonų mišinį, panaudojimas. Oligonukleotidai, turintys pakeistus kodonus, gali būti įterpiami tiek taikant klasikinius metodus, kuriuose naudojamos restrikcijos endonuklezės ir ligazės (111), tiek įvairius *in vitro* rekombinacija ar PGR pagrįstus metodus (112,113).

Kryptingos mutagenezės metodai yra skirti praturtinti biblioteką potencialiai naudingomis mutacijomis, kurios gali būti numatomos ne tik turint baltymo tretinę struktūrą, bet ir lyginant tiriamąjį baltymą su jo sekų homologais. Homologiškuose baltymuose esančios mutacijos yra gamtinės evoliucijos rezultatas, šių mutacijų įvedimas į tiriamojo baltymo biblioteką padidina baltymo evoliucinį potencialą ir leidžia tikėtis sėkmingos atrankos eksperimento baigties. Pavyzdžiui, buvo pademonstruota, kad kombinuojant homologiškų mezofilinių baltymų sekas,

galima sukurti fermentą, kurio lydymosi temperatūra (T_m), palyginus su laukinio tipo baltymu yra didesnė 16°C (114). Ruošiamas bibliotekas praturtinti mutacijomis, kurios galėtų suteikti baltymui naujų savybių galima ir atliekant filogenetinę analizę (115). Be šių būdų pastaraisiais metais sparčiai tobulėjantys molekulinio modeliavimo metodai taip pat gali sėkmingai prognozuoti, kurie aminorūgščių pakeitimai galėtų stabilizuoti baltymo tretinę struktūrą, suteikti termostabilumo ar keisti specifiskumą substratui. Šie metodai pagrįsti hidrofobinės ir elektrostatinės sąveikos, vandenilinių ryšių ir erdvinių efektų skaičiavimu (116).

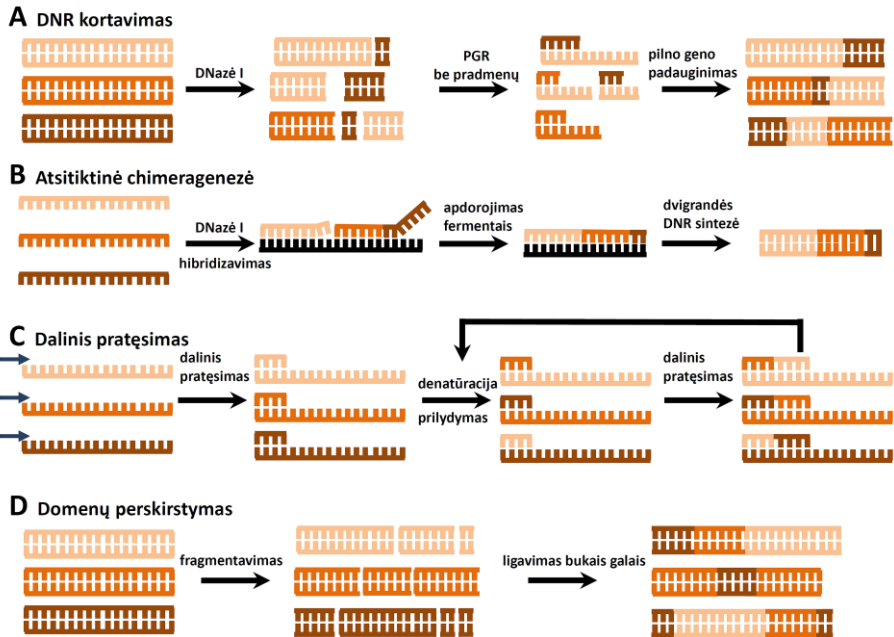
Vienas iš svarbiausių gamtoje vykstančio evoliucijos proceso veiksmų yra homologinė rekombinacija, kurios dėka vyksta mutacijų persiskirstymas tarp DNR molekulių. Homologinės rekombinacijos principu remiasi ir nemaža dalis mutantų bibliotekų ruošimo būdų. Atliekant homologinę rekombinaciją *in vitro* sąlygomis, reikia sukurti DNR fragmentų įvairovę, iš kurios galima gauti naujus geno variantus. Vienas iš būdų įvairovei sukurti yra DNR fragmentavimas naudojant fermentą deoksiribonukleazę I. Gauti DNR fragmentai naudojami vykdant PGR, kurios metu susirenka pilno ilgio genas (9 pav.). Toks *in vitro* rekombinacijos būdas, vadinamas DNR kortavimu (*angl. DNA shuffling*), buvo panaudotas ruošiant biblioteką prieš antibiotikui atsparesnių β – laktamazės variantų atranką. Buvo pademonstruota, kad bibliotekos konstravimui pasitelkiant DNR kortavimą, galima gauti β – laktamazės mutantus, kurie iki 32000 kartų atsparesni antibiotikui, palyginus su laukinio tipo baltymu. Naudojant klaidingos PGR būdu paruoštą biblioteką, atrinkti fermentai buvo tik iki 16 kartų atsparesni, palyginus su pradiniu variantu (117).

DNazė naudojama ir taikant kitą homologinę rekombinaciją pagrįstą metodą – atsitiktinę chimeragenezę (RACHITT, *angl. random chimeragenesis on transient templates*). Ruošiant bibliotekas šiuo metodu, dvigrandė tikslinę baltymą koduojanti DNR paverčiama į viengrandę; apatinei grandinei suskaidyti naudojama lambda egzonukleazė. Susidariusi viengrandė DNR fragmentuojama naudojant DNazę I. Fragmentai prilydomi prie komplementarios grandinės, kuri prieš tai paruošiama įvedant uridiną. Komplementari grandinė tarnauja kaip griaučiai pilno ilgio geno susirinkimui. Prie komplementarios grandinės nesihybridizuojantys fragmentų 5' ir 3' galai suskaidomi naudojant Taq DNR polimerazės 5' – 3' egzonukleazinį ir Pfu DNR polimerazės 3' – 5' egzonukleazinį aktyvumus. Pfu DNR polimerazė taip pat panaudojama atsirandančių tarpų užpildymui, o fragmentai sujungiami naudojant Taq DNR ligazę. Apatinė grandinė suskaidoma naudojant uracil – DNR glikozilazę, po to vykdant PGR padauginami susidarę chimeriniai geno variantai (118).

Ruošiant bibliotekas atsitiktinės chimeragenezės metodu, naudojama daug fermentinių stadijų. Be to, fragmentavimui naudojant DNazę gana sunku kontroliuoti susidarančių fragmentų dydį, todėl yra sukurta metodų, kuriuos taikant išvengiama šio fermento naudojimo. Pavyzdžiui, ruošiant bibliotekas NExT (*angl. nucleotide exchange and excision technology*) būdu, tikslinis genas amplifikuojamas į PGR mišinį dedant nedidelę dalį uridino trifosfato. PGR produktas fragmentuojamas naudojant uracil DNR glikozilazę ir veikiant piperidinu arba NaOH tirpalu. Susidarančių fragmentų ilgis priklauso nuo uridino trifosfato dalies PGR metu. Išgryninti fragmentai naudojami vykdant PGR, kurios metu susirenka pilno ilgio tikslinio geno biblioteka (119). Įvairaus ilgio fragmentų mišinį galima gauti ir modifikuojant PGR temperatūrinį režimą (120). Taikant šį metodą (StEP, *angl. staggered extension process*), elongacija vykdoma labai trumpą laiką (~5 sekundes), per kurį DNR polimerazė nespėja susintetinti pilno ilgio geno kopijos. Denatūracijos ir prilydymo etapai keičiami, kol susintetinamas pilno ilgio genas. Kiekvieno PGR ciklo metu fragmentai prisilydo prie kitos matricos molekulės, dėl to sukuriami mutantinių genų įvairovė.

Į atskirą grupę reikėtų išskirti bibliotekų ruošimo metodus, kuriuose, priešingai nei aukščiau aptartuose, neišlaikoma sekų homologija. Taikant šiuos būdus ruošiamos radikalios baltymus koduojančių genų bibliotekos, nesilaikant baltymo domenų ilgio ir išdėstymo tvarkos. Pavyzdžiui, naudojant šiai grupei priskiriamą ITCHY (*angl. incremental truncation for the creation of hybrid enzymes*) metodą, tikslinis genas fragmentuojamas veikiant egzozonukleazę III, turinčia 3'-5' egzozonukleazinį aktyvumą, S1 nukleazę, kurios substratas yra viengrandė DNR ir Klenovo DNR polimerazė. Tokiu būdu gaunami bukagaliai dvigrandės DNR fragmentai, kurie atsitiktinai sujungiami naudojant DNR ligazę. Taip paruošiama chimerinius baltymus koduojančių genų biblioteka (121). Suprantama, kad ITCHY metodu paruoštoje bibliotekoje didžiausia genų dalis koduoja neaktyvius ar nestabilius baltymus. Dėl šios priežasties, verta atkreipti dėmesį į bioinformatikos duomenis ir, fragmentuojant genus, išlaikyti struktūriškai ir funkciškai sveikus baltymo domenus, kuriuos sujungiant galima gauti genų biblioteką, koduojančią žymiai daugiau aktyvių baltymų (122).

Pastaruoju metu stipriai atpigus DNR sintezės kaštams vis dažniau pasirenkama užsakyti genų bibliotekos paruošimą kompanijose, kurios teikia genų sintezės paslaugą. Šiuo atveju įmanoma išvengti spontaniško STOP kodonų atsiradimo, taip pat galima tiksliai kontroliuoti mutacijų dažnį ir spektrą. Pagrindinės bibliotekų ruošimo strategijos apžvelgtos 9 pav.

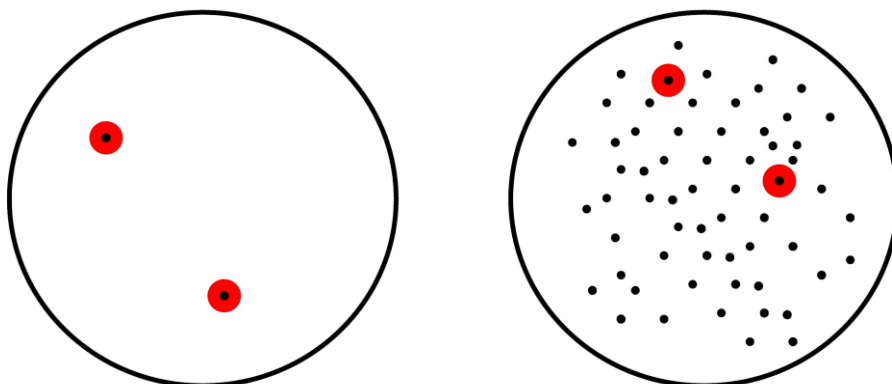


9 pav. Homologine rekombinacija paremti bibliotekų ruošimo būdai. A – DNR kortavimo metodas. Genai fragmentuojami naudojant DNazę I, po to vykdoma PGR, naudojant gautus DNR fragmentus. Prilydymo metu fragmentai hibridizuojasi tarpusavyje ir tarnauja kaip pradmenys. Šios reakcijos metu susidaro pilno ilgio rekombinantiniai genai. B – Atsitiktinė chimeragenezė. Dvigrandė DNR paverčiama į viengrandę, suskaidant apatinę grandinę. Viršutinė grandinė fragmentuojama naudojant DNazę I, o susidarę fragmentai prilydomi ant matricos, kuri paruošta įvedant uridiną. Prisilydžiusių fragmentų nekomplementarūs matricai galai apdorojami panaudojant Taq DNR polimerazės 5' – 3' egzonukleazinį bei Pfu polimerazės 3' – 5' egzonukleazinį aktyvumus. Fragmentai sujungiami naudojant Taq DNR ligazę. Apatinė grandinė, tarnaujanti kaip matrica, suskaidoma naudojant uracil – DNR glikozilazę, po to vykdam PGR padauginami pilno ilgio rekombinantiniai genai. C – Dalinio pratęsimo metodas. PGR metu pratęsimo stadija vykdoma labai trumpai, dėl ko DNR polimerazė nespėja susintetinti pilno ilgio geno. Po denatūracijos, susidarę fragmentai prilydomi prie kitos matricos molekulės, dėl to sukuriama mutantinių genų įvairovė. D – domenų perskirstymo metodas. Genai fragmentuojami naudojant egzonukleazės III ir S1 nukleazės fermentinius aktyvumus. Susidarę bukagaliai fragmentai liguojami atsitiktine tvarka, sukuriant mutantinius genus, kuriuose pakeista domenų išsidėstymo tvarka. Parengta pagal (101,117,118,120,121).

1.2.3 Baltymų *in vitro* evoliucijos pagrindinės strategijos

Kaip minėta 1.2.1. skyrelyje, baltymų evoliucijos metodus galima skirstyti keleriopu pagrindu. Vyraujantis skirstymo būdas remiasi tuo, kokiomis sąlygomis yra užtikrinamas genotipo – fenotipo ryšys. *In vivo* metodams būdingas genotipo – fenotipo ryšio išlaikymas ląstelės viduje, o *in vitro* (siaurąja prasme) metodams būdinga tai, kad genotipo – fenotipo ryšys išlaikomas neląstelinėse sistemose, kitaip tariant, mėgintuvėlyje. Kitas skirstymo būdas yra skirstymas tarp atrankos ir patikros. Tiek *in vivo*, tiek *in vitro* principais išlaikant genotipo – fenotipo ryšį, galima vykdyti ir atranką, ir patikrą.

Baltymų, pasižyminčių pageidaujamosiomis savybėmis, paiešką galima vykdyti dviem būdais: tikrinti visus bibliotekos narius, ieškant tarp jų tokių mutantų, kurie turėtų tinkamas savybes arba sudarant tam tikras sąlygas atmesti netinkamus mutantus, paliekant nedidelį geriausių savybėmis pasižyminčių variantų kiekį. Visų bibliotekos variantų tikrinimo būdas vadinamas didelės apimties patikra (high-throughput screening, HTS), kitas būdas vadinamas atranka arba selekcija. Skirtumą tarp šių strategijų galima pavaizduoti paprastu pavyzdžiu – atranka būtų vadinamas toks metodas, kuris leidžia ant Petri lėkštelės augti toms ląstelėms, kurios skaido terpėje esantį augimo inhibitorių, o patikra būtų vadinamas metodas, kurio metu iš visos ląstelių populiacijos ieškoma tam tikrą požymį turinčių ląstelių (10 pav.).



10 pav. Atrankos (selekcijos) ir patikros skirtumų iliustracija. Vykdyt atranką, ant selektyvios terpės užauga tik reikiamas savybes turintį baltymą ekspresuojančios ląstelės (kairėje). Vykdyt patikrą, tarp visų ląstelių ieškoma tų, kurios ekspresuoja reikiamas savybes turintį baltymą (dešinėje). Parengta pagal (99).

Sąlygų, reikalingų atrankai, sukūrimas vadinamas evoliuciniu spaudimu. Spaudimu gali būti reakcijos temperatūros kėlimas, laiko trumpinimas, inhibitoriaus koncentracijos didinimas. Didelės apimties patikros istorinė pradžia galima laikyti 96 šulinėlių ar didesnio formato plokštelės naudojimą, taip pat lėkštelių su agarizuota terpe tikrinimą. Šie metodai reikalauja daug rankų darbo ir nėra tinkami didelės apimties bibliotekų tikrinimui, todėl pasitelkiant šiuolaikinius inžinerinius sprendimus buvo išplėtos modernius robotus ir programinę įrangą naudojančios automatinės patikros sistemos, sugebančios išanalizuoti milijonus bibliotekos variantų per valandą.

Didelės apimties bibliotekų automatizuotam tikrinimui pirmausia buvo pritaikyta FACS (*angl. fluorescence-activated cell sorting*) technologija. FACS naudojimui yra būtina sukurti reakcijų grandinę, kurios rezultatas būtų fluorescencinio signalo atsiradimas. Naudojant FACS įmanoma rūšiuoti ne tik ląsteles, tačiau ir emulsijas (11 pav.). Tai reiškia, kad išvengiant transformacijos etapo ir atsisakant nepatogių eksperimentų su ląstelėmis įmanoma patikrinti didesnes bibliotekas (100,123).

Pagrindiniai FACS technologijos taikymo trūkumai yra didelė aparatūros bei programinės įrangos kaina. Be to, naudojant ląstelių rūšioklius galima tirti tik hidrofilines vanduo/alyva/vanduo tipo emulsijas (7).

Tas pats FACS technologijos principas, t.y. reakcijos mišinyje esančio fluorogeninio substrato pavertimas fluoroforu ir lašelių atrinkimas nuskaitant susidarantį signalą, buvo perkeltas į mikroskysčių gardeles ir pritaikytas lašelių, kuriuose įkapsuliuoti biblioteką sudarantys genai ir jų produktai, rūšiavimui. Sukurta technologija vadinama FADS (*angl. fluorescence-activated droplet sorting*). Pastaruoju metu konstruojamuose FADS įrenginiuose galima rūšiuoti įvairių tipų emulsijas (vanduo/alyva, alyva/vanduo, vanduo/alyva/vanduo), didelio greičio kameromis galima užfiksuoti kiekvieną lašelį, be to, FADS įrenginiai yra žymiai pigesni už ląstelių rūšioklius (7).

Į mikroskysčių gardelę integravus optinę sistemą, galima registruoti lašeliuose susidariusių reakcijų produktų absorbciją. Šiuo principu pagrįsta AADS (*angl. Absorption-activated droplet sorting*) technologija buvo pritaikyta didesnio aktyvumo fenilalanino dehidrogenazių atrankai (124,125). Kadangi daugumai organinių junginių būdinga ultravioletinio arba regimojo ruožo bangų sugertis, ši technologija ateityje gali įgyti platų pritaikymą (7).

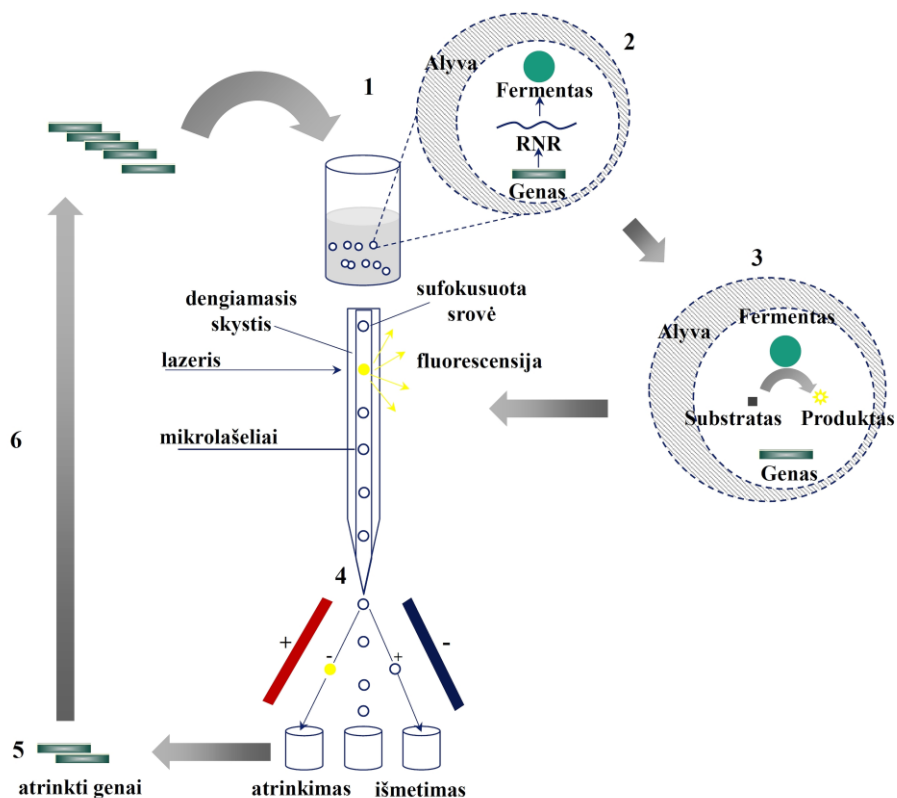
Pastaruoju metu kuriamos naujos emulsijų rūšiavimo technologijos, pagrįstos lašeliuose vykstančių reakcijų metu susidarančių produktų fizikinėmis ar cheminėmis savybėmis. Taikant šį principą, nėra reikalo sukurti

specialias reakcijų grandines, kuriu dėka atsirastų fluorescencinis signalas ar tam tikro ilgio bangas sugeriantis junginys.

Pavyzdžiui, į mikroskysčių gardelę įmontavus elektrodus, mažesnius nei rūšiuojamų lašelių dydis, lašeliuose galima išmatuoti elektros įtampos pokyčius, kurie atsiranda susikaupiant reakcijos produktams. Šis elektrocheminiu principu pagrįstas metodas buvo pritaikytas nuo NADP priklausomų oksidoreduktazių, pasižyminčių didesniu aktyvumu, atrankai (126).

Kuriant šiuolaikinius emulsijų rūšiavimo prietaisus, mikroskysčių gardelės taip pat buvo suderintos su masių spektrometrijos, Ramano sklaidos ir branduolio magnetinio rezonanso metodais. Visais šiais atvejais nereikalingas specifinio fluorescencinio signalo sukūrimas lašelio viduje, rūšiavimas atliekamas remiantis susidarančių reakcijos produktų fizikinėmis savybėmis (7).

Didelės apimties patikra yra vienas pagrindinių fermentų evoliucijos metodų, kadangi raiškos (pavyzdžiui, fagų ar mRNR raiškos) metodai pritaikomi ne visose sąlygose. Be to, evoliucionuojant fermentus svarbu, jog vienu metu fermentas būtų atrenkamas pagal visas katalizei svarbias savybes: substrato atpažinimą, tarpinio komplekso formavimą, reakcijos vykdymo bei atsistatymo greitį (*angl. turnover*), kas yra įmanoma taikant didelės apimties patikrą (100).



11 pav. Mikrolašelių atranka FACS rūšiuokliu. Genų biblioteka, koduojanti mutantinius baltymus, sumaišoma su *in vitro* transkripcijos/transliacijos mišiniu ir emulsifikuojama tokiomis sąlygomis, jog statistškai į vieną kompartmentą patektų tik vienas genas (1). Po transkripcijos ir transliacijos reakcijų lašeliuose gaunamas baltymas (2). Jei baltymas aktyvus, jis katalizuoja nefluorescuojančio substrato vartimą fluorescuojančiu produktu (3). Fluorescuojantys lašeliai atskiriami nuo nefluorescuojančių (arba nuo kitokia spalva fluorescuojančių) FACS rūšiuokliu (4). Iš atskirtų kompartmentų išvalomi ir PGR būdu padauginami genai, kurie gali būti dar kartą panaudojami atrankos procese.

Kaip minėta, alternatyva dažnai gana brangiam ir daug sąnaudų reikalaujančiam didelės apimties patikros procesui yra atranka. Vykdamas atrankos eksperimentą, iš pradinės mutantų bibliotekos evoliucinio spaudimo dėka atrenkami ieškomomis savybėmis pasižymintys variantai. Viena pagrindinių atrankos eksperimento ypatybių yra ta, kad evoliucinis spaudimas turi būti sukonstruotas taip, kad atsirinktų tik užduotas sąlygas atitinkantys baltymai, o juos koduojančius genus būtų įmanoma padauginti ir pereiti į kitą

atrankos etapą. Norint išpildyti šias sąlygas, sukuriamos įvairios specifinės atrankos schemos, kurių taikymo sritis pakankamai ribota – dažniausiai tokiais būdais įmanoma atrinkti DNR modifikuojančius fermentus (restrikcijos endonukleazes ar metiltransferazes, taip pat polimerazes) arba baltymus, sąveikaujančius su kitais baltymais bei peptidais (pavyzdžiui, antikūnais) ar organiniais ligandais (pavyzdžiui, fermentų inhibitoriais). Palyginus su didelės apimties paieškos būdais, kai kurie atrankos metodai turi didelį privalumą tuo atžvilgiu, kad vieno eksperimento metu leidžia patikrinti žymiai didesnės apimties bibliotekas, turinčias iki 10^{11} – 10^{12} narių (93).

Baltymų atrankos metodai dažniausiai klasifikuojami pagal tai, koku būdu išlaikomas genotipo – fenotipo ryšys. *In vivo* metodams būdinga tai, kad genotipas su fenotipu susiejamas ląstelės viduje, tuo tarpu *in vitro* metoduose gali būti naudojami kelių tipų ryšiai – kovalentinis, nekovalentinis arba ryšys gali būti išlaikomas *in vitro* kompartmentalizacijos dėka.

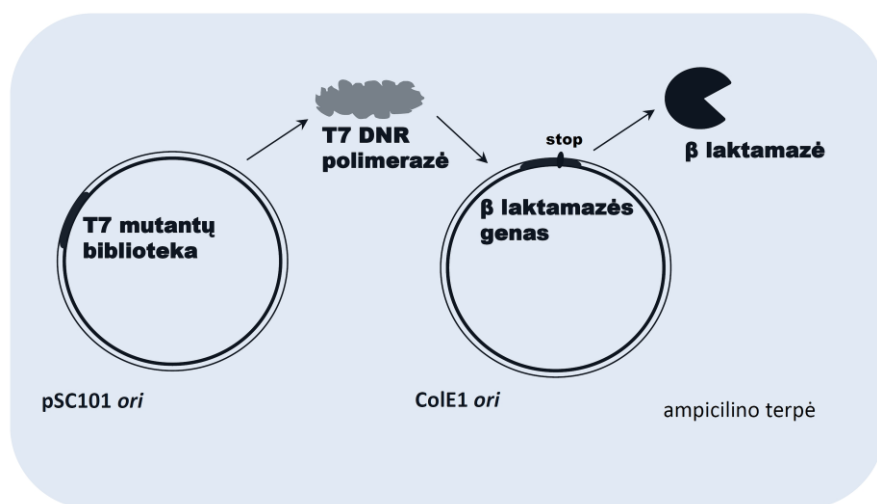
In vivo atrankos būdai gali būti panaudojami įvairioms DNR ar RNR polimerazių savybėms atrinkti. Tokie metodai pagrįsti mutantinių polimerazių bibliotekos praturtinimu variantais, kurie yra aktyvūs gyvoje ląstelėje. Vykdam atranką *in vivo*, specifiniai *E. coli* kamienai transformuojami naudojant plazmidės su įterptais mutantinių polimerazių genais. Auginant bakterijas tam tikromis sąlygomis, užauga tik aktyvius fermentų variantus turintys transformantai.

In vivo atrankos eksperimentuose dažnai pritaikomas genetinės komplementacijos principas. Vykdam atranką šiuo būdu, parenkami tokie *E. coli* kamienai, kuriuose Pol I DNR polimerazė yra neaktyvi, o genomo replikacijos funkciją gali atlikti tik fermentas iš mutantinių polimerazių bibliotekos, tačiau tik tuo atveju, jeigu jis aktyvus parinktose sąlygose. Vienas iš genetinės komplementacijos pavyzdžių galėtų būti aktyvių Taq DNR polimerazės mutantų atranka, panaudojant temperatūrai jautrią DNR polimerazę Pol I ekspresuojančias *E. coli* ląsteles. Minėtą Pol I polimerazę turintis *E. coli* kamienas *recA718 polA12* gali augti tik žemose temperatūrose – iki 30°C. Todėl 37°C temperatūroje užaugo tik tos ląstelės, kurios turėjo funkciškai aktyvius Taq DNR polimerazės variantus, galinčius pakeisti neaktyvią Pol I (127).

Genetinė komplementacija buvo pritaikyta ir RNR polimerazių savybėms keisti. Atliekant atrankos eksperimentą, ruošiamos dviejų tipų plazmidės: vienoje iš jų patalpinama T7 RNR polimerazės genų biblioteka, kitoje chloramfenikolio acetilazės genas. Abiejose plazmidėse genų transkripciją kontroliuoja T7 RNR polimerazės promotorius. Transformavus *E. coli* DH5Δlac ląsteles ir indukavus tikslinio baltymo sintezę, auginama ant

chloramfenikolio terpės. Tokiu būdu auginant ląsteles, atrenkamos tik tos, kurios turi aktyvią T7 RNR polimerazę, nes ji būtina atsparumą chloramfenikoliui koduojančio fermento sintezei (128).

Kita mokslininkų grupė panašiu principu atrinko T7 DNR polimerazės variantus, kurie turi sumažintą tikslumą, palyginus su laukinio tipo baltymu (129). Šiuo atveju, vienoje plazmidėje buvo patalpinta T7 DNR polimerazės didįjį subvienetą koduojanti mutantinių genų biblioteka, o kitoje, reporterinėje plazmidėje buvo β – laktamazės genas su įvestu STOP kodonu (12 pav.). Auginant bakterijas terpėje, turinčioje ampicilino, išlieka tik tos ląstelės, kuriose dėka T7 polimerazės įvestų klaidų buvo panaikintas STOP kodonas arba dėl įvykusios mutacijos atitinkamos tRNR geno antikodono kilpoje.



12 pav. Netikslių T7 DNR polimerazės variantų atranka. Plazmidėje pSC101 *ori* yra T7 DNR polimerazės didįjį subvienetą koduojančių genų biblioteka, įterpta po T5 promotoriumi. Kitoje plazmidėje (ColE1 *ori*) yra β – laktamazės genas inaktyvuotas įvedant STOP kodoną. T7 DNR polimerazės variantai, pasižymintys padidintu klaidų dažniu, gali panaikinti STOP kodoną. Tokiu atveju, ląstelėse kaupiasi β – laktamazė, skaidanti terpėje esantį ampiciliną. Evoliucijos eksperimente naudojamas J200 kamienas, turintis temperatūrai jautrią DNR polimerazę I. Parengta pagal (129).

Aptarti *in vivo* atrankos metodai sėkmingai taikomi mutantų bibliotekos praturtinimui aktyviomis polimerazėmis, tačiau eksperimentą vykdant gyvoje ląstelėse, neįmanoma atrinkti fermentų, pasižyminčių naujais aktyvumais, tokiais kaip nenatūralių substratų atpažinimas (93). Šiam tikslui gali būti panaudojamas fagų raiškos metodas, kadangi taikant šį atrankos būdą

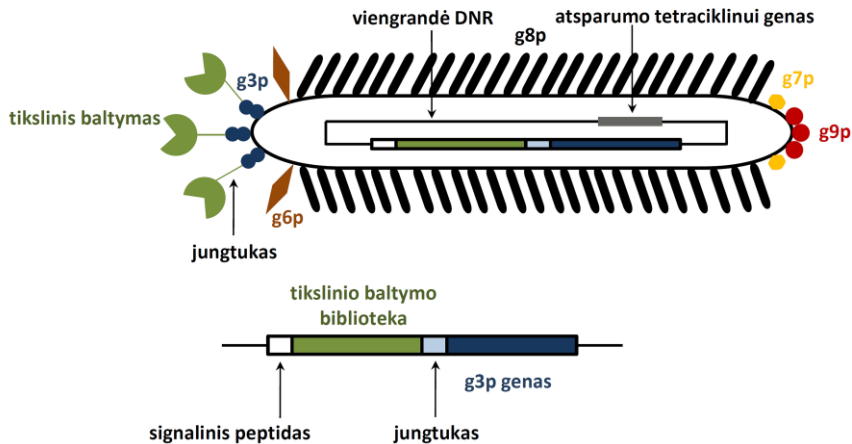
mutantiniai baltymai yra ekspresuojami ląstelėse, o po to vykdoma atranka *in vitro* sąlygomis.

Eksperto pradžioje į fago raiškos vektorių įterpiama genų, koduojančių mutantinius baltymus, biblioteka, o bakteriofagai infekavus *E. coli* ląsteles, sintetinama mutantinių baltymų biblioteka. Nuo įprastinių baltymų ekspresijos sistemų fagų raiška skiriasi tuo, kad tikslinis baltymas yra sulietas su bakteriofago paviršiniu (kapsidės) baltymu. Tokiu būdu mutantinis baltymas, sulietas su fago paviršiniu baltymu, eksponuojamas viruso dalelės išorėje (13 pav.).

Remiantis tuo, kad baltymų tarpusavio sąveika ar sąveika su organinėmis molekulėmis vyksta kontaktuojant tik nedidelei daliai aminorūgščių, teigiama, kad baltymo suliejimas su fago paviršiais baltymais neturi didelės įtakos baltymo savybėms, t.y. baltymas, prijungtas prie viruso paviršiaus, su ligandu sąveikauja panašiai, kaip jis sąveikautų būdamas laisvas tirpale (130).

Fagų raiškos eksperimentuose gali būti naudojami bakteriofagai T4 ir λ (131,132), tačiau daugiausiai publikuojama darbų, atliktų naudojant filamentinius fagus M13, fd ir fl. Filamentiniai fagai yra ~1 μm ilgio ir ~6 nm skersmens struktūros, sudarytos daugumoje (~87% pagal masę) iš paviršinio baltymo. Fagas M13 turi penkis skirtingus paviršiaus baltymus, tačiau pagrindinis yra g8p, kuris sudarytas iš 50 aminorūgščių liekanų. Virusų dalelę sudaro apie 2700 šio baltymo kopijų. Kiti baltymai – minoriniai, išsidėstę viruso dalelės galuose (13 pav.). M13 turi viengrandę DNR, kurios ilgis 6,4 kb. Šios DNR pagrindu yra konstruojami vektoriai, kuriuose evoliucionuojamą baltymą koduojantys genai suliejami su paviršinio baltymo genais. Dažniausiai suliejimui naudojamas baltymas g3p, tačiau kartais suliejimui naudojami ir kiti baltymai - g6p bei pagrindinis kapsidę sudarantis baltymas g8p. Bakteriofago M13 dalelė turi nuo 3 iki 5 g3p baltymo kopijų, tiek pat ir mutantinio baltymo kopijų ir būna eksponuojama ant virusinės dalelės paviršiuje (130). Virusai, turintys tiriamuosius mutantinius baltymus iš bakterijų gryninami naudojant polietilenglikolį ir panaudojami atrankoje. Fagų raiška dažniausiai taikoma didinant baltymų giminingumą substratui, t.y. atrenkami viruso paviršiuje esantys mutantai, pasižymintys stipriausia sąveika.

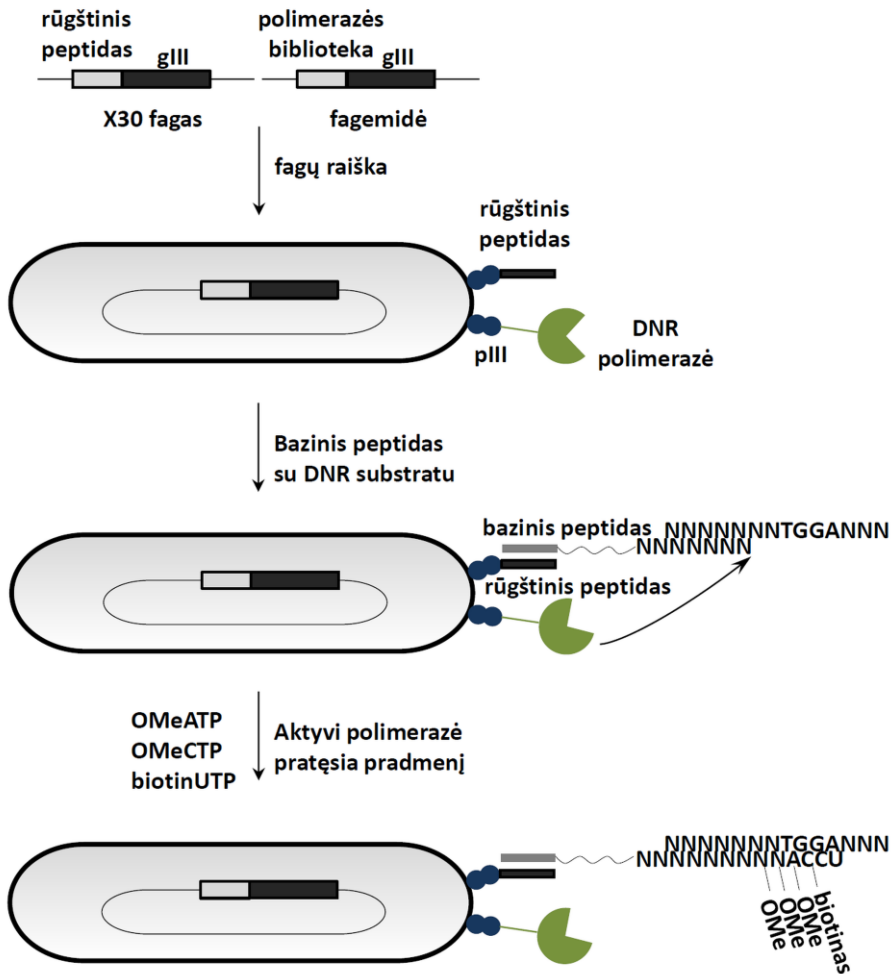
Metodo privalumas yra tas, kad išlaikomas stiprus genotipo-fenotipo ryšys (130). Šiuo metodu atranką galima vykdyti naudojant bibliotekas, kurių dydis ~10⁸, tačiau aprašyta keletas atvejų, kai buvo iširtos ir didesnės bibliotekos (99). Šio metodo trūkumu galima vadinti tai, kad fagų raiška paremti evoliucijos eksperimentai dažniausiai skirti mažos molekulinės masės baltymų ir peptidų tyrimams (130,133).



13 pav. Filamentinio bakteriofago, naudojamo baltymų raiškos eksperimentuose ir DNR vektoriaus, skirto mutantinio baltymo ekspresijai ant viruso dalelių, schema (133).

Panaudojant fagų raišką, buvo atlikta keletas darbų, daugiausia skirtų DNR polimerazių substratų spektro praplėtimui (134,135,136). Šiuo metodu buvo atrinkti Stofelio fragmento (Taq polimerazės, neturinčios 5'-3' egzozonukleazinio domeno) variantai, kurie į sintetinamą nukleorūgščių grandinę įjungia ribonukleotidus (136) ir 2'-O-metilintus nukleotidus (135). Modifikuotus nukleotidus atrinktas fermentas įjungia 10000 kartų efektyviau negu laukinio tipo fermentas (135).

Evoliucionuojant minėtus DNR polimerazių variantus, konstruojamos tokios fagemidės, kuriose mutantines polimerazes koduojantys genai suliejami su filamentinio bakteriofago M13 paviršiaus baltymo gIII genu. Fagemidės, kuriose yra *E. coli* ir fago replikacijos pradžios elementai, transformuojamos į *E. coli* ląsteles, paskui ląstelės užkrečiamos pagalbinio fagu, kuriame gIII genas yra sulietas su „rūgštiniu“ peptidu. Tada infekuotose *E.coli* ląstelėse vyksta virusinių dalelių susirinkimas. Kiekviena susiformuojančio fago dalelė eksponuoja mutantinės polimerazės molekules, sulietas su pIII (gIII geno produktu). Likusios pIII baltymo molekulės, kurių ant vieno fago būna 3-5, sulietos su rūgštiniu peptidu (14 pav.) Rūgštinis peptidas sąveikauja su baziniu peptidu, susidarant disulfidiniams tilteliams ir leucino užtrauktuko struktūrai. Tokiu būdu prie fago dalelių yra prijungiama matricos-pradmens sistema, kuri būna surišta su baziniu peptidu.



14 pav. Fagų raiškos pritaikymo DNR polimerazių atrankai schema. Fagemidę transformavus į *E. coli* ir ląsteles užkrėtus pagalbinio virusu, turinčiu rūgštinio peptido geną, sulietą su gIII, formuojasi viruso dalelės, eksponuojančios polimerazę ir rūgštinį peptidą. Rūgštinis peptidas jungiasi su baziniu peptidu ir tokiu būdu prie fago dalelės prijungiama matricos – pradmens sistema. Aktyvi DNR polimerazė pratęsia pradmenį, įjungdama modifikuotus nukleotidus ir biotin-UTP. Biotinu žymėtos viruso dalelės išgryninamos naudojant streptavidinu padengtas magnetines daleles. Parengta pagal (135).

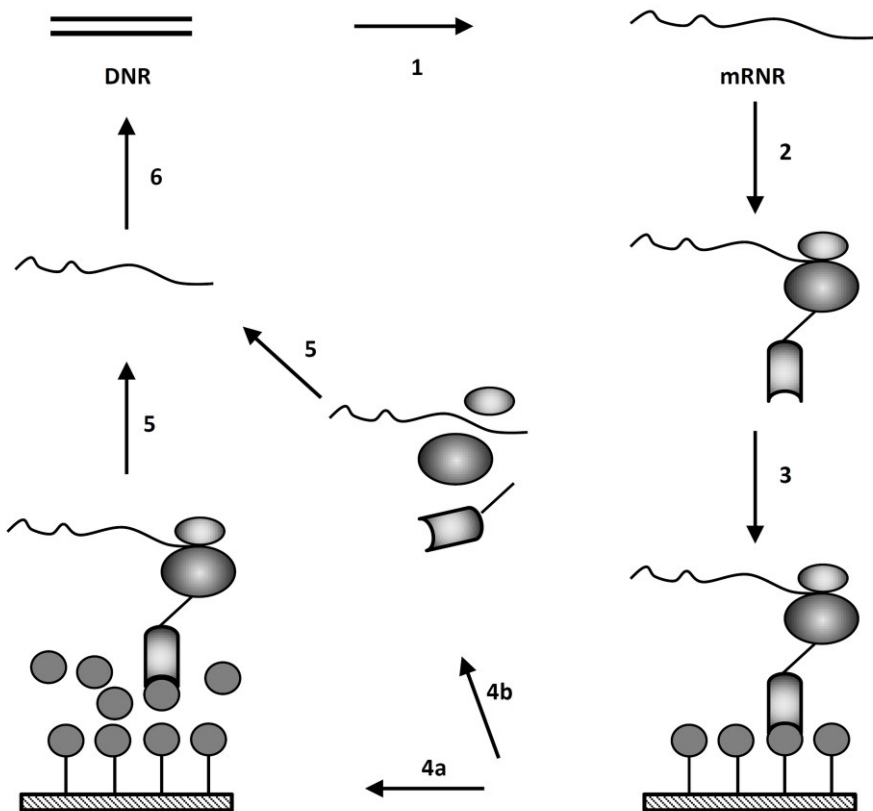
Taip paruoštos fago dalelės naudojamos atrenkant aktyvius DNR polimerazės mutantus. Į reakcijos mišinį dedama modifikuotų ar natūralių

NTP ar dNTP ir biotinu žymėto UTP. Jeigu polimerazė aktyvi, ji sugeba pratęsti pradmenį ir į sintetiną grandinę įjungia biotinilintą UTP. Pasinaudojant streptavidino – biotino sąveika, atrenkamos fagų dalelės, eksponuojančios aktyvias polimerazes (134,135,136).

Fagų raiškos metodą galima būtų laikyti tarpiniu tarp *in vivo* ir *in vitro* metodų, nes eksperimento metu yra naudojama ląstelių transformacija, tačiau atranka vykdoma *in vitro* sąlygomis. Tuo tarpu taikant evoliucijos metodus, kuriuose nenaudojama transformacija, yra visiškai išpildomos *in vitro* sąlygos. Kaip minėta, šie metodai skirstomi pagal tai, koku principu yra sudaromas genotipo – fenotipo ryšys, kuris gali būti kovalentinis, nekovalentinis arba išlaikomas *in vitro* kompartmentalizacijos dėka.

Nekovalentiniu genotipo – fenotipo ryšiu pasižymi du atrankos būdai – ribosomų raiška ir DNR raiška (dar vadinama cis raiška).

Ribosomų raiška yra toks atrankos būdas, kuriame genotipo - fenotipo ryšys išlaikomas ribosomų dėka. Tiksliau, genotipas ir fenotipas įeina į vieną struktūrą, vadinamą keturnariu kompleksu. Keturnarį kompleksą sudaro mRNR, ribosoma, baltymas, kurį koduoja mRNR, ir paskutinės baltymo aminorūgšties tRNR. Toks kompleksas susidaro tuo atveju, kada transliuojama mRNR, neturinti transliacijos terminaciją užtikrinančio STOP kodono. Ši mRNR pasibaigus baltymo sintezei nedisocijuoja nuo ribosomos, o baltymas taip pat išlieka susirišęs su ribosoma. Prie tikslinį baltymą koduojančio geno 3' – galo dažniausiai dar yra prijungiamas seka, koduojanti keliasdešimties aminorūgščių ilgio peptidą, kuris pasibaigus transliacijai lieka ribosomos tunelyje ir taip užtikrina tikslinio baltymo eksponavimą viso komplekso išorėje. Keturnarį kompleksą stabilizuoja žema temperatūra ir didelės Mg^{2+} jonų koncentracijos (99,137).



15 pav. Principinė ribosomų raiškos eksperimento schema. Genų biblioteka transkribuojama (1), gauta mRNR naudojama transliacijos reakcijoje (2), kurios metu susidaro keturnaris kompleksas. Toliau vykdomas susirišimo su ligandu eksperimentas (3), kurio metu iš baltymų bibliotekos atrenkami stipriausiai su ligandu sąveikaujantys mutantai. Specifiniai keturnariai kompleksai atplaunami (4a) arba suardomi pašalinant Mg^{2+} jonus (4b). Tada panaudojant atvirkštinę transkriptazę, sintetinama kDNR nuo mRNR matricos (5), o vykdant PGR, kDNR paverčiama dvigrande DNR (6), kuri yra praturtinta genais, koduojančiais baltymus, stipriai sąveikaujančiais su ligandu. Atrankos ciklai kartojami keletą kartų griežtinant spaudimo sąlygas, kol atrankami pakankamą giminingumą ligandui turintys baltymai. Parengta pagal (138).

Taikant ribosomų raiškos metodą, galima naudoti dideles mutantų bibliotekas, turinčias iki $2-3 \times 10^{12}$ narių. DNR fragmentai, koduojantys tikslinio baltymo mutantus yra paverčiami į mRNR vykdant transkripciją.

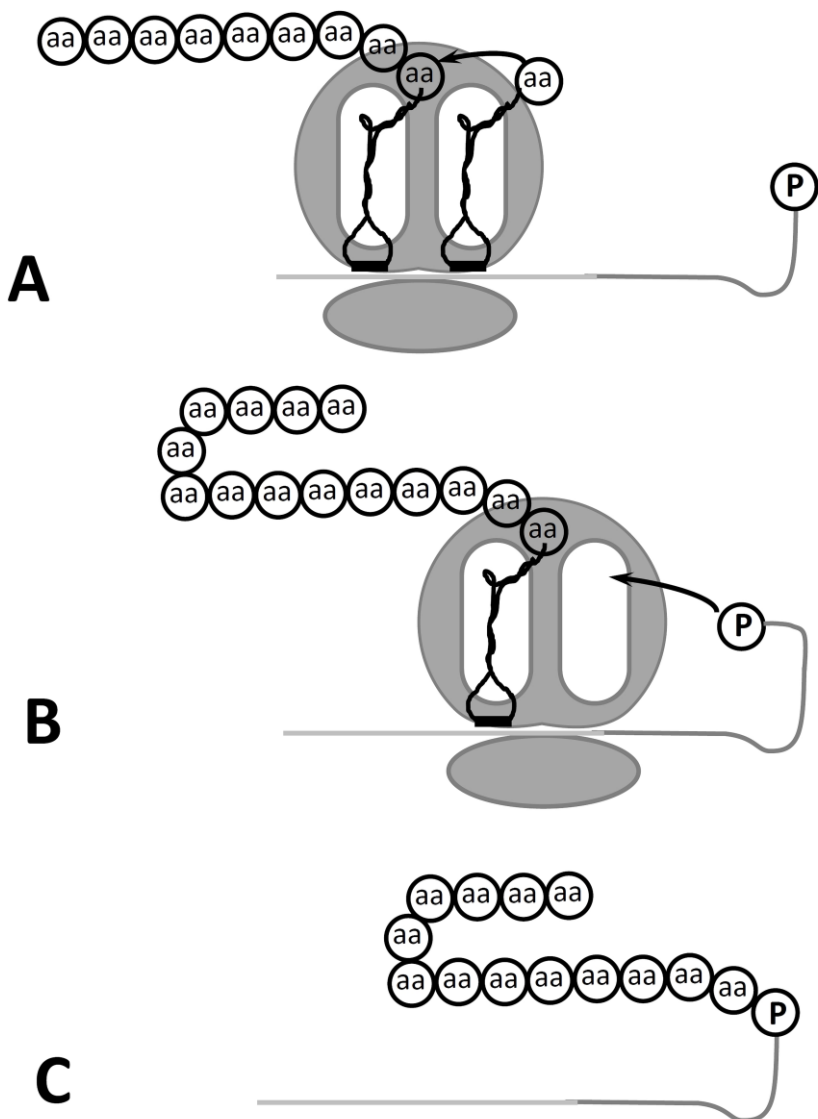
Keturnariai kompleksai formuojami vykdant *in vitro* transliaciją, naudojant beląstelinius ekstraktus, kuriuose turi būti pakankamas kiekis funkcionalių ribosomų ir kuo mažesnis nukleazinis aktyvumas. Gana dažnai ribosomų raiškos eksperimentuose naudojamas *E. coli* S30 ekstraktas, taip pat gali būti naudojamos ir eukariotinių ląstelių pagrindu paruošti transliacijos mišiniai (139).

Ribosomų raiškos metodas dažniausiai naudojamas atrenkant mutantus, stipriau besirišančius su substratu. Pavyzdžiui, iš atsitiktinių peptidų sekų bibliotekos galima atrinkti tokius variantus, kurie sąveikauja su norima baltymu, DNR ar RNR seka arba su koku nors organiniu ligandu, o kartojant keletą atrankos ciklų atrenkami mutantai, pasižymintys stipriausia sąveika (139).

DNR raiška yra kitas atrankos metodas, kuriame genotipo – fenotipo ryšys išlaikomas pasinaudojant baltymo sąveika su DNR, pavyzdžiui, RepA baltymo sąveika su jį koduojančio geno DNR (140). RepA baltymas yra DNR replikacijos iniciatorius, stipriai besirišantis su DNR, tokiu būdu suformuojamas nekovalentinis genotipo – fenotipo ryšys.

Kalbant apie kovalentiniu genotipo – fenotipo ryšiu pagrįstus metodus, žinomiausias iš jų yra mRNR raiška. Vykdamas mRNR raiškos eksperimentus, mutantiniai baltymai yra sujungiami su juos koduojančia RNR transliacijos pabaigoje. Tokiam genotipo – fenotipo ryšiui suformuoti yra naudojama modifikuota mRNR, kurios 3' gale prisiuvas oligonukleotidas, turintis prijungtą antibiotiką puomiciną (16 pav.). Transliacijos pabaigoje mRNR 3' gale esantis puomicinas kovalentiškai sujungiamas su baltymo C galine amino rūgštimi. Kovalentinio ryšio formavimas nėra labai efektyvus, kadangi ~3% naudojamos mRNR yra suliejama su koduojamu baltymu, todėl didelė bibliotekos dalis atrankos eksperimente nepanaudojama (141). Pagrindiniai veiksniai, lemiantys šios reakcijos efektyvumą yra biblioteką sudarančių mutantinių baltymų aminorūgščių seka ir mRNR tretinė struktūra. Buvo parodyta, kad prie mRNR pridedant papildomas trumpas atsitiktines sekas, galima pagerinti mRNR suliejimo su koduojamu baltymu išeią iki ~20% (142).

mRNR raiška panaši į ribosomų raiškos metodą pritaikymo galimybėmis ir atlikimo technika. Pagrindinis skirtumas tarp šių metodų yra skirtingais būdais išlaikomas genotipo-fenotipo ryšys. Kovalentinis ryšys yra žymiai stabilesnis, todėl mRNR raiškos būdu paruoštą biblioteką galima naudoti tokiomis sąlygomis, kuriose ribosomų raiškos metodu paruoštas genotipo – fenotipo ryšys suirtų (143).

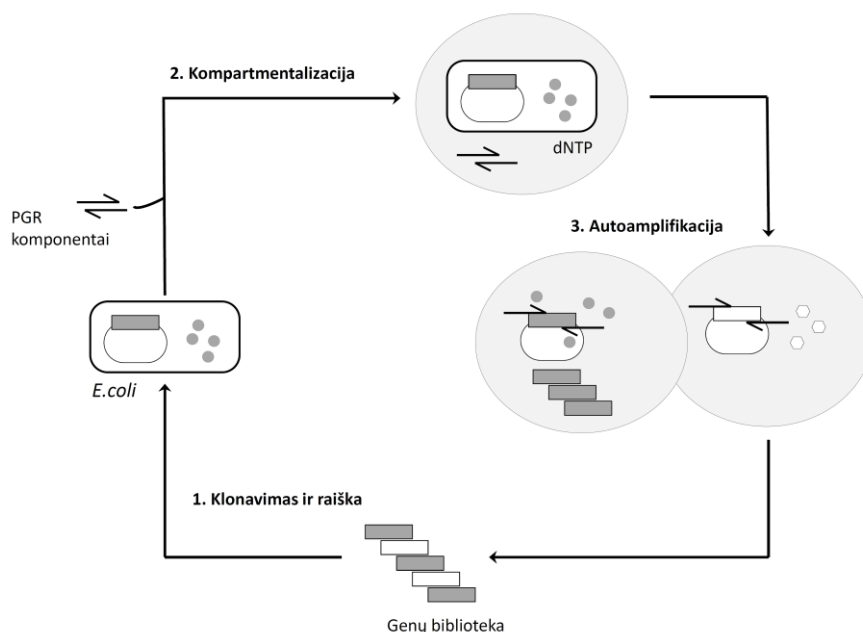


16 pav. RNR ir jos koduojamo baltymo susiuvimas. A – mRNR translaciija ir baltymo sintezė. B – ribosomai pasiekus RNR atviro skaitymo rėmelio pabaigą, translaciija sustoja ties RNR-DNR jungtimi. Puomicinas (pažymėta P raide apskritime) patenka į aminoacil-tRNR surišimo sritį ir suformuoja jungtį su polipeptidu. C – mRNR ir polipeptido junginys išgrynintas iš translaciijos reakcijos. Parengta pagal (141).

Dar vienas būdas suformuoti genotipo – fenotipo ryšį yra *in vitro* kompartmentalizacija. Šio metodo principas yra genotipo ir fenotipo

uždarymas tame pačiame emulsijos lašelyje, panašiai kaip gyvose ląstelėse ši ryšį sukuria plazminė membrana. Tam tikromis sąlygomis sukuriamos emulsijos, sudarytos iš lašelių, kurių dydis, priklausomai nuo eksperimento paskirties, varijuoja nuo femtolitrų iki pikolitrų eilės. Vykdamas *in vitro* kompartmentalizacija pagrįstus eksperimentus dažniausiai sukuriami iki 10^{10} lašelių, tokiu būdu sukuriami galimybė vieno eksperimento metu patikrinti didelės apimties bibliotekas (99). Naudojant *in vitro* kompartmentalizaciją, kiekvienu atveju dažniausiai taikoma individuali atrankos strategija, kuri pasirenkama atsižvelgiant į fermento funkciją, pavyzdžiui, restrikcijos endonukleazių ar metiltransferazių sąveika su atpažįstama seka. *In vitro* kompartmentalizacijos metodai dažnai taikomi vykdamas DNR polimerazių evoliucijos eksperimentus.

Vienas iš svarbiausių kompartmentalizacija pagrįstų metodų yra autoamplifikacija kompartmentuose (CSR, compartmentalised self replication). Atranka taikant CSR vykdoma keliais etapais (žr. 17 pav.). Pirmiausia, mutantines polimerazes koduojančių genų biblioteka klonuojama į ekspresijos vektorių, kuriuo transformuojamos *E. coli* ląstelės. Transformantai auginami ir indukuojama tikslinio baltymo sintezė. Antrame etape ląstelės resuspenduojamos PGR mišinyje, į kurio sudėtį įeina polimerazės genui specifiniai pradmenys, divalenčio metalo druska, dNTP ir RNazė, kuri suskaido RNR, patenkančią į reakcijos mišinį suyrant ląstelėms. Toks reakcijos mišinys sumaišomas su aliejine faze, kurioje pridedama detergentų, pasiskirstančių fazių sąveikos riboje. Sumaišius vandeninę ir aliejinę fazes gaunama termostabili emulsija, sudaryta iš didelio kiekio (dažniausiai 10^5 - 10^6 /ml) kompartmentų, kurių skersmuo $\sim 15\mu\text{m}$. Lašeliai vidutiniškai talpina po vieną *E. coli* ląstelę. Toliau vykdoma polimerazės grandininė reakcija, kurios metu *E. coli* suyra ir iš bakterijų į kompartmentų tūrį patenka DNR polimerazės ir jas koduojantys genai. Kompartmentuose, kuriuose DNR polimerazės yra aktyvios tam tikromis atrankos sąlygomis, vyksta autoamplifikacija, polimerazės padaugina jas koduojančius genus. Tokiu būdu pradinė genų biblioteka praturtinama tais mutantais, kurie aktyvūs tam tikromis sąlygomis. Gauta genų biblioteka vėl transformuojama į *E. coli* ląsteles ir atranka kartojama griežtinant evoliucinio spaudimo sąlygas (134,144).



17 pav. CSR metodo principinė schema. 1 – Paruošta mutantinių genų biblioteka naudojama *E. coli* ląstelių transformacijai, kuriose indukuojama DNR polimerazės sintezė. 2 – Ląstelės dedamos į PGR mišinį ir vykdoma kompartmentalizacija. 3 – PGR metu emulsijoje padauginami genai, kurie koduoja DNR polimerazės mutantus, aktyvius atrankos sąlygose. Parengta pagal (144).

Autoamplifikacijos kompartmentuose autoriai šią atrankos strategiją sėkmingai pritaikė Taq DNR polimerazės savybių keitimui. Atliekant vos tris atrankos ciklus, iš pradinės mutantų bibliotekos, turinčios $\sim 2 \times 10^8$ mutantų buvo atrinkti DNR polimerazės variantai, kurių gyvavimo puslaidis $97,5^\circ\text{C}$ temperatūroje yra 11 kartų ilgesnis nei laukinio tipo fermento, o atsparumas inhibitoriams yra atitinkamai didesnis 130 kartų (144). Vėliau dr. Holliger vadovaujama grupė sukūrė truputį modifikuotą autoamplifikacijos kompartmentuose metodą, vadinamą spCSR (short-patch compartmentalised self replication). Taikant šį metodą, amplifikuojamas ne visas DNR polimerazę koduojantis genas, o tik nedidelis geno fragmentas, tokiu būdu sumažinant evoliucinį spaudimą pirmame atrankos cikle. Atliekdami du atrankos etapus, metodo kūrėjai atrinko DNR polimerazės mutantą, kuris PGR metu į sintetinamą grandinę efektyviai įtraukia cianino dažais Cy3 ar Cy5 žymėtus nukleotidus. Šis fermentas sugeba susintetinti iki 1kb ilgio DNR fragmentus, kuriuose visi dC nukleotidai pakeisti į Cy3-dC ar Cy5-dC. Gauta

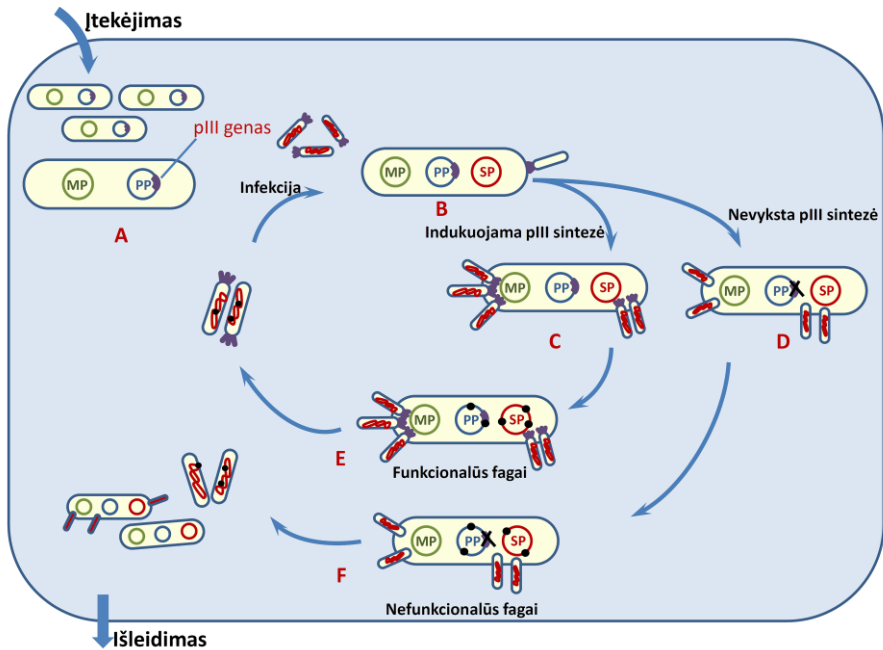
“CyDNR” pasižymi kitokiomis tiek fizinėmis, tiek optinėmis savybėmis, palyginus su įprasta B tipo DNR (145). Atskirai grupei priskirtinas metodas, kurį galima būtų pavadinti pagalbine amplifikacija kompartmentuose (CPR, compartmentalized partnered replication). Naudojant šį metodą, *in vitro* kompartmentalizacijos technologiją galima panaudoti ne tik DNR polimerazės savybių keitimui. Pagalbine amplifikacija šis atrankos būdas vadinamas todėl, kad eksperimento metu atrinkinėjami tam tikromis savybėmis pasižymintys baltymai, esantys *E. coli* ląstelėse, o Taq DNR polimerazė yra naudojama šių baltymų genams padauginėti. Tokiu atveju Taq DNR polimerazės ekspresija turi būti priklausoma nuo tikslinio baltymo, kurio tam tikros savybės atrinkinėjamos. Pagalbinės amplifikacijos kompartmentuose metodą sukūrusi mokslininkų grupė atrinko grupę T7 DNR polimerazės mutantų, kurios atpažįsta joms specifinius promotorius. Po to buvo pademonstruota, kad naudojant pagalbinę amplifikaciją kompartmentuose galima gauti fermento aminoacyl – tRNR sintetazės mutantus, kurie veikia poroje su atitinkama tRNR ir sugeba į sintetinamo baltymo grandinę įjungti modifikuotas aminorūgštis. Šiuo atveju, Taq DNR polimerazės sekoje buvo įvestas STOP kodonas TAG (vadinamasis „amber“ kodonas), kurio supresijai buvo reikalinga mutantinė triptofano tRNR sintetazė, sugebanti susieti triptofano tRNR su atitinkama modifikuota aminorūgštimi 5 – hidroksi L-triptofanu (146,147).

Tradicinį baltymų evoliucijos eksperimentą sudaro pradinės genų bibliotekos ruošimas ir po to vykdomi pasikartojantys transformacijos arba *in vitro* kompartmentalizacijos, tikslinių baltymų sintezės, atrankos arba patikros, atrinktų genų gryninimo etapai, kuriems reikia tiek laiko, tiek darbo jėgos išteklių.

Pastaruoju metu yra sukurta nuolatinės baltymų evoliucijos metodų, kuriuose pasikartojantys atrankos ciklai vyksta be papildomo įsikišimo, todėl naudojant tokius metodus galima atlikti žymiai daugiau atrankos etapų. Ši nuolatinė, nenutrūkstama evoliucija yra panaši į gamtoje vykstančius procesus.

Nuolatinės evoliucijos principas jau kurį laiką sėkmingai taikomas bakterijų populiacijų, pasižyminčių norimomis savybėmis selekcijai (148), taip pat buvo pademonstruotas šio metodo pritaikymas RNR ligazės aktyvumą turinčių ribozimų atrankai (149), kuris vis dėlto negali būti tiesiogiai pritaikytas baltymų atrankai. Tuo tarpu didelį baltymų evoliucijos potencialą turi metodas, sukurtas panaudojant bakteriofagų infekciją genų bibliotekos pernešimui, vadinamas PACE (phage – assisted continuous evolution). Taikant šį metodą, atrankos metu pasikeičia daug fago generacijų, nuolatos

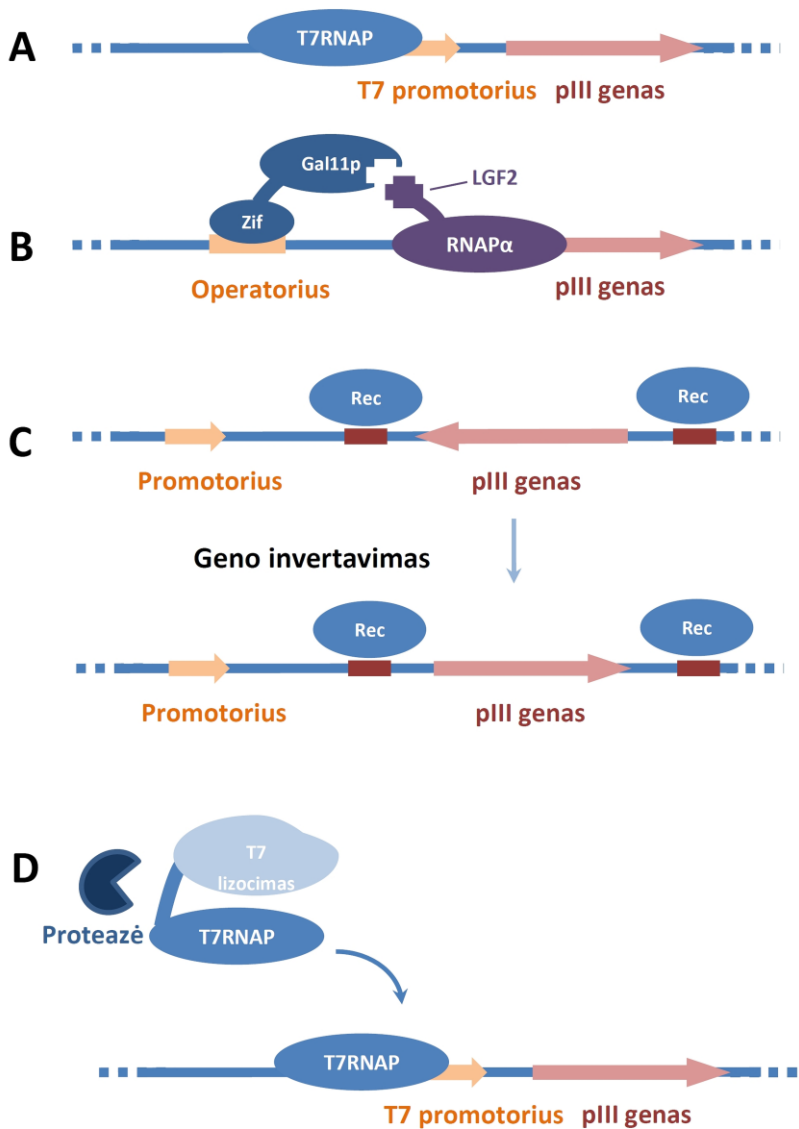
taikant vis stiprėjantį spaudimą. Eksperimentą galima vykdyti kelias dienas ar net savaites, beveik išvengiant eksperimentatoriaus įsikišimo. Sėkmingu pavyzdžiu, charakterizuojančiu nuolatinės evoliucijos galimybes, galima būtų įvardinti Liu su kolegomis atliktą eksperimentą, kurio metu iš pradinės T7 RNR polimerazės mutantus koduojančių genų bibliotekos buvo gauti variantai, atpažįstantys nenatūralų promotorių, taip pat pradedantys RNR sintezę įjungdami ne GTP, bet ATP ir CTP.



18 pav. PACE metodo principinė schema. Šeimininko ląstelės parinktu pastoviu greičiu pateikiamos į reakcijos kamerą (A), kur jas infekuoja bakteriofagai, turintys evoliucionuojamus mutantinius baltymus koduojančias plazmides SP (selekcijos plazmides). Infekcijos metu SP plazmidės patenka į šeimininko ląstelę (B). Evoliucinio spaudimo sąlygas atitinkantys mutantai indukuoja pIII baltymo, kurio genas yra PP plazmidėje, gamybą (C), o šiose sąlygose neaktyvūs baltymai pIII sintezės indukuoti negali (D). Infekcijos metu, šeimininko ląstelėje esančioje mutagenizės plazmidėje (MP) koduojami reparacijos sistemos baltymai lemia papildomų mutacijų įvedimą. Formuojasi funkcionalūs bakteriofagai, turintys paviršinį baltymą pIII (E). Panaudotos ląstelės ir neaktyvūs bakteriofagai pašalinami iš reakcijos kameros (F). Parengta pagal (150).

Atrinkinėjant šiomis savybėmis pasižyminčius mutantus, per 8 dienas įvykdyta apie 200 atrankos ciklų (150). Dar vienas puikus praktinis PACE pritaikymas pateiktas 1.2.4 skyrelyje aptariant PE (*angl. Prime Editing*) fermentų atrankas (151).

Vykdamas eksperimentą pagal PACE metodiką, tam tikro tankio *E. coli* ląstelių suspensija leidžiama į reakcijos indą, kuriame auginamas filamentinis bakteriofagas M13 (18 pav.). Bakteriofago dalelės būna paruoštos taip, kad turėtų mutantinių genų biblioteką koduojančią plazmidę, tačiau neturėtų fagų infekcijai būtino geno gIII, koduojančio baltymą pIII. Baltymas pIII sudaro jungtis su bakterijų F pilėmis (lytinėmis ataugomis) ir sąlygoja patekimą į šeimininko ląstelę, šio baltymo neturintis fagas praktiškai negali infekuoti šeimininko ląstelės (152). Dėl šios priežasties, pIII baltymą koduojantis genas yra įterpiamas į pagalbinę plazmidę, esančią *E. coli* ląstelėje. Tokiu atveju, tikslinio baltymo, kurio savybės atrinkinėjamos, aktyvumas turi būti susiejamas su pIII baltymo ekspresija.



19 pav. Įvairių baltymų aktyvumų susiejimo su pIII baltymo sinteze būdai. pIII baltymo ekspresija aktyvuojama T7 RNR polimerazei sąveikaujant su T7 promotoriumi (A), pasinaudojant baltymų tarpusavio sąveika tarp Gal11p domeno, kuris sulietas su cinko pirštų motyvu ir tarp LGF2 domeno, sulieto su RNR polimeraze (B), rekombinazei katalizuojant geno inversiją (C), proteazei pašalinant T7 polimerazės aktyvumą blokuojantį T7 lizocimą (D). Parengta pagal (150,153).

Vykstant bakteriofaginei infekcijai, plazmidė, koduojanti tikslinį baltymą, patenka į ląstelę. Pasinaudojant ląstelėje veikiančiu transkripcijos – translacijos mechanizmu, sintetinami mutantiniai baltymai, kurie turi aktyvuoti pIII baltymo sintezę. Tik esant pIII baltymui, infekcijos metu susiformuojantys bakteriofagai galės infekuoti naujas šeimininko ląsteles. Kuo aktyvesnė tikslinio baltymo raiška, tuo daugiau susintetinama pIII baltymo, tuo didesnes galimybes infekuoti ląsteles turi bakteriofagas.

Kadangi viena iš evoliucijos sąlygų yra kintamumas, šeimininko ląstelėse vykstančios fago replikacijos metu tikslinį baltymą koduojantis genas turi įgyti naujų mutacijų. David Liu su bendradarbiais sukūrtoje schemoje tam tikslui panaudojama mutagenėzės plazmidė, kuri koduoja *E. coli* reparacijos sistemos baltymus su pakeistomis savybėmis, taip užtikrinant didesnę klaidų skaičių replikacijos metu (150).

Naudojant PACE metodiką, pIII baltymo sintezė *E. coli* ląstelėse turi būti susieta su tikslinio evoliucionuojamo baltymo aktyvumu. Susieti šiuos du baltymus galima įvairiais būdais – pasinaudojant polimeraziniu ar kitokiu fermentiniu aktyvumu, baltymų tarpusavio sąveika arba susirišimu su DNR ar RNR (19 pav.), todėl PACE metodas gali būti panaudotas įvairiais aktyvumais pasižyminčių baltymų atrankai.

Vykdamas eksperimentą pagal PACE metodiką, turi būti išlaikoma svarbi sąlyga - šeimininko ląstelės reakcijos kameroje turi išbūti ne ilgiau, nei užtrunka vienas jų gyvavimo ciklas. Tokiu būdu, reakcijos kameroje nevyksta šeimininko ląstelių replikacija, jos naudojamos tik evoliucionuojančių bakteriofagų populiacijai palaikyti, kurioje ir kaupiasi mutacijos. Taip pat svarbu parinkti tinkamą sistemos cirkuliacijos greitį, kuris turi būti pakankamas, norint išvengti jau minėtos *E. coli* replikacijos, bet ne per greitas, kad iš reakcijos kameros nebūtų išplauti bakteriofagai.

1.2.4 Kryptingas atvirkštinių transkriptazių savybių keitimas

Šiuolaikinėje molekulinėje biologijoje atvirkštinės transkriptazės yra ypatingos svarbos fermentai, kuriuos pagal savo reikšmę galima palyginti su PGR naudojamomis DNR polimerazėmis. Praktiškai visi RNR tyrimams skirti metodai prasideda nuo atvirkštinės transkripcijos stadijos. Tokiu būdu RNR paverčiama į žymiai stabilesnę kopijinę DNR, kuri yra tinkama tolimesnėms procedūroms.

Nenuostabu, kad gausybei laboratorijoje naudojamų metodų reikalingos atvirkštinės transkriptazės, pasižyminčios savybėmis, kurios skiriasi nuo laukinio tipo fermento. Siekiant sukurti tokius fermentus su pakeistomis

savybėmis, buvo pritaikytos tiek racionalaus baltymų dizaino, tiek įvairios kryptingos evoliucijos strategijos.

Iš atvirkštinių transkriptazių plačiausią praktinį pritaikymą turi M-MuLV AT, todėl daugiausia darbų buvo nuveikta siekiant pakeisti būtent šio fermento savybes. Vienas elementariausių atvirkštinės transkriptazės patobulinimo pavyzdžių yra RNazės H aktyvumo panaikinimas, įvedant mutacijas RNazės H domeno aktyviajame centre (66). Nors šis pakeitimas neturi įtakos fermento sąveikos su substratu stiprumui, tačiau termostabilumo vertė padidėja apie 4°C, palyginus su laukinio tipo baltymu. Šis pokytis paaiškinamas tuo, kad H minus mutantas negali suskaidyti RNR grandinės, esančios RNR/DNR hibrido sudėtyje, dėl ko baltymas išlieka susirišęs su savo substratu (66).

Būtent termostabilumas yra viena iš labiausiai pageidaujamų atvirkštinės transkriptazės savybių. Reakcijas vykdančios aukštesnėse temperatūrose, susilpnėja RNR antrinės struktūros, o tai padeda fermentui efektyviai sintetinti ilgesnes kopijines DNR molekules (154,155).

Yra nemažai pavyzdžių, kaip baltymo termostabilumas buvo didinamas pasitelkus racionalaus dizaino principą – konstruojant numatytus mutantus, tikrinant jų savybes ir atrenkant tinkamiausius (156,157,158). Mutagenezės taikiniai dažnai pasirenkamos tos aminorūgštys, kurios pačios arba netolima jų aplinka sudaro kontaktus su substratu (156). Taip pat tiriamos ir kitos struktūriškai reikšmingos pozicijos, tokios kaip hidrofobinių aminorūgščių klasteriai, polinės aminorūgštys, ar disulfidinius ryšius sudarantys cisteinai (157,158). Daugumoje atvejų geriausių rezultatų pasiekama apjungiant po keletą mutacijų, turinčių didžiausią įtaką baltymo termostabilumui.

Vis dėlto reikšmingiausi darbai keičiant atvirkštinių transkriptazių savybes buvo atlikti naudojant įvairius kryptingos evoliucijos metodus – tiek didelės apimties patikros (*angl. screening*), tiek atrankos (*angl. selection*). Pavyzdžiui, Arezi ir Hogrefe paruošė ir ištyrė sąlyginai nedidelę 5×10^4 narių M-MuLV AT biblioteką aptiko aminorūgščių pakeitimų, kurie pagerino baltymo termostabilumą, reakcijos mišinyje esant substrato. Mutacijų poveikis buvo adityvus, todėl sukonstravus penkis aminorūgščių pakeitimus turintį M-MuLV AT mutantą (E69K/E302R/W313F/L435G/N454K), sąveikos su substratu stiprumas padidėjo 10 kartų, o gyvavimo puslaikis 55°C temperatūroje padidėjo nuo 5 iki 30 minučių, palygus su laukinio tipo baltymu (75). Taip pat buvo pademonstruota, kad šis mutantas pasižymi padidėjusiu atsparumu įvairiems inhibitoriams, galintiems patekti į AT reakcijos mišinį (159).

Siekiant atrinkti įvairiomis naujomis savybėmis pasižyminčias atvirkštines transkriptazes, kartais kaip pradinis (laukinio tipo) baltymas pasirenkamos nuo DNR priklausomos DNR polimerazės, kurios natūraliai pasižymi silpnu AT aktyvumu. Atlikus atrankos eksperimentą gaunami fermentai, kurių savybės labai stipriai skiriasi nuo įprastų M-MuLV ar AMV AT.

Pavyzdžiui, Ellefson ir kolegų pristatė darbą, kuriame pademonstravo, kaip iš archėjinės *Thermococcus kodakarensis* polimerazės panaudodami autoamplifikacijos kompartmentuose (CSR) metodą išvystė termostabilią atvirkštinę transkriptazę, pasižyminčią 3' – 5' egzonukleaziniu (klaidų taisymo) aktyvumu. Iš 10⁹ dydžio mutantų bibliotekos buvo gautas fermentas, turintis nuo RNR priklausomos DNR polimerazės aktyvumą, kurio pakanka bent 0,5 kb ilgio RNR kopijavimui. Šis fermentas taip pat išlaikė prigimtinį termostabilumą ir nuo DNR priklausomos DNR polimerazės aktyvumą, todėl yra tinkamas naudoti PGR temperatūriniame režime, o egzonukleazinio aktyvumo dėka į sintetinamą kopijinės DNR grandinę įvedama bent 10 kartų mažiau klaidingų nukleotidų, palyginus su M-MuLV AT (83). Minėtos savybės leidžia šį fermentą sėkmingai panaudoti vieno etapo AT-PGR.

Dalis mokslininkų pastangų buvo skirta siekiant sukurti atvirkštinės transkripcijos fermentus, sugebančius į sintetinamą grandinę efektyviai įtraukti nenatūralius nukleotidus arba atpažinti ir kaip matricą naudoti modifikuotas nukleorūgštis. Tokie fermentai dažniausiai reikalingi įvairiems sintetinės biologijos metodams.

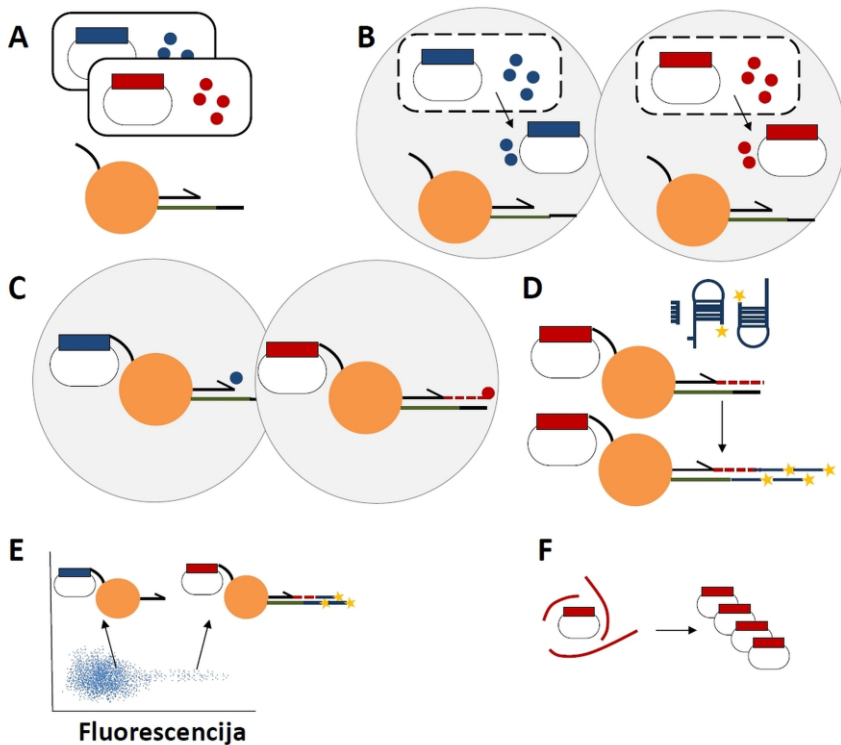
Dr. Holigerio (Philipp Holliger) vadovaujami mokslininkai iš *Thermus aquaticus* DNR polimerazės geno paruošė biblioteką ir pasitelkę autoamplifikacijos kompartmentuose (*angl. CSR*) metodą atrinko mutantus, sugebančius į sintetinamą grandinę įtraukti ne tik įprastus dNTP, bet ir NTP. Tai reiškia, kad atrinkti mutantai pasižymi RNR polimerazės aktyvumu. Taip pat pademonstruota, kad tokiu būdu susintetinta hibridinė RNR-DNR grandinė gali būti padauginama vykdant PGR, todėl tie patys mutantai turi ir atvirkštinės transkriptazės aktyvumą. Po to parodyta, kad gautieji mutantai atpažįsta dar didesnę substratų spektrą, kadangi į sintetinamą grandinę gali įtraukti modifikuotus nukleozidų trifosfatus (2' – fluoro, 2' – azido). Įdomu tai, kad tokiems pokyčiams įgyti užtenka 3 – 4 mutacijų netoli Taq polimerazės aktyvaus centro. Po šio atrankos eksperimento gauti AT aktyvumu pasižymintys mutantai yra stabilūs PGR temperatūriniame režime, ko negali pasiekti įprastos mezofilinės atvirkštinės transkriptazės (160).

Ta pati mokslininkų grupė pristatė ir kitą atrankos eksperimentą, kurio metu gauti atvirkštinės transkripcijos aktyvumą turintys fermentai,

atpažįstantys didelį spektrą ksenonukleorūgščių, t.y. sintetinių nukleorūgščių, kuriose įprastos heterociklinės bazės, fosfodiesterinis karkasas, ribozės ar deoksiribozės žiedai yra pakeisti į nenatūralius. Mutantų biblioteka buvo sukonstruota naudojant geną, koduojantį *Thermococcus gorgonarius* DNR polimerazės mutantą, kuris jau pasižymi atvirkštinės transkriptazės aktyvumu. Po to vykdyta keletas atrankos eksperimentų, kurių metu gauti šios polimerazės variantai, sugebantys kaip matricą naudoti modifikuotas nukleorūgštis.

Pirmiausia atrinkti AT aktyvumą turintys mutantai, atpažįstantys 2'-O-metil modifikuotą RNR. Ši modifikacija yra aptinkama gamtoje ir kai kurios atvirkštinės transkriptazės ją toleruoja, tačiau šiuo atveju tokia nauja savybė buvo atrinkta naudojant archėjinę DNR polimerazę, kas suteikia galimybę AT reakciją vykdyti temperatūrose, siekiančiose iki 90°C. Kitame atrankos eksperimente sukurti mutantai, sugebantys kaip matricą naudoti 2'-metoksi bei 2'-metoksietil RNR – visiškai nenatūralius substratus. Polimerazes tobulinant toliau, buvo atrinkti mutantai, sugebantys vykdyti AT reakciją naudodami tokias dirbtines nukleorūgštis, kuriose penkianaris ribozės žiedas pakeistas į šešianarį heksitolio arba D-altritolio žiedą. Vėliau išbandžius keletą atrankos strategijų buvo atrinkti fermento variantai, pasižymintys padidintu tikslumu, netgi kai substratas yra aukščiau paminėtos ksenonukleorūgštys (161).

Šie įspūdingi *in vitro* evoliucijos eksperimentai buvo atlikti taikant dalelių pažymėjimo kompartmentuose (*angl. CBL, compartmentalized bead labeling*) technologiją, kuri sukurta patobulinus autoamplifikacijos kompartmentuose metodą ir pridėjus ląstelių rūšiavimo galimybę (žr. 20 pav.).



20 pav. Atvirkštinių transkriptazių, atpažįstančių nekanonines nukleorūgštis atrankos eksperimento schema. A – *E. coli* ląstelės transformuojamos naudojant mutantinius baltymus koduojančią genų biblioteką, o magnetinės dalelės paruošiamos prie paviršiaus prijungiant pradmenį ir matricą bei specialų oligonukleotidą, su kuriuo hibridizuojasi plazmidė. B – ruošiama vanduo/alyva tipo emulsija, į lašelį patalpinant po vieną mutantinius baltymus ekspresuojančią *E. coli* ląstelę kartu su specialiai paruoštomis magnetinėmis dalelėmis ir kitais reakcijos mišinio komponentais. C – suirus ląstelėms, plazmidinė DNR hibridizuojasi su specialiu inkaru, esančiu ant magnetinių dalelių paviršiaus, o atrankos sąlygas atitinkantys mutantai sugeba pratęsti pradmenį ir susintetinti nukleorūgščių fragmentus. D – suardžius emulsiją surenkamos magnetinės dalelės ir vykdoma papildoma hibridizacinė grandininė reakcija, kurios metu fluorescenciniu dažų pažymimos magnetinės dalelės, bet tik tos, ant kurių paviršiaus yra lašeliuose vykusios reakcijos produktai. E – dalelės išrūšiuojamos naudojant FACS rūšiuoklį, surenkamos didelę fluorescenciją turinčios dalelės. F – vykdoma izoterminė amplifikacija, padauginant plazmidinę DNR, kuri buvo prijungta prie magnetinių dalelių. Parengta pagal (161).

Kryptingas atvirkštinių transkriptazių savybių keitimas buvo atliekamas ir tobulinant naujos kartos genų redagavimo įrankius. David Liu vadovaujamos laboratorijos mokslininkai pritaikė savo sukurtą PACE metodą (žr. 1.2.3 skyrelį) evoliucionuojant PE (*angl. Prime Editing*) kompleksus. PE komplekso sudėtyje esanti atvirkštinė transkriptazė veikia kartu su Cas9 nikaze bei RNR, nukreipiančia kompleksą į atitinkamą vietą genome. Pažangūs fagų raiška pagrįsti nuolatinės (PACE) ir nenuolatinės (PANCE) evoliucijos metodai suteikia galimybę kryptingai keisti visus komplekso narius. Atlikus eksperimentą, skirtą M-MuLV AT atrankai, šalia kitų baltymo variantų buvo aptikta mutantų, kurie dėka STOP kodono atsiradimo jungiamajame subdomene prarado RNazės H domeną. Tai rodo, kad efektyviau veikia genomo redagavimo įrankiai, turintys mažesnę, kompaktiškesnę atvirkštinės transkriptazės baltymą. Dėl šios priežasties buvo sukurti PE kompleksai, turintys mažesnio dydžio AT aktyvumu pasižyminčius baltymus – introninę AT iš *G. stearothermophilus*, Tfl retrotranspozoną iš *S. pombe* bei Ec48 AT, koduojamą *E. coli* retroelementų sekų. Visi šie sukurti kompleksai buvo gerokai patobulinti pritaikius aukščiau paminėtus evoliucijos metodus ir atrinkus tinkamiausius atvirkštinių transkriptazių mutantus (151).

2 MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Prietaisai ir priemonės

Stalinė purtyklė, stalinė centrifuga 5415D, termocikleris Mastercycler (visi - Eppendorf), spektrofotometras Nanodrop 2000, sekoskaitos aparatas Ion PGM, sekoskaitos gardelė ir rinkinys Ion 316 v2 (visi - Thermo Fisher Scientific), ultracentrifuga TL-100, fiksuoto kampo rotorius TLA100.2, 1ml ultracentrifugavimo mėgintuvėliai (visi - Beckman), nitroceliuliozės membrana Protran BA 85 (Schleicher & Schuell), kriogeniniai mėgintuvėliai (Corning), Typhoon Trio skeneris (GE Healthcare), ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), Realus laiko PGR aparatas Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), Agilent 2100 bioanalyzer kapiliarinės elektroforezės įranga (Agilent Technologies).

2.2 Medžiagos

Agarozė, 50x TAE buferis, DTT, EDTA, BSA, Bredfordo reagentas, poli(rA)/oligo(dT)₁₂₋₁₈, dNTP, rNTP, vanduo be nukleazių, 3M Na acetatas (pH 5,0 esant 25°C) (visi – Thermo Fisher Scientific), dPTP, 8-oxo-dGTP (TriLink BioTechnologies), etilo alkoholis (Vilniaus degtinė), DMSO, fenolis, chloroformas, NaH₂PO₄, NaCl, LiCl, KCl, imidazolas, merkaptoetanolis, Triton X-100, glicerolis, ampicilinas, anhidrotetraciklinas, celiuliozės fosfatas P11, amonio persulfatas, etidžio bromidas, magnio acetatas, spermidinas, KOH, HEPES, mineralinė alyva, formamidas, trichloracto rūgštis (visi - SIGMA), Ni-NTA (Qiagen), akrilamidas/bisakrilamidas 39:1 ir TEMED (ROTH), [3H]-dTTP (PerkinElmer), DE-81 popierius (Whatman), 2,5',8 - ³H adenoizino 5' - trifosfatas (295,2 Ci/mmol, GE Healthcare), sacharozė (Fluka), mielių tRNR (Roche), ABIL EM 90 (Goldschmidt), karbamidas (AMRESCO), GeneScan 500 ROX ir GeneScan LIZ1200 dydžių standartai (Applied Biosystems), Luria-Bertani (LB) terpė (Difco).

Baltymai (Thermo Fisher Scientific): restrikcijos endonukleazės XmaJI (#ER1561), NcoI (#ER0572), EcoRI (#ER0271), Esp3I (#ER0451), HindIII (#ER0505), Taq DNR polimerazė (#EP0402), Pfu DNR polimerazė (#EP0502), T7 RNR polimerazė (#EP0111), ribonukleazių inhibitorius RiboLock (#EO0381), DNazė I (#EN0521), T4 DNR ligazė (#EL0014), RevertAid atvirkštinė transkriptazė (#EP0441), T4 polinukleotidų kinazė (#EK0031), Phusion Hot-Start II High Fidelity DNR polimerazė (#F549L), egzozonukleazė I (#EN0581).

Oligodeoksiribonukleotidai (Metabion): pro-pIVEX 5'-GCG AGCCCGATCTTCCCCATCG-3', pD-ter 5'-AAGAAGACACGAT CCACCG-3', RD_Nde 5'-CTTTAAGAAAGAGGAGAAATTACATA TG-3', pD_55 5'-GCCGGGCGCGGTTG-3', pD_42 5'-TTACGGCTGGAG GTG-3', M_F 5'-GATCAAGCCCCAC ATACAGAGAC-3', M_2R 5'-GCC CTGCTTCTCGTCGACA-3', M_Esp 5'-ATCGTCTCCCATGGGCATGAC CCTAAATATAGAAGATGAG-3', M_Eri 5'-AATGAATTCATTAATT AAGCGGGAATTGGGTG-3', M_1R 5'-CAGGGCCCCGAGTACC TTG-3', M_3F 5'-CCAGTTCGACCGGTGG-3', M_Hind3+ 5'-CGGATCAAGC TTAATTAATTAAGCGGGAATTGGGTG-3', α ssrA 5'-TTAAGCTGCTA AAGCGTAGTTTTCTGTCGTTTGCRACTA-3', EMI 5'-GGTTGAG CACAGGGTACTTTATTGATGG-3', LA-237 5'-CGGGAUACCGUCCAG CGACAUUCUUCUCGGUACAUAUCUCCUUUGG-3', JV-08 5'- CCAAAGGAGATTATGTACCGAGGAAGAATG TCGCTG-3', Eco31I rev 5'-CACGCTCACCGGCTCCAGAT-3', FAMECO 5'-CACGCTCAC CCGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCG A-3', NL_RT 5'-CGCGAACTATCATGGGGTGC-3', NLq_FWD 5'- TTCGTGGAACACCGCAGCGCGA-3', NLq_REV 5'- TTCGATCCGCGCGTTGAGTGGC-3', BAR1_fwd 5'-CCATCTCATCC CTGCGTGTCTTCGTGCGTCAGTTCAGTTNNNNNNNNNNNNNNNG GGTACGTTTCGATAATCGACA-3', BAR2_fwd 5'-CATCTCATCCCTGC GTGTCTTCGTGCGTCAGTTCAACNNNNNNNNNNNNNNNGGGTCA CGTTCGATAATCGACA-3', BAR3_fwd 5'-CCATCTCATCC CTGCGTGTCTTCGTGCGTCAGTTCATTTNNNNNNNNNNNNNNNGGG TCACGTTTCGATAATCGACA-3', BAR4_fwd 5'-CCATCTCATCC CTGCGTGTCTTCGTGCGTCAGTTCACCCNNNNNNNNNNNNNNNGG GTCACGTTTCGATAATCGACA-3' BAR5_fwd 5'-CCA TCTCATCCCTGCGTGTCTTCGTGCGTCAGTTCAGGTNNNN NNNNNNNNNNGGGTTCAGTTTCGATAATCGACA-3' BAR6_fwd 5'-CC ATCTCATCCCTGCGTGTCTTCGTGCGTCAGTTCAGGGNNNNNNNN NNNNNNGGGTTCAGTTTCGATAATCGACA-3' BAR7_fwd 5'-CCA TCTCATCCCTGCGTGTCTTCGTGCGTCAGTTCAAANNNNNNNNN NNNNNNGGGTTCAGTTTCGATAATCGACA-3', BAR8_fwd 5'-CCAT CTCATCCCTGCGTGTCTTCGTGCGTCAGTTCATTNNNNNN NNNNNNNNGGGTTCAGTTTCGATAATCGACA-3', BAR_rev 5'-CCAC TACGCCTCCGCTTTCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTTCGTGCGT CAGTTCAGGGGTGCTCGGATATGCTC-3', A_primer 5'-CCAT CTCATCCCTGCGTGTGTC-3', P_primer 5'-CCACTACGCCTCCGCT TTCCTCTCTATG -3'.

Rinkiniai (Thermo Fisher Scientific): PGR fragmentų gryninimo rinkinys (GeneJET PCR purification kit, #K0701), plazmidžių gryninimo rinkinys (GeneJET plasmid purification kit, #K0502), gryninimo iš gelio rinkinys (GeneJET gel extraction kit, #K0691), RNR gryninimo rinkinys (GeneJET RNA purification kit, #K0731), pirmos grandinės sintezės rinkiniai (RevertAid First Strand cDNA synthesis kit, #K1621 ir Maxima H Minus First Strand cDNA synthesis kit, #K1652), kPGR rinkinys (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x), #K0251), dvigrandės DNR sintezės rinkinys (RevertAid Premium double-stranded cDNA synthesis kit, #K2561), klonavimo rinkinys (CloneJET PCR cloning kit, #K1231), nukleorūgščių gryninimo sekoskaitai rinkinys (MagJET NGS cleanup and size selection kit, #K2821), sekoskaitos rinkinys (Ion PGM sequencing 200 kit V2), sekoskaitos gardelė (Ion 316 V2). Kitų gamintojų rinkiniai: *in vitro* transliacijos rinkinys (RTS100, *E. coli* HY kit, Roche), kapiliarinės elektroforezės rinkinys (Agilent High Sensitivity DNA Kit, #5067-4626, Agilent Technologies).

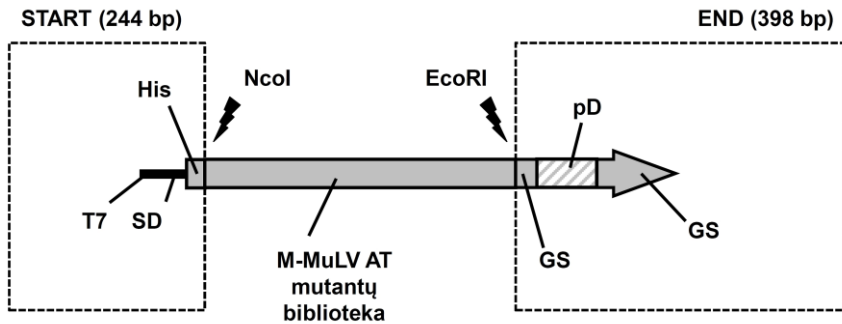
Mikroorganizmų kamienai: *E. coli* ER2566, DH10B.

Programinė įranga: Prism 4 (GraphPad Inc), Vector NTI (Life Technologies), MultiProt serveris (2011m. versija), MODELLER 9.9, PyMOL, I-Tasser serveris (2011m. versija), PDB, TotalLab, ABI PRISM GeneMapper 3.0.

2.3 Metodai

2.3.1 Vektoriaus konstravimas

Vektorius pET_his_MLV_pD, turintis M-MuLV atvirkštinės transkriptazės geną, buvo konstruojamas pET tipo plazmidėje su modifikuotu T7 polimerazės promotoriumi ir Shine – Dalgarno seka (21 pav.). Į plazmidę buvo įterptas M-MuLV genas, turintis histidino inkarą N – gale. Per glicino ir serino aminorūgštis koduojantį jungtuką atvirkštinės transkriptazės genas C – gale sulietas su lambda bakteriofago D baltymo dalimi, už kurios įterptas antras glicino ir serino aminorūgštis koduojantis jungtukas. Neaktyvų M-MuLV atvirkštinės transkriptazės variantą koduojantis vektorius ruošiamas pET_his_MLV_pD fragmentuojant restrikcijos endonukleaze XmaII ir liguojant susidariusius lipnius galus. Susidaręs vektorius pET_his_MLV_del_pD turi 171 nukleotidu trumpesnę M-MuLV geną, kuris koduoja atitinkamai 57 aminorūgštimis trumpesnę M-MuLV baltymą, nepažeidžiant skaitymo rėmelio. DNR sekos pateiktos publikacijoje (162), papildomų duomenų skyriuje.



21 pav. M-MuLV atvirkštinę transkriptazę koduojančio vektoriaus schema. M-MuLV atvirkštinės transkriptazės genas apsuptas histidino inkaro N – gale, o C – gale per glicino – serino jungtuką prilietas lambda bakteriofago D baltymas. DNR fragmentai, pažymėti START ir END prie M-MuLV genų bibliotekos iš naujo priliguojami po kiekvieno atrankos etapo, siekiant apsaugoti reguliatorines sekas nuo mutacijų atsiradimo fermentinių reakcijų metu. His – histidino inkaras, T7 – T7 RNR polimerazės promotorius, SD – Shine – Dalgarno seka, GS – glicino ir serino jungtukas, pD – lambda bakteriofago D baltymas.

2.3.2 mRNR ruošimas *in vitro* transliacijai

Fragmentai mRNR sintezei buvo paruošti vykdant PGR, matrica naudojant pET_his_MLV_pD plazmidę, koduojančią laukinio tipo atvirkštinę transkriptazę ir pradmenis pro-pIVEX bei pD-ter. Reakcija vykdyta Taq DNR polimerazės buferyje (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40), esant 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mišinio, 8% DMSO, 0,04 vnt/μl Taq DNR polimerazės, 0,01 ng/μl plazmidės, taikant temperatūrų režimą 3 min. 94°C, 30 ciklų (45 sek. 94°C, 45 sek. 53°C, 4 min. 72°C), 6 min. 72°C. *In vitro* transkripcija vykdoma 3 val. 37°C temperatūroje 100 μl tūryje, naudojant 20 μl PGR produkto, T7 RNR polimerazės buferyje (200 mM HEPES-KOH pH 7,6 esant 25°C, 30 mM Mg acetato, 2 mM spermidino; 40 mM DTT), esant 7 mM kiekvieno rNTP, 80 vnt. ribonukleazijų inhibitoriaus RiboLock ir 80 vnt. T7 RNR polimerazės. Reakcijos produktai gryninami pridodant 100 μl +4°C temperatūros vandens be nukleazijų ir 200 μl 6 M LiCl, inkubuojant 30 min +4°C ir centrifuguojant 30 min +4°C temperatūroje 25000 x g. RNR nuosėdos plaunamos naudojant 500 μl 75% etanolio ir centrifuguojama 5 min +4°C temperatūroje 25000 x g. Toliau nuosėdos džiovinamos 12 min kambario temperatūroje ir ištirpinamos

naudojant 200 μ l vandens be nukleazių, purtant 1400 apsisukimų greičiu stalinėje purtyklėje +4°C temperatūroje. Neištirpusi RNR pašalinama centrifuguojant 5 min +4°C temperatūroje 25000 x g ir perkeliant 180 μ l supernatanto į kitą mėgintuvėlį. Pridedama 20 μ l 10x DNazės I buferio su Mg²⁺, 1 vnt. DNazės I ir inkubuojama 20 min. 37°C temperatūroje. RNR gryninama pridant 20 μ l Na acetato (pH 5,0 esant 25°C) ir 500 μ l 96% etanolio. Inkubuojama 30 min -20°C temperatūroje ir centrifuguojama 30 min (+4°C) 25000 x g. RNR nuosėdos plaunamos du kartus naudojant 500 μ l 75% etanolio, RNR džiovinama ir ištirpinama naudojant 40 μ l vandens be nukleazių ir purtant 15 min +4°C temperatūroje stalinėje purtyklėje. RNR koncentracija nustatyta spektrofotometriškai ir vykdant elektroforezę agarozės gelyje, lyginant su dydžių standartu RiboRuler™ RNA Ladder (#SM1823).

2.3.3 kDNR padauginimas ir PGR fragmentų ruošimas atrankos eksperimentui

Kopijinė DNR buvo padauginama vykdant dviejų etapų “lizdinę” PGR. Pirmoji amplifikacija vykdoma naudojant 0,5 μ M koncentracijos pradmenis RD_Nde ir pD_55 Taq DNR polimerazės buferyje (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0,08% (v/v) Nonidet P40), esant 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mišinio, 0,02 vnt/ μ l Taq DNR polimerazės ir 0,02 vnt/ μ l Pfu DNR polimerazės koncentracijai bei taikant temperatūrų režimą: 3 min. 94°C, 25 ciklai (45 sek. 94°C, 45 sek. 58°C, 2 min. 72°C), 5 min. 72°C. Antroji amplifikacija vykdant principinį eksperimentą buvo atliekama naudojant 0,5 μ M koncentracijos pradmenis M_F ir M_2R tokios pačios sudėties mišinyje kaip aprašyta anksčiau, taikant temperatūrų režimą 3 min. 94°C, 23 - 30 ciklų (45 sek. 94°C, 45 sek. 57°C, 1 min. 72°C), 5 min. 72°C. Antroji amplifikacija ruošiant pilno ilgio fragmentus atrankos eksperimento metu vykdoma tokios pačios sudėties mišinyje kaip aprašyta anksčiau, naudojant 0,5 μ M koncentracijos pradmenis M_Esp ir M_Eri ir taikant temperatūrų režimą 3 min. 94°C, 23 - 30 ciklų (45 sek. 94°C, 45 sek. 55°C, 2 min. 72°C), 5 min. 72°C. PGR produktai, atitinkantys pilno ilgio fragmentus buvo gryninami iš gelio naudojant gryninimo rinkinį (GeneJET gel extraction kit). Išgryninti PGR produktai fragmentuojami naudojant EcoRI ir Esp3I restrikcijos endonukleazes ir pergryninami iš gelio. Pilno ilgio konstrukcija ruošama prieš šių produktų priliguojant START (244 bp) ir END (398 bp) fragmentus. Ligavimo reakcija vykdoma T4 DNR ligazės buferyje (40 mM Tris-HCl, pH7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 5 mM ATP), naudojant 2 vnt. T4 DNR

ligazės, 200 ng paruošto bibliotekos fragmento, 35 ng START fragmento ir 60 ng END fragmento, 1 val. kambario temperatūroje. START fragmentas prieš tai paruošiamas vykdant PGR, naudojant pET_his_MLV_del_pD plazmidę ir pradmenis pro-PIVEX bei M_1R, PGR produktą fragmentuojant restriktaze NcoI ir gryninant iš gelio 244 bp ilgio fragmentą. END fragmentas prieš tai paruošiamas vykdant PGR, naudojant plazmidę pET_his_MLV_del_pD ir pradmenis M_3F ir pD-ter, PGR produktą fragmentuojant restrikcijos endonukleaze EcoRI ir gryninant iš gelio 398 bp ilgio fragmentą. Po ligavimo reakcijos pilna konstrukcija padauginama vykdant PGR 100 µl tūryje, naudojant Taq polimerazės buferį su DMSO (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40, 8% DMSO), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mišinio, 1,25 vnt. Taq DNR polimerazės, 1,25 vnt. Pfu DNR polimerazės, pradmenis pro-PIVEX ir pD-ter ir 3 µl ligavimo reakcijos mišinio, taikant temperatūrų režimą 3 min. 94°C, 30 ciklų (45 sek. 94°C, 45 sek. 53°C, 4 min. 72°C), 6 min. 72°C.

2.3.4 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų bibliotekos ruošimas

Mutantų biblioteka buvo ruošiama naudojant plazmidę pET_his_MLV_pD ir vykdant klaidingą PGR. Mutacijų įvedimui pritaikyti nukleotidų analogai dPTP ir 8-oxo-dGTP (109). Klaidinga PGR vykdoma 100 µl reakcijos tūryje Taq DNR polimerazės buferyje (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40) naudojant 0,5 µM koncentracijos pradmenis M_Esp ir M_Eri, esant 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mišinio, 100 nM dPTP, 5 µM 8-oxo-dGTP, 2 vnt. Taq DNR polimerazės ir 150 ng plazmidės, taikant temperatūrų režimą 3 min. 94°C, 30 ciklų (30 sek. 94°C, 30 sek. 55°C, 2 min. 72°C), 5 min. 72°C. PGR produktas išgrynintas naudojant PGR fragmentų gryninimo rinkinį (GeneJET PCR purification kit), fragmentuotas naudojant restrikcijos endonukleazes Esp3I ir EcoRI ir pergrynintas iš agarozės gelio naudojant rinkinį (GeneJET gel extraction kit). Produkto koncentracija ir grynumas įvertintas spektrofotometriškai. PGR produktas, fragmentuotas REazėmis naudojamas ligavimo reakcijoje, kuri vykdoma 150 µl tūryje T4 DNR ligazės buferyje (40 mM Tris-HCl, pH7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP), esant 1300 ng ($5,9 \times 10^{11}$ molekulių) produkto, 330 ng START fragmento, 550 ng END fragmento ir 15 vnt. T4 DNR ligazės. Reakcija vykdoma 16 val. +4°C temperatūroje, baltymai pašalinami naudojant ekstrakciją fenoliu ir chloroformu, reakcijos produktai išsodinti naudojant etanolį ir ištirpinti 53 µl vandens. Gauta M-MuLV mutantų biblioteka toliau

padauginta vykdant PGR, kaip aprašyta 2.3.3 skyrelyje, o DNR koncentracija nustatyta vykdant elektroforezę agarozės gelyje.

Mutagenezės efektyvumas ir bibliotekos kokybė įvertinama liguojant gautą produktą į pET_his_MLV_pD plazmidę, fragmentuotą restrikcijos endonukleazėmis NcoI ir EcoRI, ligatu transformuojant *E. coli* ląsteles bei nuskaitant 10 atsitiktinai parinktų individualių klonų sekas. Mutacijos buvo tolygiai pasiskirsčiusios per visa geną. Išanalizavus 10 mutantų, aptikta 20 tranzicijų, 1 transversija ir 2 delecijos, lemiančios 15 aminorūgščių pasikeitimų, 5 tylinčias mutacijas, 1 STOP kodono atsiradimą ir 2 skaitymo rėmelio poslinkio mutacijas.

2.3.5 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų sekų nustatymas

Po paskutinio atrankos etapo, atrinktus M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantus koduojantys genai padauginami vykdant PGR įprastos sudėties Taq DNR polimerazės reakcijos mišinyje, naudojant 0,5 μM M_Esp ir M_Hind3+ pradmenų koncentracijas ir taikant temperatūrų režimą 3 min. 94°C, 10-30 ciklų (30 sek. 94°C, 30 sek. 53°C, 2 min. 72°C), 5 min. 72°C. Reakcijos produktai gryninami vykdant elektroforezę agarozės gelyje ir naudojant rinkinį (GeneJet gel extraction kit). Išgryninti produktai fragmentuojami naudojant restriktazes HindIII ir Esp3I ir dar kartą gryninami iš gelio bei liguojami į vektorių, kuris buvo paruoštas fragmentuojant plazmidę pET_his_MLV_pD restriktazėmis NcoI ir HindIII bei išgryninant ilgesnį produktą. Po ligavimo reakcijos gaunama nauja plazmidė pET_his_MLV (7474 bp), koduojanti M-MuLV atvirkštinę transkriptazę be sulietų papildomų baltymų C - gale, tačiau su histidiniu inkaru baltymo N - gale. Gauta plazmidė naudojama *E. coli* ER2566 kamieno bakterijų transformacijai. Iš atsitiktinai parinktų individualių klonų užauginamas nedidelis tūris (5 ml) biomasės, išgryninama plazmidinė DNR naudojant rinkinį (GeneJET plasmid purification kit) ir taikant kapiliarinę (Sengerio) sekoskaitą nustatomos M-MuLV AT mutantų sekos.

2.3.6 Taškinių ir daugybinių M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų ruošimas

Taškinių ar daugybinių mutacijos į M-MuLV AT geną buvo įterpamos naudojant megapradmenų metodą (163). Pirmiausia vykdoma PGR, paruošiant geno fragmentą, turintį tikslią mutaciją. Išgrynintas fragmentas naudojamas vykdant kitą PGR, kurioje jis tarnauja kaip megapradmuo, tokiu būdu susintetinant pilno ilgio geną su tiksline mutacija. Įprastai buvo

vykdoma 25 – 30 PGR ciklą 100 µl reakcijos tūryje naudojant 2 vnt. Phusion Hot-Start II DNR polimerazės Phusion HF buferyje, 0,25 mM dNTP ir 0,4 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų arba 0,02 µM megapradmens ir 0,4 µM atvirkštinio pradmens antros PGR metu.

2.3.7 Baltymų gryninimas ir charakterizavimas

E. coli ER2566 kamieno biomasė, turinti plazmidę su atitinkamu M-MuLV AT mutantu, auginama 37°C temperatūroje 200 ml tūryje LB terpės su 50 µg/ml ampicilino, kol pasiekiamas 0,7 optinio vieneto tankis, matavimui naudojant 590 nm bangos ilgį. Baltymų raiška indukuota pridodant izopropil β-D-1-tiogalactopyranozido (IPTG) iki 1 mM koncentracijos ir auginama dar 3 valandas. Ruošiant preparatus preliminariam atvirkštinės transkriptazės mutantų charakterizavimui, baltymai gryninti taikant giminingumo chromatografiją. Nuosėdos, gautos nucentrifugavus biomasę, užpilamos 10 tūrių ardymo buferio (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazolo, pH 8.0 esant 25°C, 10 mM - β-merkptoetanolio, 0.1% Triton X-100) ir ardamos ultragarsu ledų vonioje, ląstelių nuolaužos pašalinamos centrifuguojant +4°C temperatūroje, supernatantas užnešamas į kolonėlę, kurioje yra 2 ml Ni-NTA sorbento, nulygsvarinto naudojant užnešimo buferį. Praplovimas vykdomas naudojant 10 kolonėlės tūrių praplovimo buferio, eliucija atliekama naudojant 2 kolonėlės tūrius eliucijos buferio. Praplovimo ir eliucijos buferiai paruošti į ardymo buferį pridodant imidazolo atitinkamai iki 20 mM ir 250 mM koncentracijos. Išgryninti baltymai dializuojami prieš 50 tūrių saugojimo buferio (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,1% (v/v) Triton X-100 ir 50% (v/v) glicerolio). Ruošiant preparatus biocheminei baltymų analizei, reikalingas didesnis grynumas, todėl gryninimui naudotos dvi stadijos. Biomasė iki indukcijos auginama kaip aprašyta aukščiau, baltymų raiška indukuota pridodant IPTG iki 0,1 mM koncentracijos ir papildomai auginta 6 val. 27°C. Giminingumo chromatografija vykdoma kaip aprašyta aukščiau, jonų mainų chromatografija atliekama apjungiant baltymų frakcijas, gautas gryninant su Ni-NTA sorbentu, ir praskiedžiant jas 9 tūriais užnešimo buferio (25 mM Tris-HCl, pH 8,0 esant 25°C, 20 mM NaCl, 0,2% (v/v) Triton X-100). Praskiestas preparatas užnešamas ant kolonėlės, kuri buvo užpildyta P11 sorbentu ir nulygsvarinta naudojant užnešimo buferį. Baltymo eliucija atlikta naudojant tiesinį 20 mM – 1000 mM NaCl gradientą užnešimo buferyje. Išgryninti baltymai dializuojami naudojant 50 ml saugojimo buferio ir saugomi -20°C temperatūroje. Baltymų grynumas nustatytas vykdant

elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje, o koncentracija nustatyta naudojant Bredfordo reagentą ir BSA standartą.

2.3.8 M-MuLV atvirkštinės transkriptazės aktyvumo matavimas

M-MuLV atvirkštinės transkriptazės preparato skiedimai vykdomi buferyje (30 mM HCl, pH 8,3 esant 25°C, 10 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA). Fermento aktyvumo vienetai nustatyti naudojant reakcijos mišinį su tričiu žymėtu dTTP (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 40 mM KCl, 0,5 mM dTTP, 0,4 MBq/ml (~ 1-2,7 μM; ~370-925 GBq/mmol) [3H]-dTTP, 0,4 mM poli(rA)/oligo(dT)₁₂₋₁₈. Reakcija vykdoma 10 min. 37°C arba 50°C temperatūroje, reakcijos produktai užnešami ant DE-81 popieriaus. Popieriaus lapeliai plaunami 7,5 % NaH₂PO₄ tirpalu, išdžiovinami ir matuojamas į polinukleotidinę grandinę įjungto [3H]-dTTP kiekis. Vienu atvirkštinės transkriptazės vienetu laikomas fermento kiekis, reikalingas 1 nmol dTMP įjungti į polinukleotidinę grandinę per 10 min. 37°C arba 50°C temperatūroje.

2.3.9 Kopijinės DNR sintezės skirtingose temperatūrose matavimas

Kopijinės DNR sintezės rinkinys (RevertAid First Strand cDNA synthesis kit) buvo panaudotas tikrinant išgrynintų termostabilių M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų pajėgumą sintetinti kopijinę DNR skirtingose temperatūrose. Reakcija vykdyta gamintojo rekomenduojamomis sąlygomis, termocikleryje taikant temperatūrų gradientą, matrica naudojant rinkinyje pateikiamą 1,1 kb ilgio poliadenilintą RNR ir oligo(dT)₁₈ pradmenį. Reakcijos produktai analizuoti vykdant šarminę elektroforezė ir analizuojami dažant etidžio bromidu.

2.3.10 Kopijinės DNR sintezės greičio matavimas

Atrinktų termostabilių M-MuLV mutantų kDNR sintezės greitis buvo įvertintas matuojant [3H]-dTTP įjungimą į sintetinamą grandinę. Į AT buferį (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM dNTP) esant 1 μM dTTP koncentracijai (2,805 TBq/mmol) pridedama sulydytos su EM1 pradmeniu 1,3 kb RNR matricos iki 200 nM koncentracijos ir fermento iki 10 nM koncentracijos. Reakcijos vykdomos 37°C arba 50°C temperatūroje ir stabdomos po 0, 8, 15, 30, 60, 120, 240 bei 300 min inkubavimo pridedant EDTA iki 20 mM galutinės koncentracijos. Reakcijos produktai užnešami ant DE-81 popieriaus. Popieriaus lapeliai plaunami 7,5 %

NaH₂PO₄ buferiu, išdžiovinami ir matuojamas lapelių radioaktyvumas. Įjungto dTMP kiekis apskaičiuojamas lyginant išmatuotą lapelių radioaktyvumą su viso reakcijos mišinio radioaktyvumu. Apskaičiuota bendro įjungtų nukleotidų kiekio priklausomybė nuo reakcijos laiko. Pradinio reakcijos greičio reikšmės apskaičiuotos iš gauto grafiko tiesinės dalies polinkio kampo.

2.3.11 Tričiu žymėtos RNR sintezė ir gryninimas

M-MuLV AT baltymą koduojanti mRNR buvo sintetinama *in vitro* reakcijos mišinyje (200 mM HEPES-KOH, pH 7,6 esant 25°C, 30 mM magnio acetato, 40 mM DTT, 2 mM spermidino, 7 mM kiekvieno rNTP, 1 vnt/μl RiboLock ribonukleazių inhibitoriaus, 0,8 vnt/μl T7 RNR polimerazės) esant 10 ng/μl DNR fragmento, koduojančio atvirkštinę transkriptazę ir 180 μCi 2,5',8 – ³H adenzino 5' – trifosfatas (295,2 Ci/mmol). Reakcija vykdoma 37°C 3val, radioaktyvi mRNR išsodinama naudojant 3M LiCl, nuosėdos plaunamos 75% etanoliu, ištirpinamos vandenyje, DNR likučiai pašalinami naudojant DNazę I, RNR išsodinama naudojant etanolį ir ištirpinama vandenyje. RNR analizuojama vykdant elektroforezę, koncentracija išmatuojama spektrofotometriškai, nustatytas specifinis radioaktyvumas 704000 cpm/μg.

2.3.12 Keturnario komplekso sintezė ir gryninimas

Keturnaris kompleksas sintetinamas naudojant RTS 100 *in vitro* transliacijos rinkinį. Reakcija vykdoma 25 μl tūryje, prie rinkinyje pateikiamų komponentų pridėdant 25 vnt. RiboLock ribonukleazių inhibitoriaus, 10 mM DTT, 200 μM αssrA oligo ir 1,2 μg mRNR be STOP kodono. Tiriant keturnario komplekso stabilumą, naudojama tričiu žymėta RNR, žr. 2.3.12. Reakcija vykdyta 20 min. 30°C ir sustabdoma pridėdant 155 μl +4°C buferio WBK₅₀₀ (50 mM Tris-acetato, pH 7,5 esant 25°C, 50 mM NaCl, 50 mM Mg acetato, 500 mM KCl) su 10 mM DTT, 0,1% (v/v) Triton X-100. Paimama 160 μl reakcijos mišinio, užpilama ant 840 μl 35% sacharozės tirpalo WBK₅₀₀ buferyje su 10 mM DTT ir 0,1% (v/v) Triton X-100 1ml ultracentrifugavimo mėgintuvėlyje. Keturnaris kompleksas gryninamas ultracentrifuguojant 100000 rpm greičiu 9 min +4°C temperatūroje, naudojant TL-100 ultracentrifugą ir TLA100.2 fiksuoto kampo rotorį. Išgrynintas keturnaris kompleksas ištirpinamas 30 μl to paties WBK₅₀₀ buferio su DTT ir Triton X-100.

2.3.13 Keturnario komplekso disociacijos matavimas

Siekiant sumažinti nespecifinę RNR sorbciją, nitroceliuliozės lapeliai inkubuojami 0,5 M NaOH tirpale 30 minučių ir plaunami su dideliu dejonizuoto vandens pertekliumi, siekiant sumažinti nespecifinę RNR sorbciją (164).

Tiriant keturnario komplekso stabilumą prieš termostabilių M-MuLV AT mutantų atranką, lapeliai lygsvarinami plaunant dideliu pertekliumi AT reakcijos buferio (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT) su 10 ng/μl mielių tRNR, po to 1 μl tričiu žymėto keturnario komplekso (~8x10⁹ molekulių) dedama į 50 μl 1x atvirkštinės transkriptazės buferio su 1 mM kiekvieno dNTP ir inkubuojama įvairiose temperatūrose skirtingą laiką. Po inkubavimo, komplekso disociacija stabdoma atšaldant reakcijos mišinį iki +4°C ir pridodant MgCl₂ iki 50 mM koncentracijos, taip pat pridodama mielių tRNR iki 50 ng/μl. Reakcijų mišiniai filtruojami per nitroceliuliozės filtrus, kurie po to praplaunami naudojant 200 μl of 1x atvirkštinės transkriptazės buferio su 50 mM MgCl₂, džiovunami ir matuojamas jų radioaktyvumas.

Tiriant keturnario komplekso stabilumą prieš M-MuLV AT mutantų atranką Taq buferyje, nitroceliuliozės lapeliai lygsvarinami naudojant 1x Taq buferį (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,08% Nonidet P40) su 10 ng/μl mielių tRNR, 1 μl tričiu žymėto keturnario komplekso (~8x10⁹ molekulių) dedama į 50 μl 1x Taq buferio su 0,2 mM kiekvieno dNTP ir inkubuojama įvairiose temperatūrose. Stabdant reakcijas ir praplaunant lapelius naudotas 1x Taq buferis su 50 mM MgCl₂.

Tiriant komplekso stabilumą esant 50 mM Mg²⁺ jonų, visuose etapuose naudotas 1x AT buferis su 50 mM MgCl₂ koncentracija.

2.3.14 Emulsijos ruošimas ir kDNR sintezė

Ruošiama 50 μl atvirkštinės transkripcijos reakcijos mišinio, į reakcijos buferį pridodant ribonukleazijų inhibitoriaus RiboLock iki 1 vnt/μl koncentracijos, pradmens pD₄₂ iki 1 mM koncentracijos ir 0,3 μl (~2,7x10⁹) keturnario komplekso. Reakcijos buferis pasirenkamas priklausomai nuo atrankos eksperimento: vykdant termostabilių mutantų atranką, naudotas įprastas M-MuLV AT buferis (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM dNTP), vykdant mažoje dNTP koncentracijoje veikiančių mutantų atranką, naudotas Taq polimerazės buferis (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,08% Nonidet P40). Neigiamos kontrolės vykdomos į reakcijos mišinį nedodant

dNTP, teigiamos kontrolės ruošiamos pridedant 200 vnt. RevertAid atvirkštinės transkriptazės. Alyvos fazė su detergentais ruošiamą į mineralinę alyvą pridedant ABIL EM 90 detergento iki 4% (v/v) (165). Emulsijos ruošiamos +4°C temperatūroje, 5 ml kriogeniniuose mėgintuvėliuose suplakant 950 μl alyvos fazės ir 50 μl reakcijos mišinio. Reakcijos mišinys sulašinamas po 10 μl kas 30 sekundžių, toliau plakama dar dvi minutes. Vykdamas termostabilių mutantų atranką, atvirkštinė transkripcija atliekama 1 val. 42 – 60 °C temperatūroje, reakcijos stabdomos atšaldant reakcijos mišinį iki +4°C temperatūros. Vykdamas mažoje dNTP koncentracijoje veikiančių mutantų atranką, reakcijos vykdomos 42°C temperatūroje trumpinant reakcijos laiką (60, 40, 25, 15, 10 ir 5 min) ir stabdomos atšaldant reakcijos mišinį +4°C temperatūroje bei pridedant EDTA iki 50 mM galutinės koncentracijos.

2.3.15 kDNR gryninimas

Po kDNR sintezės, emulsijos perkeliamos į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 1 minutę 25000 x g greičiu. Alyvos fazė pašalinama, nepaliekiant emulsijos nuosėdų, kurios užpilamos 250 μl surišimo buferio (iš PGR fragmentų gryninimo rinkinio GeneJET PCR purification kit, #K0701). Emulsijos buvo suardytos ekstrahuojant 0,9 ml vandeniu prisotinto eterio, 0,9 ml vandeniu prisotinto etilo acetato ir pakartotinai 0,9 ml vandeniu prisotinto eterio. Pašalinus alyvos fazę, vandeninė fazė džiovinama 5 minutes vakuume kambario temperatūroje. Susintetinta kDNR gryninama naudojant PGR fragmentų gryninimo rinkinį (GeneJET PCR purification kit, #K0701), eliucijai naudojama 30 μl eliucijos buferio.

2.3.16 Atvirkštinių transkriptazių tikslumo matavimas

Matuojant termostabilaus M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutanto mut5 preliminarų tikslumą, kDNR sintezė vykdyta atvirkštinės transkriptazės buferyje (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1mM dNTP) 37°C ir 50°C temperatūroje, naudojant 1,3 kb GAPDH mRNR. Dvigrandė DNR buvo paruošta naudojant RevertAid dvigrandės DNR sintezės rinkinį (#K2561), įterpta į pJET1.2/blunt vektorių (rinkinys CloneJET PCR cloning kit, #K1231) ir transformuota į kompetentines *E. coli* ER2566 ląsteles ir nuskaityti individualūs klonai. Iš viso nuskaityti 15347 nukleotidai, susintetinti naudojant laukinio tipo fermentą ir 21437 nukleotidai, susintetinti naudojant mut5 fermentą.

Matuojant M-MuLV AT mutantų, gautų atliekant atranką Taq buferyje, tikslumą, buvo naudojama *in vivo* susintetinta 250 nukleotidų ilgio RNR. Ruošiant RNR, pirmiausia buvo sukonstruota pASK_NL plazmidė, į pASK tipo vektorių, turinį tetraciklino promotorių, įterpiant NL250 seką. Šiuo vektoriumi transformuotos *E. coli* JM109 kamieno ląstelės, kurios toliau augintos 37°C temperatūroje LB terpėje su ampicilinu (100 µg/ml) iki optinio tankio OD₆₀₀ = 0,5. RNR sintezė pradėta indukuojant anhidrotetraciklinu (0,2 mg/ml). Po indukcijos ląstelės paaugintos 2 valandas ir surinktos centrifuguojant 2000 x g 10 minučių 4°C temperatūroje. Iškart po to, RNR išgryninta naudojant gryninimo rinkinį (GeneJET RNA purification kit). RNR koncentracija nustatyta ir kokybė įvertinta naudojant Nanodrop 2000 spektrofotometrą. NL_250 RNR molekulių kiekis nustatytas naudojant AT-kPGR. kDNR sintezė atlikta 60°C temperatūroje 20 minučių, naudojant pirmos grandinės sintezės rinkinį (Maxima H Minus First Strand cDNA synthesis kit) ir oligonukleotidą NL_RT (0,5 µM galutinė koncentracija). kPGR naudotas rinkinys Maxima SYBR Green qPCR Master Mix ir 0,6 µM pradmenų NLq_fwd bei NLq_rev koncentracija. Reakcijos atliktos naudojant Corbett Rotor-Gene 6000 aparatą ir taikant tokį temperatūrų režimą: 10 min. 95°C, 40 ciklų (15 sek. 95°C, 30 sek. 60°C, 30 sek. 72°C). Kopijų kiekis apskaičiuotas naudojant žinomos koncentracijos DNR standartus.

Prieš atliekant reakcijas, skirtas tikslumo matavimams, paruoštas substratas, prie 0,1 µg NL_250 RNR pridėdant 0,2 µl 100 µM NL_RT oligonukleotido, 0,4 µl 10 mM dNTP ir vandens be nukleazijų iki 14,8 µl bendro tūrio. Mišinys pakaitintas 65°C 5 minutes ir patalpintas į atšaldytą (+4°C) stovėlį. Po to pridėta 2 µl 10 x Taq buferio (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40), 1,2 µl 25 mM koncentracijos MgCl₂ ir po 2 µl baltymų preparatų, skiestų Taq buferyje iki 50 vnt/µl koncentracijos. Reakcijos vykdytos 37°C 20 minučių ir sustabdytos pakaitinant reakcijos mišinį 5 minutes 85°C.

Po to kiekviena susintetinta kDNR molekulė pažymėta 14 nukleotidų ilgio unikaliu molekulės identifikatoriumi (UMI, *angl. unique molecular identifier*). Atliekant žymėjimą, pirmiausia nustatytas susintetintų kDNR molekulių kiekis vykdant kPGR, kaip aprašyta anksčiau. Po to 1,2 x 10⁴ kDNR molekulių paimta į reakciją, kuri vykdyta 200 µl tūryje 1x Phusion HF buferio, pridėdant 4 vnt. Phusion Hot-Start II High Fidelity DNR polimerazės, 0,25 mM dNTP, po 0,05 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmens (BAR1-BAR8, ir BAR_rev). Atlikta PGR, taikant tokį temperatūrų režimą: 30 sek. 98°C, 2 ciklai (10 sek. 98°C, 20 sek. 62°C, 10 sek. 72°C). Po PGR pašalinti pradmenys, į mėgintuvėlius įdedant po 10 µl (200 vnt.) egzonukleazės I ir

inkubuojant 30 min. 37°C temperatūroje. Egzonukleazė denatūruota pakaitinant reakcijos mišinį 5 minutes 98°C. Toliau pridėta pradmenų A ir P iki 0,5 μM koncentracijos ir PGR vykdyta dar 19 ciklų tokiomis pat sąlygomis. Reakcijos produktai išgryninti naudojant nukleorūgščių gryninimo sekoskaitai rinkinį (MagJET NGS cleanup and size selection kit), jų koncentracija ir kokybė įvertinta vykdant kapiliarinę elektroforezę, naudojant Agilent rinkinį (High Sensitivity DNA Kit) ir Agilent kapiliarinės elektroforezės įrangą. PGR produktai atskiesti vandeniu be nukleazių iki 100 pM koncentracijos ir sumaišyti vienodais tūriais. Sekoskaita vykdyta naudojant Ion PGM aparatą ir rinkinį (Ion PGM sequencing 200 kit V2) bei gardelę (Ion 316 V2).

Nustatytos sekos prilygiuotos prie teorinės sekos naudojant Ion Torrent PGM sistemos serverį. Prilygiuotų sekų analizė atlikta taikant Python programa parašytas užduotis ir HTseq įrankį (166). Analizei naudotos kokybės analizės reikalavimus atitinkančios geros kokybės sekos, turinčios įvestus UMI fragmentus. Mutacija sekoje buvo laikoma tikra, jei kokybės koeficientas toje pozicijoje buvo didesnis arba lygus 20. Mažiausiai trys sekos, turinčios identiškus UMI, buvo grupuojamos į sekų šeimas. Buvo laikoma, kad mutacija atsirado kDNR sintezės metu, jei visos tos pačios UMI sekos šeimos nariai turi šią mutaciją. Klaidų skaičius buvo apskaičiuotas sumuojant mutacijų kiekį ir jį padalinant iš visų UMI šeimų sekų ilgių sumos.

2.3.17 Atvirkštinių transkriptazių termostabilumo matavimas

M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų termostabilumas buvo įvertinamas matuojant liekamąjį aktyvumą po inkubavimo 50°C temperatūroje kartu su substratu. Reakcijos mišinys, sudarytas iš 2,4 nM baltymo ir 6 μM substrato poli(rA)/oligo(dT)₁₂₋₁₈ atvirkštinės transkriptazės buferyje (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10mM DTT) inkubuojamas 50°C temperatūroje. Praėjus 0, 8, 15, 30, 60, 120, 240 ir 300 minučių po inkubavimo paimama po 10 μl reakcijos mišinio ir sumaišoma su tokiu pačiu tūriu žymėto mišinio, sudaryto iš 6 μM substrato poli(rA)/oligo(dT)₁₂₋₁₈, 0,5 mM dTTP ir 0,365 μM (0,555 GBq/mmol) [3H]-dTTP atvirkštinės transkriptazės buferyje ir pakaitinto iki 37°C temperatūros. Reakcija vykdoma 20 min 37°C temperatūroje ir sustabdoma pridėdant 5 μl 100 mM EDTA. Reakcijos produktai užnešami ant DE-81 popieriaus. Popieriaus lapeliai plaunami 7,5 % NaH₂PO₄ tirpalu, išdžiovinami ir matuojamas į polinukleotidinę grandinę įjungto [3H]-dTTP kiekis. Liekamojo aktyvumo priklausomybė nuo inkubavimo aukštoje temperatūroje

laiko analizuojama naudojant GraphPad Prism programą. Inaktyvavimo greitis k_{inact} buvo apskaičiuotas taikant pirmo laipsnio eksponentinio nykimo lygtį. Inaktyvavimo puslaikiai apskaičiuoti pagal formulę $\ln(2)/k_{\text{inact}}$.

2.3.18 Sąveikos su substratu stiprumo nustatymas

Oligoribonukleotidas LA-237 buvo pažymėtas naudojant $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ir T4 polinukleotidų kinazę, baltymai pašalinti taikant ekstrakciją fenoliu – chloroformu. Tiriant termostabilių M-MuLV AT mutantų sąveikos su substratu stiprumą, žymėtas LA-237 oligoribonukleotidas buferyje (50 mM Tris-KCl, pH 8,3 esant 25°C, 10 mM EDTA, 20 mM KCl) prilydytas prie DNR oligonukleotido JV-08, pastarojo imant 1,2 karto perteklių. Atvirkštinės transkriptazės baltymų preparatai skiesti naudojant skiedimo buferį (10 mM Tris-HCl (pH 8.3 esant 25°C), 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.2% Triton X-100) ir sumaišyti su 2 pM koncentracijos žymėtu substratu 20 μl reakcijos tūryje surišimo buferyje (50 mM Tris-KCl, pH 8,3 esant 25°C, 10 mM EDTA, 20 mM KCl, 10 % glicerolio) ir inkubuota 30 min kambario temperatūroje. Laisvas ir susirišęs su baltymu RNR-DNR dupleksai atskiriami vykdant elektroforezę 8 % nedenatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje naudojant 40 mM Tris-acetato, pH 8,3 esant 25°C ir 1 mM EDTA buferinį tirpalą. Elektroforezė vykdyta 2 valandas kambario temperatūroje, taikant 10 V/cm įtampą. Radioaktyviai žymėtos zonos gelyje, atitinkančios laisvą substratą ir substrato – baltymo kompleksą, nustatytos naudojant Typhoon Trio skenerį. Moliniai abiejų formų santykiai suskaičiuoti naudojant TotalLab programą. Pusiausvyrinės disociacijos konstantos (K_d) nustatytos prie eksperimentinių duomenų pritaikant lygtį, $[E\cdot S] = \{K_D + [E]_0 + [S]_0 - [(K_D + [E]_0 + [S]_0)^2 - 4 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0]^{0.5}\}/2$, kur $[E]_0$ ir $[S]_0$ yra fermento ir substrato koncentracijos, o $[E\cdot S]$ yra fermento – substrato komplekso koncentracija.

Tiriant M-MuLV AT mutantų, gautų vykdant atranką Taq buferyje, sąveikos su substratu stiprumą, oligoribonukleotidas LA-237 su DNR oligonukleotidu JV-08 sulydytas buferyje (50 mM Tris-HCl, pH 8.8 esant 25°C, 10 mM EDTA ir 20 mM KCl), naudojant JV-08 1,2 karto perteklių. AT baltymų preparatai skiesti 1x Taq buferyje be MgCl_2 (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) ir sumaišyti su 10 pM koncentracijos žymėtu substratu 20 μl tūryje 1x Taq buferyje be MgCl_2 . Mišinys inkubuotas 30 min. kambario temperatūroje. Elektroforezės sąlygos išlaikytos tokios pačios kaip tiriant termostabilius AT mutantus.

2.3.19 kDNR sintezės efektyvumo matavimas

Vykdam termostabilių M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų charakterizavimą, RNR/DNR substratas buvo paruoštas sumaišant 1 µg 1,1 kb ilgio RNR su 1 µl 100 µM oligo(dT)₁₈ oligonukleotido arba 1 µg 7,5 kb ilgio RNR su 1 µl 100 µM Eco31I rev oligonukleotido, pridedant 2 µl 10 mM koncentracijos dNTP iki vandens be nukleazių iki 13,5 µl galutinio tūrio. Mišinys buvo inkubuojamas 65°C temperatūroje 5 minutes ir patalpintas į + 4°C šaldomą stovėlį. Į reakcijos mišinį pridėta atvirkštinės transkriptazės buferio iki galutinės koncentracijos (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT) ir ribonukleazių inhibitoriaus RiboLock iki 1 vnt/µl. Atvirkštinės transkriptazės fermentai skiedžiami iki 100 vnt/µl koncentracijos naudojant skiedimo buferį (10 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,2% Triton X-100). 2 µl (200 vnt.) fermento dedama į 20 µl tūrio reakcijos mišinį. Reakcijos vykdomos 1 val. taikant temperatūrų gradientą. Reakcijos stabdomos pridedant šarminės elektroforezės dažo. Reakcijų produktai analizuoti vykdant šarminę elektroforezę ir analizuojami dažant etidžio bromidu.

Tiriant M-MuLV AT mutantus, gautus atliekant atranką Taq buferyje, substratas buvo paruoštas sumaišant 2 µg 7,5 kb ilgio RNR su 1 µl 10 µM Eco31I rev oligonukleotido 1x Taq buferyje be MgCl₂ (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40). Po to pridėta 0,4 µl 10 mM koncentracijos dNTP ir vandens be nukleazių iki 15,3 µl tūrio. Mišinys buvo inkubuojamas 65°C temperatūroje 5 minutes ir patalpintas į + 4°C šaldomą stovėlį. Į reakcijos mišinį pridėta 3,7 µl 1 x Taq buferio kartu su MgCl₂ (galutinė koncentracija 1,5 mM) ir RiboLock ribonukleazių inhibitoriumi (galutinė koncentracija 1vnt/µl). Baltymų preparatai skiesti 1x Taq buferyje be MgCl₂ iki 100 vnt/µl koncentracijos, 1 µl baltymo įdėta į reakcijos mišinį. Reakcijos vykdomos 42 °C temperatūroje 10, 20, 30, 40 ir 60 minučių ir stabdomos pridedant šarminės elektroforezės dažo. Po to vykdoma šarminė elektroforezė ir reakcijų produktai analizuojami dažant etidžio bromidu.

2.3.20 Procesyvumo matavimas

Vykdam termostabilių M-MuLV AT mutantų procesyvumo matavimus, substratas paruoštas prilydymo buferyje (50 mM Tris-KCl, pH 8,3 esant 25°C, 1 mM EDTA, 40 mM KCl) prie 7,5 kb ilgio RNR (200 nM koncentracijos) prilydant 5' gale FAM žymėtą oligonukleotidą FAMECO (100 nM koncentracijos). Prieš vykdant reakcijas, 10 nM koncentracijos fermentų preparatas inkubuojamas su 2 nM koncentracijos substratu 10 µl reakcijos

buferio (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 50 mM KCl, 10mM DTT) kartu su 5 mM dNTP 30 minučių kambario temperatūroje, kad susiformuotų fermento – substrato kompleksas. Reakcijos pradedamos pridedant 40 µl reakcijos buferio kartu su poli(A)/oligo(dT)₁₈ balastu (50 mM Tris-HCl, pH 8,3 esant 25°C, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 8 mg/ml poli(A), 0,32 mg/ml oligo(dT)₁₈), vykdomos 37°C temperatūroje 30, 40, 50 ir 60 minučių ir stabdomos pridedant EDTA iki 100 mM galutinės koncentracijos. Kontroliniai eksperimentai atlikti pridedant fermentą į substrato ir poli(A)/oligo(dT)₁₈ balasto mišinį ir inkubuojant 37°C temperatūroje 60 minučių.

Susintetinta kDNR atlaisvinama iš kDNR-RNR-AT komplekso pridedant urėjos iki 3 M koncentracijos ir proteinazės K iki 0,5 mg/ml koncentracijos bei inkubuojant 3 valandas 37°C. Proteinazė K denatūruojama kaitinant 65°C temperatūroje 30 minučių bei atliekant ekstrakciją fenolio ir chloroformo mišiniu. Reakcijos produktai išsodinami naudojant etanolį ir ištirpinami 10 µl vandens. Sumaišoma 1 µl reakcijos produkto, 0,24 µl GeneScan 500 ROX dydžių standarto ir 9 µl formamido. DNR fragmentai frakcionuojami vykdant kapiliarinę elektroforezę ABI PRISM 3100 sekoskaitos aparate, naudojant POP7 polimerą bei 50 cm ilgio kapiliarus ir analizuojami naudojant ABI PRISM GeneMapper 3.0 programinę įrangą. Plotas po smailėmis, esančiais kapiliarinės elektroforezės profilyje integruojamas apskaičiuojant kiekvieno žymėto kDNR fragmento intensyvumą, o produkto fragmentų ilgis nustatytas naudojant programoje esantį fragmentų ilgio polimorfizmo analizės modulį. Procesyvumas apskaičiuojamas taikant formulę $P = \frac{\Sigma(L_n * I_n)}{\Sigma(I_n)}$, kur L_n yra kiekvieno kDNR fragmento ilgis, o I_n yra kiekvieno fragmento fluorescencijos intensyvumas.

Dėl riboto GeneScan 500 ROX dydžių standarto fragmentų ilgio ir sekoskaitos gelio savybių, aukščiau aprašyta procedūra tinkama fragmentų, trumpesnių nei 500 bazių analizei. Kadangi kai kurie M-MuLV AT mutantai vieno susirišimo su substratu įvykio metu susintetindavo žymiai ilgesnius produktus, šių mutantų procesyvumo matavimui naudotas skirtingas metodas. DNR oligonukleotidas Eco31Irev pažymėtas naudojant [γ -³³P]-ATP ir T4 polinukleotidų kinazę ir prilydytas prie 7,5 kb RNR. Reakcijos buvo vykdomos kaip aprašyta aukščiau, o produktai analizuoti vykdant elektroforezę šarminiame gelyje, kartu praleidžiant ³³P žymėtų DNR dydžio standartų mišinį. Gelius išdžiovinus, DNR fragmentai vizualizuojami naudojant radioaktyviai žymeį jautrius ekranus. Fragmentų ilgiai ir intensyvumai, reikalingi procesyvumo nustatymui, buvo apskaičiuoti naudojant TotalLab programinę įrangą.

Vykiant M-MuLV AT mutantų, gautų atliekant atranką Taq buferyje, procesyvumo matavimus, substratas buvo paruoštas naudojant kitokios sudėties buferį (50 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 40 mM KCl ir 1 mM EDTA). Prieš vykiant reakcijas, 125 nM koncentracijos fermentų preparatas sumaišytas su 25 nM koncentracijos substratu 10 µl 1 x Taq buferio be MgCl₂, (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40), pridėdant 0,5 mM dNTP ir 30 minučių inkubuotas kambario temperatūroje, kad susiformuotų fermento – substrato kompleksas. Reakcijos pradedamos pridėdant 15 µl 1 x Taq buferio su 2,5 mM MgCl₂ (galutinė koncentracija 1,5 mM) kartu su poli(A)/oligo(dT)₁₈ balastu (8 mg/ml poli(A), 0,32 mg/ml oligo(dT)₁₈). Reakcijos vykdomos 42°C temperatūroje 30, 40, 50 ir 60 minučių ir stabdomos pridėdant EDTA iki 20 mM galutinės koncentracijos. Reakcijos produktai frakcionuoti ir analizuoti taip pat, kaip tiriant termostabilius AT mutantus.

2.3.21 Kinetinė polimerazės reakcijos analizė

Kinetinės M-MuLV AT mutantų, atrinktų trumpinant reakcijos laiką, savybės buvo ištirtos naudojant substratą, kuris gautas sulydant 1 µM koncentracijos 5'-FAM žymėtą oligonukleotidą FAMGAPDH su 1,5 µM koncentracijos 1,3 kb ilgio GAPDH RNR sulydymo buferyje (50 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 40 mM KCl, 0,2 mM EDTA). AT mutantiniai baltymai skiedžiami naudojant 1 x Taq buferį be MgCl₂ (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) ir sumaišomi su paruoštu substratu (galutinė baltymų koncentracija 1 µM, o substrato 40 nM) bei įvairiomis dNTP koncentracijomis (20 µM, 8 µM, 3,2 µM, 1,28 µM kiekvieno dNTP). Mišiniai inkubuojami 5 minutes 42 °C temperatūroje, reakcijos pradedamos pridėdant MgCl₂ iki 1,5 mM koncentracijos, o stabdomos pridėdant EDTA iki 20 mM koncentracijos po 1 – 12 minučių nuo reakcijos pradžios. Susintetintos kDNR molekulės analizuojamos 0,5 µl reakcijos produktų sumaišant su 0,5 µl GeneScan LIZ1200 dydžių standarto ir 9,5 µl formamido. Vykdoma kapiliarinė elektroforezė ABI PRISM 3100 sekoskaitos aparate, naudojant POP7 polimerą bei 50 cm ilgio kapiliarus, rezultatai analizuojami naudojant ABI PRISM GeneMapper 3.0 programinę įrangą. Vidutinis produkto ilgis apskaičiuojamas taip pat, kaip ir matuojant procesyvumą (žr. skyrelį 2.3.21). Žinant vidutinį produkto ilgį, apskaičiuojamas įjungtų dNTP kiekis ir koncentracija. K_m ir V_{max} reikšmės apskaičiuotos pritaikant kinetinius duomenis prie Eadie - Hofstee lygties, k_{cat} reikšmė apskaičiuota pagal formulę $V_{max}/[E]_{total}$, kur $[E]_{total}$ yra viso fermento koncentracija.

2.3.22 RNazės H aktyvumo matavimas

Baltymai skiesti naudojant 1 x Taq buferį be $MgCl_2$ (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 esant 25°C, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) iki 0,2 mg/ml koncentracijos. 5 μ l substrato (240 mM [3H]-poli(A):poli(dT), santykis 1:2) sumaišoma su 1 mg baltymo 50 μ l reakcijos tūryje 1 x Taq buferyje su 1,5 mM $MgCl_2$ ir inkubuojama 20 minučių 37°C temperatūroje. Reakcijos stabdomos mėginius perkeliant į ledus bei pridodant 50 μ l BSA (10 mg/ml) ir 100 μ l 10 % trichloracto rūgšties. Mėginiai inkubuojami leduose 10 minučių ir centrifuguojami 10 minučių 12000 x g. 100 μ l supernatanto paimta mišinio radioaktyvumo skaičiavimui. Atvirkštinių transkriptazių RNazės H aktyvumas apskaičiuotas laikant, kad 1 vnt. fermento per 20 minučių hidrolizuoja 1 nmol RNR, esančios [3H]-poli(A):poli(dT) substrate.

2.3.23 Duomenų analizė

Netiesinės regresijos analizė buvo atlikta naudojant GraphPad Prism 4 programą. Eksperimentų, vykdytų naudojant replikatus, rezultatai pateikiami kaip bent dviejų matavimų vidurkis \pm vienas standartinis nuokrypis.

2.3.24 Pilno ilgio M-MuLV atvirkštinės transkriptazės modelio kūrimas ir validavimas

Pilno ilgio RNazės H domenai buvo sukonstruoti naudojant MultiProt serverį (167), superpozicijos principu sugretinant PDB struktūras 2hb5 (46) ir 2qk9 (168). Superpozicija atlikta taikant 3 Å skiriamąją gebą, atsižvelgiant į baltymų sekas. Atlikus vizualią analizę, tolimesniam konstravimui pasirinkta 2hb5 struktūra be H96 – I104 sekų ir A93 – I239 regionas iš 2qk9 struktūros. Naudojant MODELLER 9.9 programą (169) sugeneruota 300 struktūrų modelių, iš kurių tolimesniam darbui išsirinkta struktūra, turinti mažiausią įvertį.

Pradinis pilno ilgio M-MuLV AT baltymo modelis gautas naudojant I-Tasser serverį (170) ir PDB struktūrą 2fjw:A (171) kaip šabloną, kartu panaudojant PDB M-MuLV struktūras 1rw3:A (30), 1mml:A (44) bei ŽIV atvirkštinės transkriptazės struktūras 1mu2:A (172), 1vrt:A (173) ir 2zd1:A (174). Pradinio M-MuLV AT modelio RNazės H domeno orientacija ir struktūra buvo parinkta pagal ŽIV RNazės H domeno struktūrą. C- α RMSD tarp pradinio modelio ir struktūros 1rw3 buvo 1,09 Å. Galutinis pilno ilgio M-MuLV AT baltymo modelis gautas pradinio modelio RNazės H domeną pakeitus į MODELLER programa sukurtą domeną. Sukeitimas atliktas

naudojant PyMOL programinę įrangą. Struktūra optimizuota pašalinant erdvinius trikdžius, naudojant I-Tasser serverį. Gautas C- α RMSD tarp galutinio modelio ir struktūros 1rw3 buvo 1,04 Å, C- α RMSD tarp galutinio modelio ir struktūros 2hb5 buvo 1,27 Å.

Po M-MuLV AT modelio sukūrimo Tang su bendraautoriais paskelbė pirmą eksperimentiškai nustatytą pilno ilgio M-MuLV AT struktūrą (PDB 5dmq (47)), todėl atsirado galimybė palyginti sumodeliuotą ir eksperimentiškai nustatytą struktūras. Sugretinimas atliktas naudojant PyMOL programą parodė, kad C- α RMSD tarp dviejų minėtų struktūrų yra 2,74 Å. Atlikus vizualinę analizę pastebėta, kad polimeraziniai domenai persikloja labai tiksliai, o RNazės H domenų pozicijos kažkiek nesutampa. Iš palyginio pašalinus RNazės H domeną, nustatytas labai glaudus abiejų struktūrų persidengimas, pasižymintis C- α RMSD 0,83 Å. Taip pat atliktas sukurto modelio sugretinimas su XMLV AT tretine struktūra (PDB 5khq (48)), prieš tai pašalinus RNazės H domeną iš modelio, kadangi XMLV AT struktūroje šio domeno nėra. Šiuo atveju nustatytas C- α RMSD 2,84 Å.

Galiausiai grupei mokslininkų pristačius dirbtiniu intelektu pagrįstą AlphaFold 3 serverį (175), atsirado galimybė sukurti alternatyvų pilno ilgio M-MuLV AT modelį. Palyginus abi struktūras pastebėta, kad RNazės H domenų padėtys gana skirtingos. Tuo tarpu į palyginimą neįtraukus šių domenų, nustatytas labai geras sutapimas tarp abiejų modelių (C- α RMSD 1,19 Å). Naudojant AlphaFold 3 serverį sukurtas dar vienas modelis, kuris panaudotas šiame darbe vizualizuojant įvairių M-MuLV AT motyvų ir mutacijų padėtis. Šis modelis pasirinktas dėl to, kad reprezentuoja visiškai pilno ilgio M-MuLV AT, sąveikaujančią su RNR/DNR hibridu. Tuo tarpu pirmajame modelyje, sukurtame naudojant I-Tasser serverį, yra panaudota dvigrandės DNR molekulė bei trūksta 24 aminorūgščių ilgio N-galinės baltymo dalies.

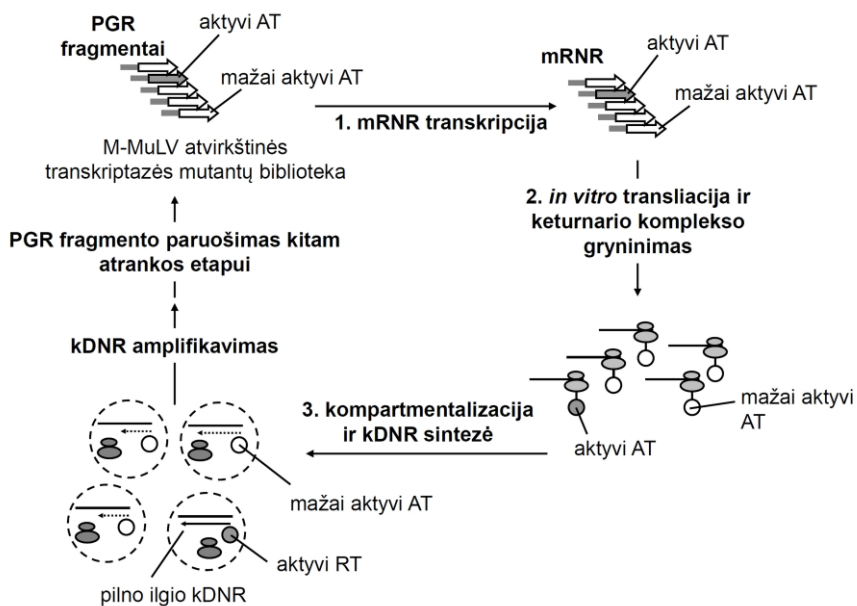
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Metodo savybių tyrimas

Thermo Fisher Scientific Baltics (tuometinės įmonės UAB „Fermentas“) mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centre vadovaujant dr. R. Skirgailai buvo išvystytas baltymų atrankos būdas, pavadintas kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodu (162). Publikuojant tyrimą tarptautinėje mokslinėje spaudoje metodui pavadinti buvo pasirinktas CRD (compartmentalized ribosome display) pavadinimas. Šis metodas apjungia aukščiau aprašytą ribosomų raiškos metodą ir *in vitro* kompartmentalizacijos technologiją (22 pav.).

Palyginus su ribosomų raiška, kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodas turi tokį pranašumą, kad tikslinio baltymo molekulė laisvai sąveikauja su substratu, nebūdama keturnario komplekso sudėtyje, o genotipo – fenotipo ryšiui išlaikyti pasitelkiama kompartmentalizacijos technologija. Tokiu būdu yra sudaromos sąlygos efektyviai pageidaujamu kataliziniu aktyvumu pasižyminčių baltymų selekcijai.

Vykdamas eksperimentą, ruošiama genų biblioteka, mutantinius baltymus koduojančius genus patalpinant už T7 RNR polimerazės promotoriaus. Po to sintetinama ir gryninama RNR, nustatoma jos koncentracija ir vykdoma *in vitro* transliacija. Kadangi transliacijos metu naudojamos mRNR molekulės, neturinčios STOP kodonų, transliacijos pabaigoje mRNR nedisocijuoja nuo ribosomos, tokiu būdu susiformuoja keturnaris kompleksas.



22 pav. Kompartimentalizuotų ribosominių kompleksų metodo schema. Ruošiami M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų biblioteką koduojantys PGR fragmentai ir vykdoma *in vitro* transkripcija (1). Susintetinta mRNR transliuojama *in vitro*, susidaręs keturnaris kompleksas stabilizuojamas žemoje temperatūroje ir didelėje Mg^{2+} jonų koncentracijoje bei gryninamas naudojant ultracentrifugavimą sacharozės tirpale (2). Keturnaris kompleksas sumaišomas su atvirkštinės transkripcijos reakcijos mišinio komponentais ir formuojama emulsija, sudaryta iš $10^{10} \sim 2 \mu m$ skersmens lašelių. Tokiu būdu suformavus emulsiją, didžioji dalis lašelių yra arba tušti arba turi vieną keturnarį kompleksą. Pakėlus temperatūrą, keturnariai kompleksai suyra, aktyvūs atvirkštinės transkriptazės sintetina juos koduojančią kDNR (3). Suardžius emulsiją, kDNR gryninama ir amplifikuojama naudojant PGR, gauti fragmentai ruošiami kitam atrankos etapui.

Įvykus transliacijos reakcijai, susidaręs keturnaris kompleksas stabilizuojamas atšaldant buferiniame tirpale bei pridėdant Mg^{2+} jonų (138). Gryninimas vykdomas centrifuguojant sacharozės tirpale, tokiu būdu pašalinami *in vitro* transliacijos sistemos komponentai, taip pat keturnaris kompleksas sukonzentruojamas.

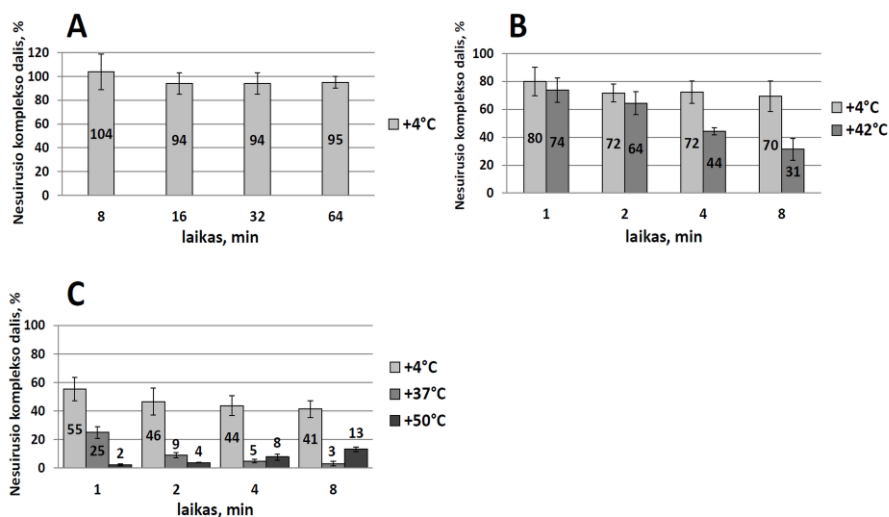
Emulsijos ruošiamos sumaišant keturnarį kompleksą su reakcijos mišinio komponentais ir gautą vandeninę fazę lašinant į alyvą. Tokiu būdu gaunama emulsija sudaryta iš įvairaus dydžio lašelių – jų skersmuo varijuoja nuo 0,5

iki 10 μm , vidutinis lašelio skersmuo yra apie 2 μm , tai atitinka maždaug 4-5 femtolitrų tūrį. Tokiu būdu reakcijos mišinys yra paskirstomas į 10^{10} vandeningos fazės alyvoje kompartmentų, iš kurių dalis turi po vieną keturnarį kompleksą. Emulsiją inkubuojant reakcijos temperatūroje, kompleksas suyra, todėl mutantinis baltymas gali laisvai sąveikauti su substratu ir vykdyti reakciją. Įvykdžius reakciją, emulsija suardoma, gauti produktai išgryninami ir naudojami ruošiant mutantų biblioteką, skirtą kitam atrankos etapui. Tokie atrankos ciklai kartojami, kol iš pradinės didelės mutantų įvairovės gaunama biblioteka, koduojanti baltymus, labiausiai prisitaikiusius išgyventi sukurto evoliucinio spaudimo sąlygomis.

3.1.1 Keturnario komplekso stabilumo tyrimas

Kompartimentalizuotų ribosominių kompleksų (CRD) metodas pirmiausia buvo numatytas taikyti įvairiomis savybėmis pasižyminčių polimerazių atrankai. Taip pat buvo numatyta, kad šis atrankos metodas galėtų būti taikomas ir kitiems nukleorūgštis modifikuojantiems fermentams. Viena pagrindinių metodo savybių yra galimybė kompartmentų viduje esantiems substratui ir fermentui sąveikauti be erdvinių trukdžių, naudojant norimos sudėties reakcijos mišinį. Tam reikalingas pilnas komplekso iširimasis reakcijos sąlygomis. Kita vertus, ruošiant reakcijos mišinį ir jį emulsifikuojant, keturnarį kompleksą būtina išlaikyti nesuirusį, priešingu atveju nukleorūgštis ir baltymas patektų į skirtingus kompartmentus ir genotipo – fenotipo ryšys būtų prarastas.

Dėl šios priežasties prieš pradėdant termostabilių M-MuLV mutantų atranką buvo ištirtas keturnario komplekso stabilumas galutinės sudėties atvirkštinės transkriptazės buferyje, esant 4 mM bendrai dNTP koncentracijai. Prieš pradėdant didesniu sintezės greičiu pasižyminčių mutantų atranką, atliktas analogiškas tyrimas naudojant Taq polimerazės buferį, kuriame buvo bendra 0,8 mM bendra dNTP koncentracija. Palyginimui ištirtas keturnario komplekso stabilumas AT buferyje esant 50 mM MgCl_2 koncentracijai.



23 pav. Keturnario komplekso stabilumas įvairiose sąlygose. A – keturnaris kompleksas inkubuojamas AT buferyje su 50 mM MgCl₂, B – Taq polimerazės buferyje su 1,5 mM Mg²⁺ ir 0,8 mM bendra dNTP koncentracija, C – AT buferyje su 4 mM Mg²⁺ ir 4 mM bendra dNTP koncentracija.

Nustatyta, kad AT buferyje esant 50 mM MgCl₂ koncentracijai, keturnaris kompleksas +4°C temperatūroje išlieka stabilus visą tyrimo laiką, t.y. bent 1 valandą (23 pav. A). Galima numatyti, kad šiomis sąlygomis keturnaris kompleksas išlieka stabilus žymiai ilgiau, nes jo saugojimo buferyje (50 mM Tris-acetato, pH 7,5 esant 25°C, 50 mM NaCl, 50 mM Mg acetato, 500 mM KCl, 10 mM DTT, 0,1% (v/v) Triton X-100) kompleksas yra stabilus kelias paras (duomenys nepublikuoti).

Tiriant komplekso stabilumą Taq polimerazės ir M-MuLV atvirkštinės transkriptazės buferiuose, nustatyta aiški priklausomybė nuo temperatūros. Parodyta, kad temperatūra yra kritinis veiksnys, lemiantis komplekso stabilumą (23 pav. B ir C).

Inkubuojant keturnarį kompleksą 50°C temperatūroje gaunami netikėti rezultatai, nes nesuirusio komplekso dalis laikui bėgant didėja nuo ~2 iki ~13 procentų, nors turėtų mažėti (23 pav. C). Šio reiškinio interpretacija galėtų būti tokia, jog M-MuLV AT denatūruodama aukštoje temperatūroje „užsilydo“ ant substrato, o kadangi baltymas sąveikauja su nitroceliuliozės lapeliais, kartu prikimba ir radioaktyvi RNR. Šias prielaidas galima pagrįsti kitų tyrėjų gautais rezultatais, liudijančiais apie M-MuLV AT savybę sukibti su substratu terminės denatūracijos metu (176,177,178).

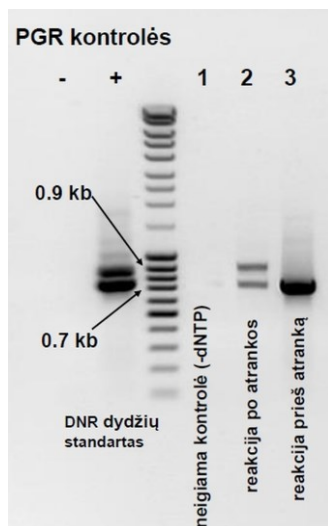
Galima pastebėti, kad Taq polimerazės buferyje keturnaris darinys yra stabilesnis, palyginus su M-MuLV AT buferiu. Taq polimerazės buferyje po 8 minučių 42°C temperatūroje išlieka trečdalis nesuirusio komplekso, tuo tarpu AT buferyje analogiškomis sąlygomis lieka tik 3 % nesuirusio komplekso. Šį skirtumą galima būtų paaiškinti Mg^{2+} jonų ir juos chelatuojančių dNTP santykiu. Skaičiuojant, kad viena dNTP molekulė suriša vieną Mg^{2+} joną (179), Taq buferyje su 1,5 mM $MgCl_2$ ir 0,8 mM dNTP lieka 0,7 mM laisvų Mg^{2+} jonų, tuo tarpu M-MuLV AT buferyje su 4 mM $MgCl_2$ ir 4 mM dNTP laisvų metalo jonų nėra.

Svarbu pažymėti, kad reikšminga keturnario komplekso dalis, ypač vykdant tyrimą AT buferyje, suyra per pirmąją inkubavimo minutę ar netgi prieš inkubavimą, ruošiant reakcijos mišinius. Šis rezultatas rodo, kad ruošiant vandeninės fazės emulsiją alyvoje tam tikra mutantų bibliotekos dalis praranda būtiną genotipo – fenotipo ryšį. Tai sumažina metodo potencialą, nes sumažėja mutantų bibliotekos variantiškumas, kitaip tariant, sumažėja atrankos eksperimente dalyvaujančių mutantų kiekis. Be to, padidėja klaidingai teigiamo įvykio tikimybė, kuomet funkciškai aktyvus fermentas patenka į vieną kompartmentą kartu su neaktyvų fermentą koduojančiu genu.

3.1.2 Principinis atrankos eksperimentas

Siekiant pademonstruoti, kad sukurtas metodas yra tinkamas taikant evoliucinį spaudimą iš mutantų bibliotekos atrinkti tinkamiausius variantus, buvo atliktas eksperimentas, imituojant atrankos sąlygas, kuomet bibliotekoje koduojami aktyvūs ir neturintys aktyvumo fermentai. Buvo paruošta mRNR, koduojanti laukinio tipo baltymą ir 171 nukleotidu trumpesnė mRNR, koduojanti neaktyvų M-MuLV mutantą. Naudojant neaktyvų atvirkštinės transkriptazės mutantą ir aktyvų laukinio tipo fermentą koduojančių mRNR mišinį buvo pademonstruota, kad vieno atrankos ciklo metu sistema apie 50 kartų prasiurtina aktyvius fermento variantus koduojančiais genais (24 pav.). Sumaišius atitinkamai deletanto ir laukinio tipo mRNR santykiu 50:1, po vieno atrankos etapo genų santykis tapo 1:1 (24 pav. 2 takelis). Tyrimas pakartotas atliekant tris nepriklausomus eksperimentus. Vykdant kontrolinę reakciją, kuri imituoja sąlygas kai atranka nevyksta, į mišinį prieš emulsifikavimą pridedama papildomai atvirkštinės transkriptazės baltymo, o po atrankos padauginamas tik trumpesnis neaktyvų baltymą koduojantis genas (24 pav. 3 takelis). Neigiama kontrolė, paruošta į reakcijos mišinį nededant dNTP, parodo, kad PGR metu amplifikuojami tik kDNR sintezės produktai (24 pav. 1 takelis).

Idealiu atveju galima tikėtis, kad vykdant atrankos eksperimentą, po vieno etapo išliktų tik aktyvų M-MuLV baltymą koduojanti mRNR. Vis dėlto neaktyvų baltymo variantą koduojantys genai vykdant atranką taip pat padauginami ir nedidelė šių genų dalis patenka į kitą atrankos etapą. Šis reiškinys galėtų turėti keletą priežasčių. Pirmiausia, kaip parodyta 3.1.1 skyrelyje, ruošiant emulsijas dalis komplekso skyla, todėl įmanoma, kad M-MuLV laukinio tipo baltymas patektų į vieną lašelį kartu su neaktyvų deletantą koduojančia mRNR. Tokiu atveju aktyvus baltymas susintetina deletantą koduojančios mRNR kopiją, todėl po vieno atrankos ciklo bibliotekoje yra ir dalis neaktyvų trumpesnį baltymą koduojančių genų. Be to, vykdant kompartmentalizaciją į kai kuriuos, ypačingai į didesnio tūrio lašelius gali patekti po kelis keturnarius kompleksus, todėl egzistuoja tikimybė, kad atvirkštinė transkriptazė susintetins atsitiktinai į lašelį kartu patekusios deletantą koduojančios mRNR kopiją. Įvertinant tai, kad nustatytas praturtinimo aktyviais bibliotekos nariais koeficientas yra 50, galima numatyti, kad iš pradinės $2,7 \times 10^9$ mutantų bibliotekos norint atrinkti kelis šimtus geriausių mutantų reikėtų 4 atrankos ciklų.



24 pav. Atrankos principą demonstruojančio eksperimento rezultatai. Pirmieji du takeliai atitinka neigiamą (be DNR) ir teigiamą (DNR mišinys santykiu 1:1) kontroles. Didesnysis 907 bp ilgio fragmentas gaunamas dauginant laukinio tipo fermentą koduojantį geną, trumpesnysis 736 bp fragmentas gaunamas dauginant deletantą koduojantį geną. 1, 2 ir 3 reakcijos buvo atliktos emulsijose naudojant laukinio tipo ir deletanto mRNR mišinį santykiu 1:50 ir vykdant kDNR sintezę 1 val. 42°C temperatūroje. Susintetinta kDNR padauginata vykdant PGR.

3.2 Termostabilių M-MuLV AT mutantų atranka ir savybių tyrimas

Atvirkštinės transkriptazės yra svarbią taikomąją reikšmę turintys fermentai. Didžioji dalis bet kokių procedūrų, susijusių su RNR tyrimais, prasideda nuo RNR pavertimo į stabilesnę kDNR formą, naudojant atvirkštinės transkriptazės. Savo ruožtu RNR molekulės dažniausiai yra viengrandės ir formuoja įvairias antrines bei tretines struktūras, kurių sudėtingumas labiausiai priklauso nuo tirpale esančių druskų koncentracijos ir ypač nuo temperatūros (180). RNR struktūroje esančios kilpos ir mazgai gali būti rimtos kliūtys atvirkštinei transkriptazei kDNR sintezės metu. Pagrindinis būdas sumažinti struktūrų įtaką ir palengvinti kDNR sintezę yra reakcijos temperatūros kėlimas, tačiau galimybės tai daryti yra ribotos, kadangi M-MuLV AT yra mezofilinis fermentas, gaunamas iš viruso, parazituojančio šiltakraujus gyvūnus. Termostabili AT būtų labai pageidaujamas fermentas, todėl pirmasis atrankos eksperimentas buvo atliktas siekiant atrinkti mutantus, galinčius vykdyti sintezę aukštoje temperatūroje.

Atlikus atrankos eksperimentą gaunama genų biblioteka, koduojanti mutantinius baltymus, kurie turėtų būti geriausiai prisitaikę atlikti savo funkciją sukurto evoliucinio spaudimo sąlygomis. Absoliuti dauguma atrinktų baltymų turėtų būti daugybiniai mutantai, sukaupę tam tikrą kiekį palankių mutacijų. Kažkuri dalis mutacijų galėtų būti neutralios, o kai kurios netgi turinčios neigiamą poveikį. Pastarosios mutacijos greičiausiai atsitiktinai atsiranda paskutiniame DNR padauginimo etape, kuris atliekamas jau po atrankos.

Mutantinių baltymų analizė atliekama po atrankos eksperimento turi atsakyti į klausimą, koku būdu baltymas prisitaikė prie kintančių aplinkos sąlygų. Kitaip tariant, kokie pokyčiai turėjo įvykti ir kokias naujas savybes baltymas turėjo įgyti, kad išgyventų didėjančią evoliucinį spaudimą. Analizė atliekama keliais etapais, laikantis tokios strategijos:

1. Daugybinių mutantų, gautų atrankos eksperimento metu analizė. Šiame etape tiriama daugybinių mutantų imtis siekiant įsitikinti, kad jie pagal tam tikras savybes pranašesni už laukinio tipo baltymą ir parodyti, kad atranka įvyko sėkmingai.
2. Taškinių mutantų analizė. Konstruojami mutantai turintys po vieną aminorūgšties pakeitimą ir tiriamos jų savybės. Pasirenkamos dažniausiai pasikartojančios arba koku nors kitu požūriu įdomios mutacijos. Šiame etape siekiama nustatyti, kurios individualios mutacijos turėjo didžiausią poveikį pasikeitusiems baltymo savybėms ir jo išgyvenimui evoliucinio spaudimo sąlygomis.

3. Sukonstruotų daugybinių mutantų analizė. Ištyrus pavienių mutacijų įtaką baltymo savybėms, svarbiausios mutacijos apjungiamos įvairiomis kombinacijomis konstruojant daugybinius mutantus. Tiriama, ar mutacijų poveikis adityvus. Tikimasi gauti geriausiomis savybėmis pasižyminčius baltymus, pranokstančius atrankos eksperimento metu gautus mutantus, iširtus 1 etape.

3.2.1 Termostabilių M-MuLV AT mutantų atrankos rezultatai

Naudojant M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų biblioteką, gautą vykdant klaidingą PGR, buvo ruošiamas keturnaris kompleksas iš baltymo, ribosomos, baltymą koduojančios mRNR ir tRNR. Vykdamas eksperimentą, $2,7 \times 10^9$ išgryninto keturnario komplekso molekulių buvo naudojama ruošiant emulsijas, po to 1 valandą vykdyta kDNR sintezė, kiekvieno atrankos etapo metu keliant temperatūrą. Pirmasis atrankos ciklas atliktas 50°C temperatūroje, vėlesni ciklai vykdyti 52,5°C, 55°C, 57,5°C, 60°C temperatūroje. Įvykdžius atranką, gauti genai įterpti į plazmidę ir nuskaitytos 103 individualių mutantų sekos, iš kurių 97 sekos buvo unikalios, penkios sekos pasikartojė po du kartus, o taip pat aptikta 1 laukinio tipo seka. Mutantiniuose baltymuose buvo aptikta nuo 1 iki 12 aminorūgščių pakeitimų, vidutiniškai 5 pakeitimai baltymo molekulei. Dauguma mutantų (70/102) turėjo 3 – 6 aminorūgščių mutacijas. Palyginimui, pradinėje bibliotekoje vidutinis aminorūgščių pakeitimų kiekis baltymo molekulėje buvo 1,5. Nukleotidų pakeitimų kiekis, palyginus su pradine biblioteka, taip pat padidėjo reikšmingai – nuo vidutiniškai 2,3 pradinės bibliotekos nariuose iki 8,1 nukleotido pakeitimų mutantuose, gautuose po atrankos. Transversijų ir tranzicijų santykis taip pat ryškiai pakito vykdant atrankos eksperimentą – nuo 1:20 pradinėje bibliotekoje iki 1:4,5 galutinėje. Išanalizuotų M-MuLV AT mutantų sąrašas pateiktas publikacijos (162) prieduose S2 ir S3.

Atliekant eksperimento metu atrinktų daugybinių mutantų analizę, pastebėta, kad nemaža dalis aminorūgščių mutacijų buvo iširtos jau anksčiau. Mokslinėse publikacijose ir patentuose buvo aprašytas šių aminorūgščių pakeitimų poveikis įvairioms M-MuLV AT savybėms – RNazės H aktyvumui, terminalinės deoksinukleotidų transferazės aktyvumui, padidintam termostabilumui, tikslumui, procesyvumui, atsparumui inhibitoriams, sąveikos su substratu stiprumui (75,181,182,183,184,185,159,156). Minėtų fermento savybių patobulinimas suderinamas su padidėjusiu fermento stabilumu ir pagerėjusiu reakcijos efektyvumu aukštesnėje temperatūroje. Prielaidas apie atrankos eksperimento sėkmingą baigtį patvirtina ir tai, kad tarp išanalizuotų daugybinių mutantų

aptikta tokių, kurie turi po tris anksčiau literatūroje aprašytas mutacijas, padidinančias fermento termostabilumą, sąveikos su substratu stiprumą, tikslumą bei panaikina RNazės H aktyvumą. Tokie atrinkti M-MuLV AT variantai yra mutantas nr. 30 (D200N, T306M, D524N, D583G) bei mutantas L5_28 (T306A, F309S, D524A, H594R, F625S; literatūroje minimos mutacijos pabrauktos) (182,184). Dažniausios atrankos eksperimento metu aptiktos taškinės mutacijos aprašytos 1 lentelėje. Pateiktas mutacijas pagal gausumą galima suskirstyti į keletą grupių. Pirmajai grupei priklausytų D200, esanti šalia polimerazės aktyvaus centro ir D524, D583 bei D653, esančios RNazės H domene. M-MuLV AT RNazės H aktyviame centre yra konservatyvus DEDD motyvas, kurį sudaro D524, E562, D583 ir D653 aminorūgštys (31,46). Karboksilo grupės, esančios šių aminorūgščių šoninėse grandinėse, reikalingos hidrolizėje dalyvaujančių metalo jonų koordinavimui. Mutantai D524G, E562Q, D583N ir D653N buvo panaudoti RNazės H aktyvumui panaikinti, taip pat buvo parodyta, kad šie mutantai padidina AT termostabilumą, reakcijos mišinyje esant substrato (66,182,183). Įdomu tai, kad *in vitro* evoliucijos eksperimento metu buvo atrinkti ne tik baltymo variantai, turintys mutacijas atitinkamose RNazės H aktyvaus centro pozicijose, tačiau ir būtent tokie patys aminorūgščių pakeitimai, kurie literatūroje aprašyti kaip labiausiai padidinantys baltymo termostabilumą. Negalima atmesti ir to, kad pilno ilgio mRNR išlikimas atrankos eksperimento metu vykdant kDNR sintezę taip pat buvo svarbus veiksnys, lėmęs bibliotekos praturtinimą šiais mutantais. Šią prielaidą patvirtina faktas, kad 64 iš 103 išanalizuotų mutantų turėjo po vieną ar du pakeitimus RNazės H domeno aktyviame centre.

Šalia RNazės H aktyvumą panaikinančių aminorūgščių pakeitimų, aptiktos dar dvi literatūroje aprašytos mutacijos – H204R ir H638R (1 lentelė). Buvo parodyta, kad H204R mutacija padidina M-MuLV AT termostabilumą bei sumažina terminalinės deoksinukleotidų transferazės aktyvumą (182), tuo tarpu H638R mutacija padidina fermento aktyvumą (183).

Atrankos eksperimento metu taip pat buvo aptikta naujų, dažnai pasikartojančių, prieš tai nežinomų mutacijų (1 lentelė). Šie naujai aptikti aminorūgščių pakeitimai susikaupė D200, L603, T330, L139, Q221, T287 ir kitose pozicijose (1 lentelė). Iš viso 103 nuskaitytuose klonuose aptiktos 28 mutacijos, susijusios su M-MuLV AT padidintu termostabilumu, iš kurių 17 buvo apibūdinta kitų mokslininkų grupių darbuose (75,181,182,183,184,185,159,156), o 11 mutacijų buvo naujų. Šios mutacijos charakterizuojamos 3.2.4 – 3.2.5 skyreliuose.

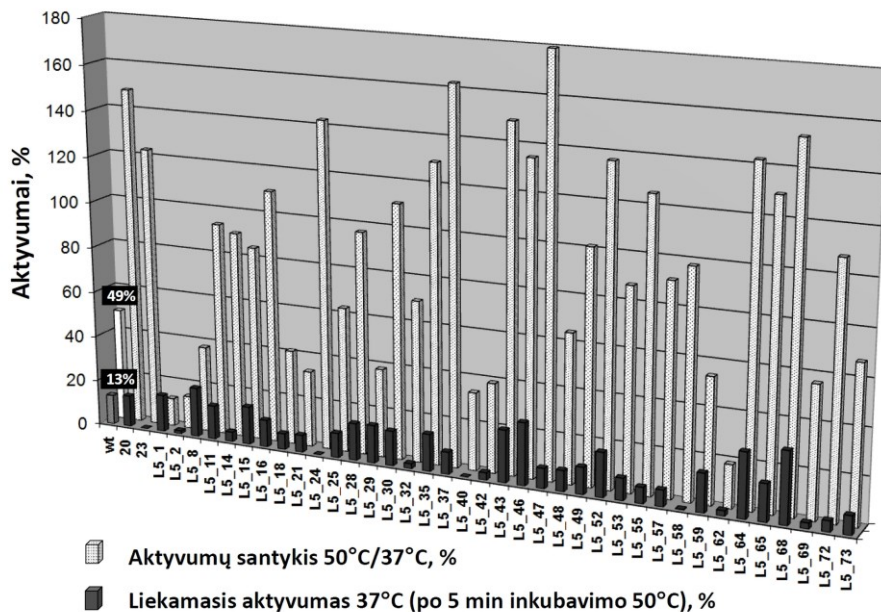
1 lentelė. Dažniausi M-MuLV AT aminorūgščių pakeitimai, aptikti po termostabilių mutantų atrankos

Pozicija	Pakeitimų kiekis	Mutacija	Pakeitimų kiekis
D524 (66,182)	31	G	20
		A	10
		N	1
D200	30	N	25
		A	3
		G	2
D653 (183)	23	N	10
		G	5
		A	4
		H	3
D583 (66,182)	21	V	1
		N	10
		G	7
		A	3
L603		E	1
		W	17
		M	1
T330	15	P	15
L139	14	P	14
H204 (182)	7	R	7
Q221	6	R	6
T287	6	A	6
I49	5	V	4
		T	1
N479	5	D	5
H594	5	R	4
		Q	1
		S	3
F625	5	L	2
		S	4
P65	4	S	4
H126	4	R	2
		S	2
L333	4	Q	3
		P	1
A502	4	V	4
E607	4	K	2
		A	1
		G	1
H638 (183)	4	R	4
K658	4	R	3
		Q	1
P130, Q237, Y344, M428, D449, A644, N649, L671	3		

3.2.2 Atrinktų mutantų aktyvumo skirtingose temperatūrose palyginimas

Siekiant ištirti atrinktų M-MuLV AT mutantų savybes, pirmiausia įvertintas jų termostabilumas. Iš ištirtų 103 mutantus koduojančių genų (3.2.1 skyrelis) atsitiktinai pasirinkti 55 genai, kurie įterpti į baltymo ekspresijai skirtą plazmidę iš karto už histidino inkarą koduojančios sekos. Mutantiniai baltymai buvo susintetinti *E. coli* ląstelėse ir išgryninti naudojant histidino inkaro ir Ni-NTA sorbento sąveiką. 39 mutantiniai baltymai iš visų analizuotų pasižymėjo atvirkštinės transkriptazės aktyvumu, kuris buvo ištirtas įvairiose temperatūrose ir sąlygose.

Buvo ištirtas mutantinių baltymų AT aktyvumas, nustatytas įprastoje 37°C temperatūroje ir palygintas su aktyvumu 50°C temperatūroje, taip pat liekamuju aktyvumu 37°C temperatūroje, prieš tai painkubavus 5 min 50°C be RNR/DNR substrato (25 pav.).



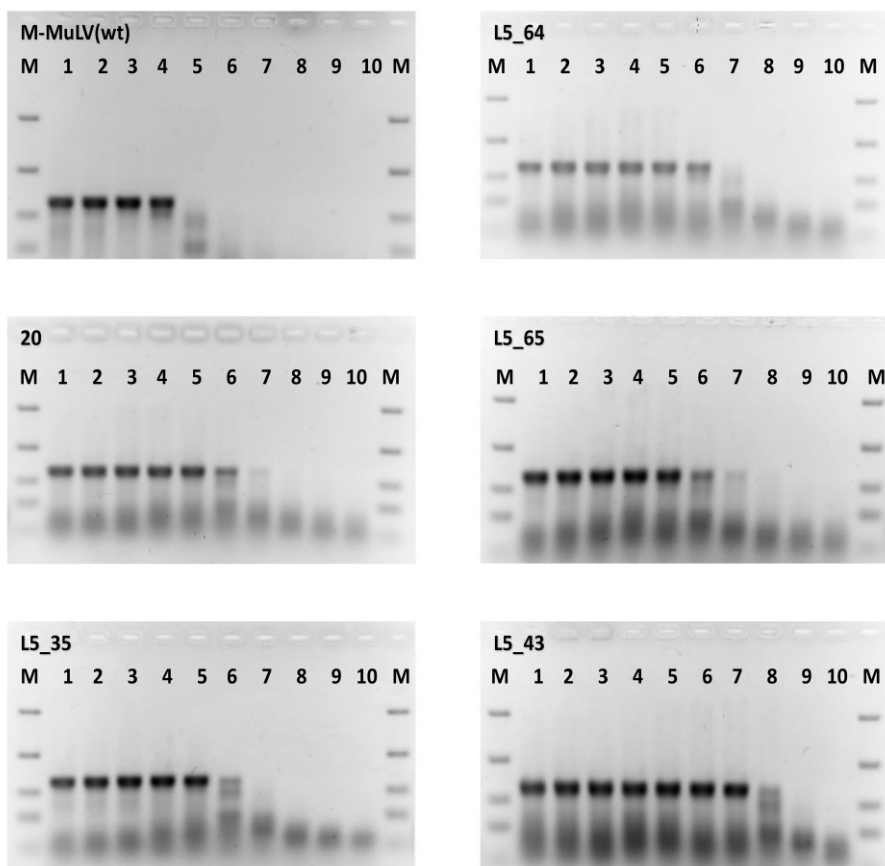
25 pav. Laukinio tipo ir mutantinių M-MuLV AT baltymų atvirkštinės transkriptazės aktyvumai. Šviesesni stulpeliai žymi fermentų aktyvumą 50°C, normalizuotą pagal aktyvumą 37°C, tamsesni stulpeliai žymi liekamąjį aktyvumą po inkubavimo 5 min 50°C.

Apie ¾ tirtų mutantų pasižymėjo bent dvigubai didesniu aktyvumu 50°C temperatūroje, palyginus su laukinio tipo fermentu. Inkubuojant mutantinius

baltymus 5 min reakcijos mišinyje be RNR/DNR substrato, daugumos jų aktyvumas stipriai sumažėjo. Vis dėlto, daugiau nei trečdalis iš jų pasižymėjo didesniu likutiniu aktyvumu, palyginus su laukinio tipo fermentu. Galima pastebėti, kad daugumai atrinktų mutantų, palyginus su laukinio tipo fermentu, būdingas padidėjęs aktyvumas 50°C temperatūroje, nors aptinkama ir nedidelė dalis tokių, kurių aktyvumas aukštesnėje temperatūroje sumažėjęs, tačiau padidėjęs vidinis baltymo termostabilumas (pavyzdžiui, L5_1, L5_8, L5_29). Šie rezultatai leidžia teigti, kad atrankos eksperimento metu taikant evoliucinį spaudimą išliko daugiausia tie mutantai, kurie buvo stabilesni sąveikoje su RNR/DNR substratu, o ne tie, kurie turėjo padidėjusį vidinį termostabilumą. Atvirkštinių transkriptazių termostabilumo padidėjimas sąveikaujant su substratu buvo pademonstruotas įvairių mokslininkų grupių tyrimuose (66,91). Taip pat parodyta, kad AT mutantai, stipriau susirišantys su substratu, pasižymi didesniu termostabilumu, palyginus su laukinio tipo fermentu (75,158). Tolimesni taškinių mutantų tyrimai parodė, kad evoliucinis spaudimas, sukurtas eksperimento metu, sudarė sąlygas atsirinkti beveik išskirtinai tik tokioms mutacijoms, kurios lemia padidėjusį sąveikos su RNR/DNR substratu stiprumą (žr. 3.2.4 – 3.2.5 skyreliai).

3.2.3 kDNR sintezė skirtingose temperatūrose naudojant atrinktus mutantus

Kai kurie didžiausiu termostabilumu pasižymintys mutantai buvo palyginti su laukinio tipo fermentu vykdant 1,1 kb ilgio kDNR sintezę. Buvo parodyta, kad mutantai 20, L5_35, L5_64, L5_65, L5_43 gali susintetinti pilno ilgio kDNR 53°C – 58°C temperatūroje, t.y. 5°C - 10°C aukštesnėje temperatūroje nei laukinio tipo AT (26 pav.). Šis tyrimas patvirtino, kad evoliucijos eksperimento metu buvo atrinkti termostabilūs mutantiniai baltymai.



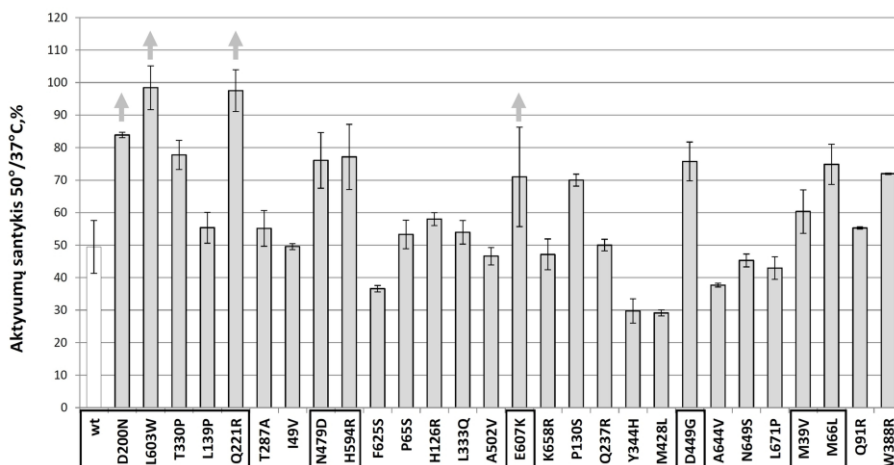
26 pav. 1,1 kb kDNR sintezės, atliktos naudojant daugybinius mutantus, produktų elektroforezė. Reakcija atlikta tokiose temperatūrose: 1 – 41,9°C, 2 – 43,6°C, 3 – 45,5°C, 4 – 47,8°C, 5 – 50,4°C, 6 – 53,1°C, 7 – 55,8°C, 8 – 58,1°C, 9 – 60,1°C, 10 – 62,1°C. M - dydžių standartas.

3.2.4 Taškinių mutantų aktyvumo skirtingose temperatūrose palyginimas

Vykdam atrankos eksperimentą buvo aptikta naujų, prieš tai necharakterizuotų M-MuLV AT mutacijų (žr. 1 lentelę). Pasirinktos 28 dažniausiai pasikartojančios mutacijos, darant prielaidą, kad jos turi įtaką fermento termostabilumui. Siekiant iširti šių individualių aminorūgščių pakeitimų reikšmę M-MuLV AT savybėms, buvo sukonstruoti, susintetinti ir išgryninti mutantiniai baltymai.

Taškinių mutantų termostabilumas buvo įvertintas tiriant atvirkštinės transkriptazės aktyvumą 37°C ir 50°C temperatūrose ir apskaičiuojant aktyvumą santykį 50°C/37°C. Tyrimo rezultatai pateikti 27 paveiksle.

Termostabiliausiems taškiniais mutantams D200N, L603W, T330P, Q221R, N479D, H594R, E607K, P130S, D449G, M66L, W388R nustatytas 50°C/37°C aktyvumų santykis buvo daugiau nei 70 % (27 pav.) Palyginimui, laukinio tipo baltymui nustatytas analogiškas aktyvumų santykis buvo 50 %. Toliau visi taškiniai mutantai su laukinio tipo baltymu buvo palyginti vykdant kDNR sintezę įvairiose temperatūrose. Eksperimentas atliktas naudojant 1,1 kb ilgio sintetinę RNR ir taikant temperatūrų gradientą, o reakcijos produktai analizuoti vykdant šarminę elektroforezę. Šiame tyrime didžiausią termostabilumą parodė L603W mutantas, susintetinės kDNR 53°C temperatūroje (nepublikuoti duomenys). D200N, Q221R ir E607K mutantai susintetino produktą 50°C temperatūroje (nepublikuoti duomenys) tuo tarpu kitų mutantų termostabilumas buvo panašus į laukinio tipo baltymo, nepaisant to, kad dauguma jų rodė didesnę 50°C/37°C aktyvumų santykį (27 pav.).

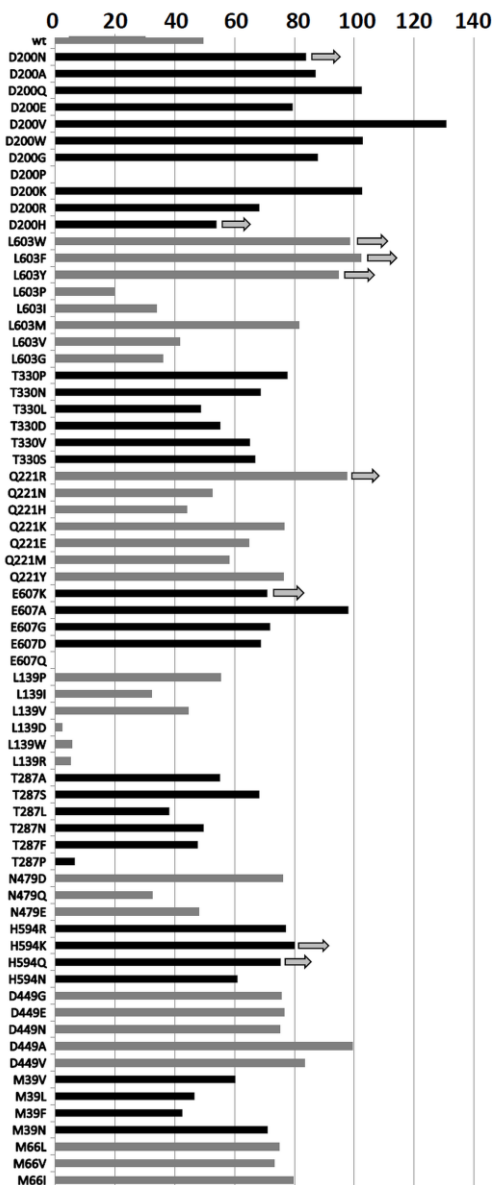


27 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento ir mutantų aktyvumų santykis 50°C/37°C temperatūrose. Pateikti mažiausiai dviejų nepriklausomų matavimų vidurkiai. Rodyklėmis pažymėti mutantai, sintetinantys kDNR molekules aukštesnėje nei 50°C temperatūroje. Apibrėžtos aminorūgščių pozicijos, pasirinktos pilnesnei mutagenizei ir analizei.

Atliekant atrankos eksperimentą, pradinė mutantų biblioteka buvo paruošta vykdant klaidingą PGR (2.3.4 skyrelis). Galima numatyti, kad tokiu būdu sukurtose bibliotekose yra ribotas konkrečiose pozicijose esančių aminorūgščių pakeitimų skaičius ir pilnai įsotinant mutagenėzė nepasiekta. Atlikus atranką įvairiose baltymo vietose nustatyti dažniausi aminorūgščių pakeitimai nebūtinai suteikia baltymui didžiausią termostabilumą. Dėl šios

priežasties atrankos eksperimento metu identifikuotus “karštuosius taškus”, kuriuose susikaupia mutacijos, nuspręsta paanalizuoti atidžiau, sukuriant daugiau įvairių aminorūgščių pakeitimų tose pozicijose. Tokiam eksperimentui pasirinktos baltymo pozicijos, kuriose pakeitimų dažnis buvo 6 ar daugiau (D200, L603, T330, L139, Q221, T287), taip pat prijungtos pozicijos, kuriose nustatytas didžiausias 50°C/37°C aktyvumų santykis (N479, H594, E607, D449, M39, M66). Konstruojant mutantus, konkrečioje pozicijoje buvo įvedamos visos atrankos eksperimento metu gautos mutacijos (pavyzdžiui, D200N, D200A, D200G), taip pat pridedamos mutacijos, kuriose atrinktos aminorūgštys papildomos panašiomis (D200Q, D200E), taip pat priešingomis pagal savybes (pavyzdžiui, priešingai įkrautomis D200K, D200R, D200H) ir visiškai nepanašiomis (D200W, D200P). Daugiau pakeitimų buvo sukurta tose M-MuLV AT geno pozicijose, kurios dažniau atrinktos eksperimento metu. Visi sukonstruoti mutantiniai baltymai buvo ekspresuoti *E. coli* ląstelėse, išgryninti ir ištirti nustatant aukščiausią temperatūrą, kurioje sintetinama 1,1 kb ilgio kDNR bei 50°C/37°C aktyvumų santykį (28 pav.).

Aktyvumų santykis 50°/37°C,%



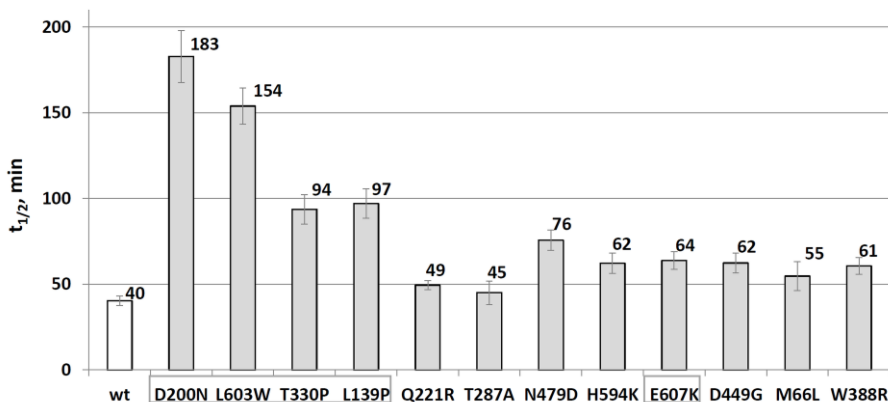
28 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento ir mutantų aktyvumų santykis 50°C/37°C temperatūrose. Pateikti mažiausiai dviejų nepriklausomų matavimų vidurkiai. Skirtingų spalvų stulpeliai (juodi arba pilki) žymi skirtingų baltymo pozicijų mutantams nustatytas aktyvumų vertes. Rodyklėmis pažymėti mutantai, sintetinantys 1,1 kb kDNR molekules aukštesnėje nei 50°C temperatūroje.

Kaip ir tikėtasi, mutantai, gauti aminorūgštis keičiant į panašias, pasižymėjo panašiomis savybėmis. Pavyzdžiui, L603W, L603F ir L603Y būdingas 50°C/37°C aktyvumų santykis artimas 100%, taip pat šie mutantai sintetino kDNR 50°C temperatūroje. Kiti L603 mutantai pasižymėjo mažesniu 50°C/37°C aktyvumų santykiu nei laukinio tipo fermentas, išskyrus L603M pakeitimą, kurį turėjo vienas iš atrankos eksperimente aptiktų mutantų. Vadinasi baltymo termostabilumą padidina aromatinės ir didelės hidrofobinės aminorūgštys 603 pozicijoje. Įdomu tai, kad beveik visi D200 pozicijoje įvesti pakeitimai, išskyrus visiškai neaktyvų D200P mutantą, pasižymėjo didesniu 50°C/37°C santykiu, palyginus su laukinio tipo fermentu (28 pav.). Pavyzdžiui, neigiamą krūvį turinčią asparto aminorūgštį pakeitus didele hidrofobine triptofano aminorūgštimi, nustatytas 50°C/37°C aktyvumų santykis yra 100%, o įvedus pakeitimą į panašią glutamo aminorūgštį, atitinkamas santykis yra 80%. Šis eksperimentas leido aptikti keletą naujų aminorūgščių pakeitimų, kurie padidina atvirkštinės transkriptazės aktyvumą: Q221K/Y, E607A/G, H594K/Q, D449E/N/A/V, M39N, M66V/I. Tačiau iš 84 sukonstruotų ir ištirtų taškinių mutantų tik 9 mutantai 5 pozicijose buvo tinkami kDNR sintezei aukštesnėje nei 48°C temperatūroje (28 pav. pažymėti rodyklėmis). Dar vienas įdomus rezultatas yra tas, kad tik H594 pozicijoje buvo atrasti aminorūgščių pakeitimai (H594K ir H594Q), kurių dėka atvirkštinė transkriptazė sintetino kDNR aukštesnėje temperatūroje, palyginus su atrankos eksperimento metu aptiktu H594R variantu. Rezultatų visuma leidžia manyti, kad atrankos eksperimento metu naudota mutantų biblioteka pasižymėjo pakankamu variantiškumu ir kad evoliucinio spaudimo sąlygos buvo tinkamos termostabiliausių mutantų atrankai.

3.2.5 Taškinių mutantų biocheminių savybių palyginimas

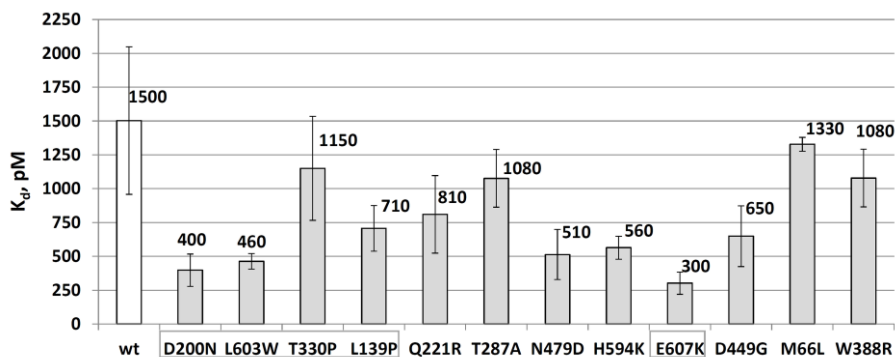
Siekiant detaliau ištirti, kokios atvirkštinės transkriptazės savybės keitėsi baltymui patiriant evoliucinį spaudimą atrankos eksperimento metu, buvo atliktas didžiausiu termostabilumu pasižymėjusių taškinių mutantų D200N, L603W, T330P, L139P, Q221R, T287A, N479D, H594K, E607K, D449G, M66L, W388R biocheminių savybių tyrimas. Sukonstruoti mutantiniai baltymai buvo susintetinti *E. coli* ląstelėse ir išgryninti panaudojant N – gale įterptą histidino aminorūgščių inkarą ir jonų mainų chromatografiją naudojant P11 sorbentą. Apibūdinant šių mutantų biochemines savybes, buvo ištirtas baltymų atsparumas temperatūrinei inaktyvacijai, sąveikos su substratu stiprumas, procesyvumas.

Nors dauguma atrinktų taškinių mutantų pasižymėjo gana dideliu aktyvumu 50°C temperatūroje (27 pav.), paaiškėjo, kad reakcijos mišinyje nesant substrato šių fermentų termostabilumas yra gana mažas. Daugumos fermentų polimerazinis aktyvumas, nustatytas juos prieš tai painkubavus 5 minutes 50°C temperatūroje be substrato buvo panašus į laukinio tipo fermento (duomenys nepublikuoti). Kadangi vykdant atvirkštinę transkripciją reakcijos mišinyje visada yra ir pradmuo bei matrica, labiau realias sąlygas atitinkantis termostabilumo parametras yra fermento aktyvumo puslaikis, nustatytas inkubuojant fermentą kartu su matrica. Mutantiniai baltymai buvo inkubuojami 50°C temperatūroje su substratu įvairius laiko tarpus, po to nustatytas jų aktyvumas 37°C temperatūroje. Didžiausiu dažniu atsirinkę taškiniai mutantai D200N ($t_{1/2} = 183$ min) ir L603W ($t_{1/2} = 154$ min) buvo keturis kartus termostabilesni už laukinio tipo baltymą ($t_{1/2} = 40$ min), o T330P ir L139P buvo du kartus termostabilesni ($t_{1/2}$ atitinkamai 94 ir 97 min) už laukinio tipo atvirkštinę transkriptazę (29 pav.). Kitų ištirtų fermentų aktyvumo puslaikis buvo 45-76 minutės. Įdomu tai, kad kai kurie mutantai pasirodė gana atsparūs temperatūriniam inaktyvavimui, nors jų aktyvumų santykis 50°C/37°C nebuvo labai didelis. Pavyzdžiui, L139P mutanto aktyvumo puslaikis daugiau nei du kartus viršijo laukinio tipo fermento atitinkamą parametą, nors jų aktyvumų santykis 50°C/37°C buvo panašus (27 pav.). Kai kuriems kitiems mutantams pastebėta priešinga tendencija. Pavyzdžiui, Q221R fermento aktyvumo puslaikis buvo toks pats kaip laukinio tipo baltymo, tačiau 50°C/37°C santykis du kartus viršija laukinio tipo aktyvumų santykį.



29 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento ir mutantų aktyvumo puslaikis 50°C temperatūroje. Pateikti mažiausiai trijų nepriklausomų matavimų vidurkiai (± 1 SD). Apibrauktos aminorūgščių pozicijos, pasirinktos daugybinių mutantų konstravimui.

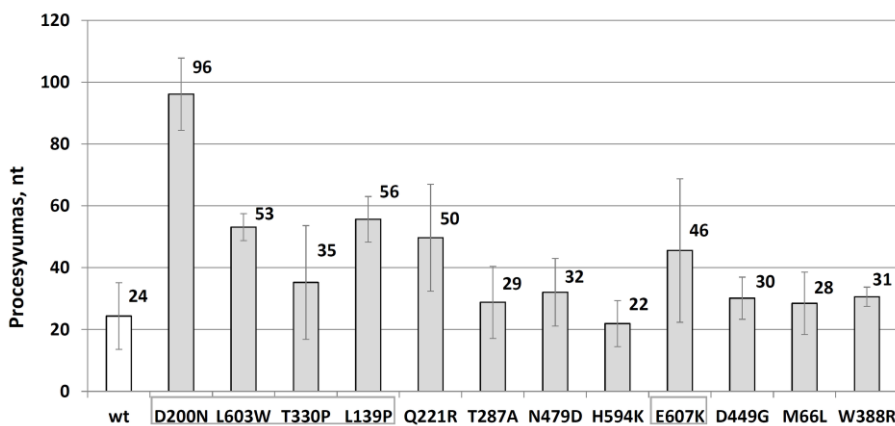
Galimai svarbiausia fermento savybė, turinti įtakos jo termostabilumui, yra sąveikos su substratu stiprumas. Atvirkštinių transkriptazių mutantų termostabilumo padidėjimas dėka stipresnės sąveikos su matrica buvo pademonstruotas kitų mokslininkų grupių darbuose (75,186). Dėl šios priežasties taikant elektroforetinio judrumo poslinkio metodą buvo iširta dažniausiai atrinktų taškinių mutantų sąveikos su RNR/DNR substratu pusiausvyrinė disociacijos konstanta. Laukinio tipo baltymo K_d , nustatyta šio eksperimento sąlygomis, buvo 1,5 nM (30 pav.). Ši baltymo sąveikos su substratu stiprumo reikšmė patenka į literatūroje pateikiamų skirtingo pobūdžio eksperimentuose (elektroforetinio judrumo poslinkio, paviršiaus plazmonų rezonanso, surišimo ant filtro) naudojant įvairius substratus (DNR/DNR, RNR/DNR, RNR/RNR, RNR) nustatytą M-MuLV AT disociacijos konstantų intervalą, kuris yra nuo 1 nM iki 152 nM (58,66,187,188,189,157). Eksperimentas parodė, kad tiriamieji AT taškiniai mutantai su RNR/DNR hibridu susiriša 2-5 kartus stipriau, palyginus su laukinio tipo baltymu (30 pav.), kas gali turėti įtakos ir padidėjusiam baltymų atsparumui temperatūrinei inaktyvacijai bei išaugusiam aktyvumų santykiui 50°C/37°C.



30 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento ir mutantų pusiausvyrinė disociacijos konstanta. Pateikti mažiausiai dviejų nepriklausomų matavimų vidurkiai (± 1 SD). Apibrauktos aminorūgščių pozicijos, pasirinktos daugybinių mutantų konstravimui.

Sąveikos su substratu stiprumas yra tiesiogiai susijęs ir su fermentų procesyvumu, kuris reikalingas efektyviai ilgų kDNR molekulių sintezei, todėl buvo iširtas ir pagrindinių taškinių mutantų procesyvumas. Šiame eksperimente buvo naudojamas FAM dažų žymėtas DNR pradmuo, prilydytas prie ilgos RNR molekulės ir nežymėto substrato perteklius. Vykstant reakcijai

vieno pratęsimo akto metu susidarę produktai buvo analizuojami vykdant elektroforezę kapiliarinės sekoskaitos aparate. Šiame eksperimente nustatytas laukinio tipo AT procesyvumas yra 24 (± 12) nukleotidai (31 pav.). Šis rezultatas gerai sutampa su Gerard ir kolegų nustatytu M-MuLV AT procesyvumu (~ 30 nukleotidų, (66)), nepaisant šiek tiek skirtingų reakcijos sąlygų. Kopijinės DNR fragmentai, kuriuos susintetino tiriami taškiniai mutantai D200N, L603W, E607K, Q221R ir L139P buvo nuo 2 iki 4 kartų ilgesni, palyginus su laukinio tipo fermento susintetintais fragmentais (31 pav.). Padidėjęs šių mutantų procesyvumas teigiamai koreliuoja su stipresne substrato – fermento sąveika (30 pav.). Taip pat galima pastebėti, kad kai kurie mutantai (N479D, H594K, D449G), nepaisant stipresnio susirišimo su matrica ir pradmenimi, nepasižymėjo žymiai didesniu nei laukinio tipo fermentas procesyvumu.



31 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento ir mutantų procesyvumas. Pateikti mažiausiai dviejų nepriklausomų matavimų vidurkiai (± 1 SD). Apibrauktos aminorūgščių pozicijos, pasirinktos daugybinių mutantų konstravimui.

3.2.6 Daugybinių M-MuLV AT mutantų konstravimas ir apibūdinimas

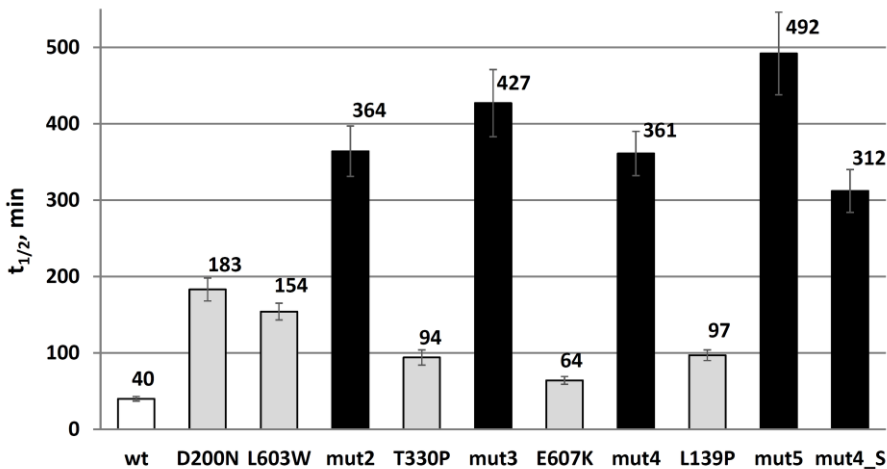
Ištirtos individualios mutacijos, padidinančios M-MuLV atvirkštinės transkriptazės susirišimo su substratu stiprumą, procesyvumą, termostabilumą, buvo apjungtos sukonstruojant daugybinius mutantus. Buvo siekiama patikrinti, ar sudedant kelias fermento savybes pagerinančias mutacijas, sumuojasi ir atitinkamų savybių stiprumas. Šiam eksperimentui pasirinkti pakeitimai D200N ir L603W, kaip pasižymintys geriausiomis savybėmis ir dažniausiai pasitaikantys atrankos eksperimente, taip pat T330P ir L139P (trečia ir ketvirta mutacija pagal dažnį atrankos eksperimente) ir

E607K, kuri buvo viena iš mutacijų, suteikusių fermentui savybę sintetinti kDNR aukštesnėje nei 50°C temperatūroje (27 pav.). Q221R mutantas, kuris taip pat sugebėjo sintetinti kDNR aukštoje temperatūroje, buvo mažai stabilus reakcijos mišinyje nesant substrato, nes pilnai inaktyvavosi per 5 min 50°C temperatūroje (duomenys nepublikuoti), todėl šis pakeitimas nebuvo naudojamas konstruojant daugybinius mutantus.

Palaipsniui pridodant pasirinktas mutacijas buvo sukonstruoti šie mutantai: dvigubas mutantas mut2 (D200N; L603W), trigubas mutantas mut3 (D200N; L603W; T330P), keturgubas mutantas mut4 (D200N; L603W; T330P; E607K) ir penkiagubas mutantas mut5 (D200N; L603W; T330P; E607K; L139P). Taip pat į analizę buvo įtrauktas evoliucijos eksperimento metu atrinktas mutantas mut4_S, turintis tris iš penkių analizuojamų pakeitimų (L139P; D200N; E607K) ir papildomą W388R mutaciją. Visi sukonstruoti baltymai buvo susintetinti *E. coli* ląstelėse ir išgryninti naudojant histidino aminorūgščių inkaro, įterpto baltymo N – gale sąveiką su Ni-NTA sorbentu bei P11 jonų mainų kolonėlę. Nustatyti išgrynintų baltymų specifiniai aktyvumai 37°C temperatūroje buvo truputį didesni nei laukinio tipo baltymo: mut2 specifinis aktyvumas buvo 20 % didesnis, mut3 - mut 5 ir mut4_S aktyvumai buvo iki 50 % - 60 % didesni nei laukinio tipo M-MuLV AT.

Charakterizuojant išgrynintus mut2 – mut5 ir mut4_S baltymus buvo nustatytos tos pačios savybės, kaip ir taškinių mutantų atveju – temperatūrinis stabilumas, sąveikos su substratu stiprumas ir procesyvumas. Fermentų inaktyvavimo puslaikiai inkubuojant juos 50°C su substratu pateikti 32 pav.

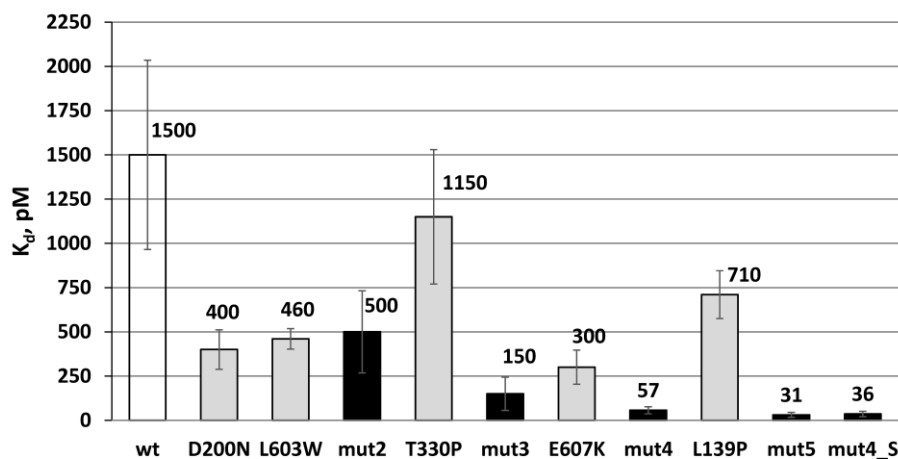
Dvigubo mutanto, gauto apjungus didžiausią termostabilumą baltymui suteikiančius aminorūgščių pakeitimus L603W ir D200N aktyvumo puslaikis buvo 364 (±32) minutės – devynis kartus didesnis, palyginus su laukinio tipo AT. Pridėjus T330P mutaciją, baltymo termostabilumas dar padidėja iki 427 (±45) minučių.



32 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento ir daugybinių mutantų aktyvumo puslaikis 50°C temperatūroje. Palyginimui pateikta ir taškinių mutantų, iš kurių buvo sukonstruoti daugybiniai, aktyvumo puslaikiai. Pateikti mažiausiai trijų nepriklausomų matavimų vidurkiai (± 1 SD).

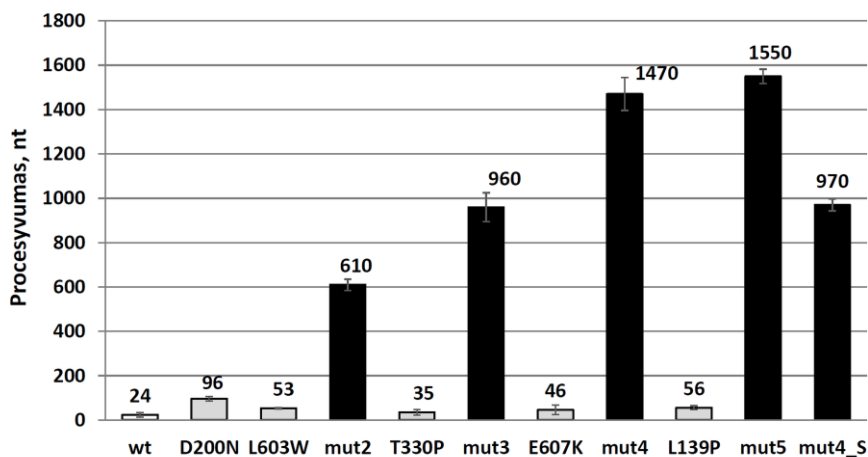
Keturgubo mutanto, gauto pridėdant E607K mutaciją, termostabilumas yra panašus į mut2 baltymo. Mut4 baltymą papildžius L139P mutacija, gaunama atvirkštinė transkriptazė, kurios termostabilumas dvylika kartų viršija laukinio tipo fermento stabilumą. Evoliucijos eksperimento metu atrinkto mutanto mut4_S termostabilumas buvo apie 1,5 karto mažesnis nei racionaliai sukonstruoto mut5 (32 pav.). Visų šių mutantų termostabilumas reakcijos mišinyje nesant substrato buvo nedidelis. Po 5 minučių inkubacijos 50°C temperatūroje nustatytas liekamasis aktyvumas buvo iki 2 kartų didesnis, palyginus su laukinio tipo fermentu (duomenys nepublikuoti).

Nustačius tiriamųjų AT mutantų sąveikas su substratu stiprumą paaiškėjo, kad į vieną baltymą sujungus D200N ir L603W pakeitimus, šio baltymo sąveikos su substratu stiprumas išlieka panašus kaip atskirų mutantų (33 pav.). Mut2 baltymą papildant kitomis mutacijomis, gaunami AT variantai, kurių sąveika su RNR/DNR hibridu palaipsniui stiprėja. Pridėdant vieną pakeitimą, disociacijos konstanta sumažėja du arba tris kartus. Stipriausiai su substratu susirišančio mut5 baltymo disociacijos konstanta buvo ~50 kartų mažesnė, palyginus su laukinio tipo baltymu. Panašiu į mut5 sąveikos su RNR/DNR hibridu stiprumu pasižymi ir atrankos eksperimento metu aptiktas mut4_S baltymas.



33 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento ir daugybinių mutantų pusiausvyrinė sąveikos su RNR/DNR hibridu disociacijos konstanta. Palyginimui pateikta ir taškinių mutantų, iš kurių buvo sukonstruoti daugybiniai, disociacijos konstantos. Pateikti mažiausiai dviejų nepriklausomų matavimų vidurkiai (± 1 SD).

Aptiktas tiesioginis ryšys tarp taškinių mutantų sąveikos su substratu stiprumo ir procesyvumo atsikartojo ir tiriant daugybinius M-MuLV AT mutantus. Kopijinės DNR fragmentai, kuriuos susintetino mut2 – mut5 ir mut4_S baltymai vieno susirišimo su substratu metu buvo nustatyti naudojant radioaktyviai žymėtą RNR/DNR hibridą. Fermentas mut2, gautas apjungus D200N ir L603W mutacijas pasižymėjo 25 kartus didesniu procesyvumu, palyginus su laukinio tipo baltymu (34 pav.). M-MuLV AT variantų, gautų mut2 baltymą papildant kitais aminorūgščių pakeitimais, procesyvumas didėja. Prijungus mutaciją T330P, procesyvumas išauga iki 960 (± 64) nukleotidų; pridėjus mutaciją E607K, procesyvumas siekia beveik 1500 nukleotidų. Toliau pasiekiamas tam tikras “išotinimas”, kadangi mut4 baltymą papildžius L139P mutacija, gauto mut5 baltymo procesyvumas tik nežymiai viršija 1500 nukleotidų. Atrankos eksperimento metu gauto mut4_S fermento procesyvumas panašus į racionaliai sukonstruotų AT variantų (34 pav.).



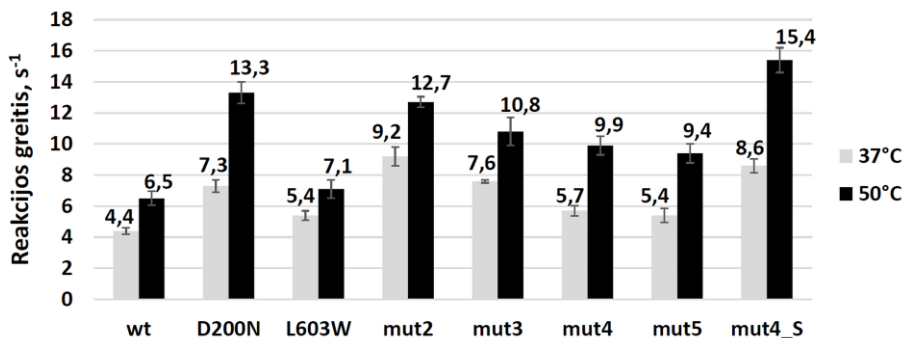
34 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento ir daugybinių mutantų nuo RNR priklausomos DNR sintezės procesyvumas. Palyginimui pateikta ir taškinių mutantų, iš kurių buvo sukonstruoti daugybiniai, procesyvumo reikšmės. Pateikti mažiausiai dviejų nepriklausomų matavimų vidurkiai (± 1 SD).

Apibendrinant disociacijos konstantos, termostabilumo ir procesyvumo matavimų rezultatus galima daryti prielaidą, kad būtent sąveikos su substratu stiprumas yra tas veiksnys, kuris lemia mutantinių baltymų termostabilumą ir padidėjusį procesyvumą.

Siekiant iširti, ar atrankos eksperimento metu aptiktos mutacijos neturi įtakos DNR sintezės greičiui, buvo nustatytas nukleotidų įtraukimo greitis, naudojant 10 nM baltymo koncentraciją ir 200 nM RNR/DNR substrato koncentraciją, reakcijos mišinyje esant 1 mM koncentracijai kiekvieno dNTP. Pradinis nukleotidų įtraukimo greitis nustatytas laukinio tipo baltymui, taip pat taškiniams mutantams D200N ir L603W bei visiems daugybiniais mutantams, reakcijas atliekant 37°C ir 50°C temperatūroje (35 pav.). Reakcijų greitis 50°C temperatūroje visais atvejais buvo 1,5-2 karto didesnis nei 37°C temperatūroje. Šis skirtumas gali būti paaiškinamas padidėjusiu cheminės reakcijos greičiu ir sumažėjusiu RNR antrinių struktūrų stabilumu.

Įdomu pastebėti, kad dirbtinai sukonstruotų mutantų reakcijos greitis tolygiai mažėja pridėdant po naują mutaciją (35 pav.). Ši tendencija priešinga minėtų mutantų sąveikos su substratu stiprumo pokyčiui, nes disociacijos konstanta pridėdant naujas mutacijas mažėja (33 pav.). Tuo tarpu atrankos metu gauto keturgubo mutanto mut4_S atveju nustatytas reakcijos greitis yra didžiausias, nors šis baltymas su substratu sąveikauja taip pat stipriai kaip mut5. Taškinių D200N ir L603W mutantų sąveikos su substratu stiprumas yra panašus į mut2

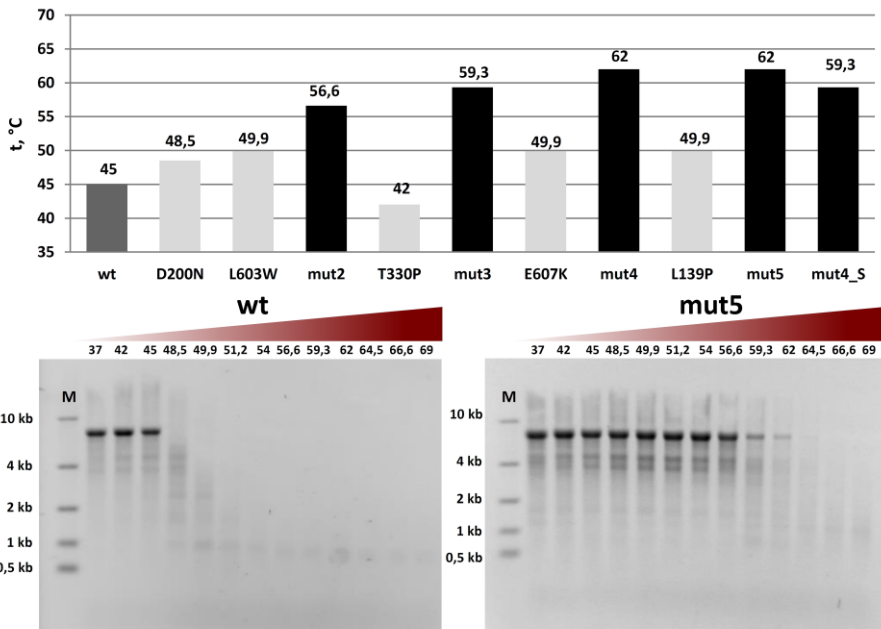
baltymo, tačiau kDNR sintezės reakcijos greičiai skiriasi – L603W mutanto atveju reakcijos greitis panašus į laukinio tipo baltymo, D200N – į mut2 baltymo (35 pav.). Ištirtų mutantų reakcijos greičio ir sąveikos su substratu stiprumo ryšį sunku vertinti vienareikšmiškai. Nors stipresnė sąveika su substratu galėtų padidinti nukleotidų įtraukimo į grandinę greitį dėl greitesnio susirišimo ir mažesnio disociacijos/asociacijos įvykių skaičiaus sintezės metu, tačiau mut2 - mut5 baltymų atveju matoma priešinga tendencija, galbūt dėl lėtesnės disociacijos nuo susintetintos pilno ilgio kDNR molekulės.



35 pav. M-MuLV laukinio tipo fermento bei taškinių ir daugybinių mutantų nukleotidų įtraukimo greitis 37°C temperatūroje (pilki stulpeliai) ir 50°C temperatūroje (juodi stulpeliai). Pateikiami mažiausiai trijų nepriklausomų matavimų vidurkiai (± 1 SD).

Laukinio tipo M-MuLV AT ir sukonstruotų mutantų termostabilumas buvo palygintas sintetinant 7,5 kb ilgio kDNR temperatūrų intervale nuo 37°C iki 69°C. Laukinio tipo baltymas pilno ilgio kDNR molekulę susintetina 45°C arba žemesnėje temperatūroje (36 pav.). Palyginimui, 1,1 kb ilgio kDNR sintezės aukščiausia temperatūra yra 48°C (26 pav.). Šis rezultatas rodo, kad efektyviai ilgų molekulių sintezei reikalingi termostabilūs fermentai.

Taškiniai mutantai D200N, L603E, E607K ir L139P reakciją vykdo 48,5°C – 50°C temperatūroje, t.y. iki 5°C aukštesnėje, palyginus su laukinio tipo fermentu. Apjungiant šias mutacijas gaunami daugybiniai mutantai, kurių aukščiausia kDNR sintezės temperatūra palaipsniui didėja iki 62°C (36 pav.).



36 pav. M-MuLV wt fermento bei mutantų maksimali 7,5 kb kDNR sintezės temperatūra (viršuje) ir wt bei mut5 mutantų aukščiausios reakcijos temperatūros palyginimas (apačioje).

Įdomu tai, kad T330P mutanto atveju aukščiausia sintezės temperatūra yra 42°C, t.y. žemesnė nei laukinio tipo fermento, tačiau tai neturėjo neigiamos įtakos mut3 baltymo savybėms (36 pav.). Atrankos eksperimento metu gauto mut4_S mutanto maksimali kDNR sintezės temperatūra buvo truputį žemesnė už geriausių taškinių mutantų mut4 ir mut5.

Sukonstruotų naujų mutantų, efektyviai sintetinančių kDNR praktinis pritaikymas būtų įmanomas tik tuomet, jei būtų išlaikytas pakankamas jų tikslumas. Siekiant įsitikinti, kad daugybinius pakitimus turinčių baltymų tikslumas nenukenčia, naudojant laukinio tipo ir mut5 atvirkštinės transkriptazės buvo susintetintos kDNR molekulės, po to jos buvo paverstos į dvigrandes DNR ir įterptos į plazmidę. Nuskaicius daugiau nei 20000 nukleotidų, buvo parodyta, kad mut5 mutanto daromas klaidų dažnis yra mažesnis nei 1/10000 nukleotidų. Apytikslis laukinio tipo baltymo klaidų dažnis, nustatytas nuskaicius daugiau nei 15000 nukleotidų, buvo mažesnis nei 1/15000.

3.3 Mažose dNTP koncentracijose veikiančių M-MuLV mutantų atranka ir savybių tyrimas

Vienas iš aktualiausių M-MuLV AT taikymų yra AT-PGR metodas. Naudojant šį metodą atvirkštinė transkriptazė susintetina kDNR, kuri po to padauginama vykdant PGR. AT reakcija ir PGR dažnai vykdomos paėiliui viena po kitos atskiruose mėgintuvėliuose, bet taip pat abi reakcijos gali būti atliekamos ir tame pačiame mėgintuvėlyje. Pastarasis metodo variantas vadinamas vieno žingsnio AT-PGR. Šiuo atveju abiem reakcijoms reikalingi fermentai ir kiti komponentai dedami į tą patį reakcijos mišinį. Kadangi fermentų savybės skiriasi, reikia parinkti abu fermentus bent iš dalies tenkinantį buferinį tirpalą. Svarbu pastebėti, kad vykdant AT-kPGR kDNR grandinė yra sintetinama vieną kartą, tuo tarpu DNR polimerazė amplifikuoja DNR apie 20-40 kartų. Dėl šios priežasties racionalu būtų naudoti optimalų PGR buferį. Kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodas kaip tik suteikia galimybę nekeičiant kPGR buferio sudėties, bet pasitelkiant *in vitro* evoliucijos technologiją, atrinkti atvirkštinę transkriptazę, geriausiai veikiančią kPGR buferiniame tirpale.

3.3.1 Mažose dNTP koncentracijose veikiančių M-MuLV mutantų atrankos rezultatai

Kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodika buvo pritaikyta M-MuLV baltymo mutantų, efektyviai veikiančių esant mažoms dNTP koncentracijoms, atrankai. Atrankos eksperimento metu reakcijos buvo vykdomos Taq polimerazės buferyje, kuriame dNTP koncentracija yra penkis kartus mažesnė, palyginus su įprastiniu AT buferiu. Eksperimento metu buvo pakartoti septyni atrankos ciklai AT reakcijos laiką palaiapsniui trumpinant nuo 60 iki 5 minučių (žr. 2.3.14 skyrių), tokiu būdu siekiant iš pradinės mutantų bibliotekos atrinkti variantus, pasižyminčius greita kDNR sinteze. Reakcijos buvo vykdomos 42°C temperatūroje.

Po atrankos atsitiktinai pasirinkti 29 genai ir nustatytos jų sekos. Visi nuskaityti genai buvo unikalūs ir kodavo mutantinius baltymus, turinčius nuo 2 iki 10 aminorūgščių pakeitimų. Palyginus su pradine mutantų biblioteka, kurioje vienam genui vidutiniškai teko 1,5 aminorūgščių pakeitimų, mutacijų kiekis padidėjo daugiau nei 3 kartus iki vidutiniškai 5,2 mutacijų genui. Dažniausių atrankos metu aptiktų mutacijų aprašymas pateiktas 2 lentelėje.

2 lentelė. Dažniausi M-MuLV AT aminorūgščių pakeitimai, aptikti atlikus mažose dNTP koncentracijose veikiančių M-MuLV mutantų atranką

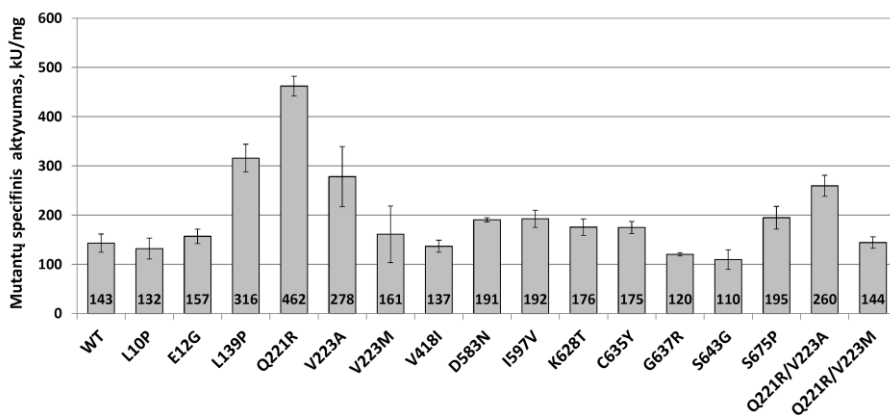
Pozicija	Pakeitimų kiekis	Mutacija	Pakeitimų kiekis
V223 (58,190,191)	10	M	6
		A	4
Q221 (192)	8	R	8
C635 (193)	7	Y	6
		R	1
E12	4	G	3
		D	1
L10	3	P	3
L139 (192)	3	P	3
V418	3	I	3
D583 (66,182)	3	G	1
		A	1
		N	1
I597 (194)	3	V	2
		M	1
K628	3	T	3
G637	3	R	2
		E	1
S643	3	G	2
		N	1
S675	3	P	3
K15, M39 (162), E201, K274, Q277, E282, T306 (182), E319, P431, V433 (157), N454 (75), L491, D524 (66,182), T567, L603 (192), H638 (182,183)	2		

Detali atrinktų baltymų sekų analizė parodė vyraujančius mutacijų susikauptumus tam tikrose baltymo vietose. Net 2/3 išanalizuotų mutantų turėjo aminorūgščių pakeitimus fermento aktyviajame centre, t.y. V223 pozicijoje, priklausančioje konservatyviam YVDD motyvui (44,58) arba šalia esančioje Q221 pozicijoje. Taip pat galima pastebėti didelį kiekį aminorūgščių pakeitimų baltymo C gale, ypač RNazės H domene (C635Y/R, D583G/A/N, I597V/M, K628T, G637R/E, S643G/N, S675P, D524G/N, L603S, H638R), kas leidžia daryti prielaidą, jog ribonukleazinio aktyvumo pokytis turėjo tam tikrą vaidmenį atrankos eksperimento metu. Baltymo N gale taip pat

pastebima nedidelė iki tol neaptiktų aminorūgščių pakeitimų sankaupa (E12G/D, L10P, K15R, M39V).

Siekiant iširti, kokią įtaką atrinktų baltymų savybėms turi pavienės mutacijos, buvo sukurti taškiniai mutantai, turintys dažniausiai atrankos eksperimento metu pasitaikiusius aminorūgščių pakeitimus (žr. 2 lentelę, pakeitimų kiekis 3 ir daugiau). Norint patikrinti, ar biocheminės taškinių mutacijų savybės galėtų sumuotis, papildomai buvo sukurti du dvigubi mutantai kombinuojant aktyviajame centre esančias Q221R ir V223A bei V223M mutacijas.

Rekombinantiniai baltymai buvo paruošti susintetinant juos *E. coli* ląstelėse ir išgryninti naudojant giminingumo bei jonų mainų chromatografijos stadijas. Baltymų preparatų grynumas buvo įvertintas vykdant elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje. Buvo iširtas mutantinių baltymų atvirkštinės transkriptazės aktyvumas ir apskaičiuotas specifinis nuo RNR priklausomos DNR sintezės aktyvumas (37 pav.), kuris daugumos mutantų atveju buvo panašus į laukinio tipo baltymo, išskyrus aktyvaus centro mutantus Q221R ir V223A bei L139P. Įdomu tai, kad Q221R pakeitimui būdingas padidėjęs specifinis aktyvumas nėra adityvi savybė, kadangi dvigubų mutantų Q221R/V223A bei Q221R/V223M savitasis aktyvumas išliko toks pats, kaip ir taškinių mutantų V223A ir V223M (37 pav.).

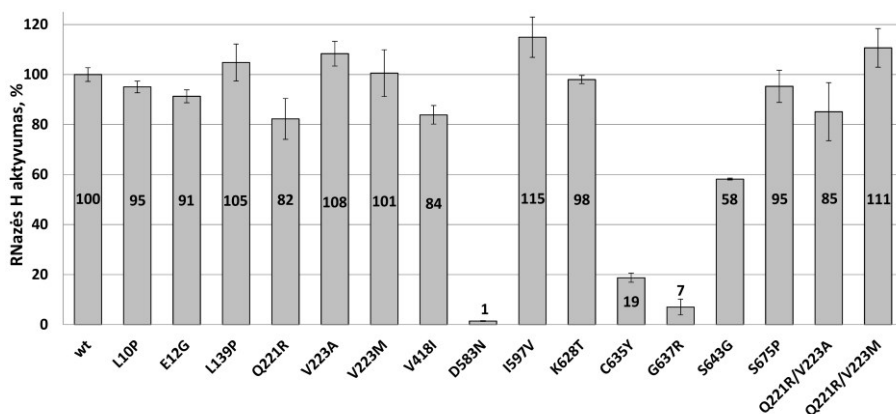


37 pav. M-MuLV taškinių ir dvigubų mutantų specifinis nuo RNR priklausomos DNR sintezės aktyvumas. kU – 1000 polimerazės aktyvumo vienetų. Pateikiami mažiausiai dviejų matavimų vidurkiai ($\pm 1SD$).

3.3.2 Atrinktų M-MuLV mutantų RNazės H aktyvumas

Gerai žinoma, kad M-MuLV AT RNazės H aktyvumo išjungimas gali padidinti baltymo stabilumą ir kDNR sintezės efektyvumą (66,195). Atlikus mutantinių baltymų sekų analizę, RNazės H domenas buvo viena iš AT baltymo sričių, kuriose aptikta didelė aminorūgščių pakeitimų sanauja, todėl buvo patikrintas taškinių mutantų RNazės H aktyvumas. Kaip ir tikėtasi, RNazės H centre esančio aspartato D583 pakeitimas į krūvio neturintį asparaginą visiškai išjungia nukleazinį aktyvumą. D583 yra šio domeno aktyviajame centre ir kartu su D524 bei E562 koordinuoja Mg^{2+} arba Mn^{2+} jonus (46).

Šalia D583N mutacijos, buvo pademonstruota, kad S643G, C635Y bei G637R aminorūgščių pakeitimai taip pat ryškiai sumažina RNazės H aktyvumą, atitinkamai iki 58%, 19% ir 7% pradinės vertės. Kitos mutacijos RNazės H domene (I597V, K628T bei S675P), taip pat baltymo N – gale ir polimerazės aktyviajame centre ribonukleazės aktyvumui įtakos neturi.



38 pav. M-MuLV AT taškinių ir dvigubų mutantų RNazės H aktyvumas. Pateikiami mažiausiai dviejų matavimų vidurkiai ($\pm 1SD$).

3.3.3 Atrinktų M-MuLV mutantų kinetinė analizė pusiausvyros sąlygomis

Pradinė mutantinių baltymų savybių analizė parodė, kad aktyvaus centro mutantai V223A, V223M bei šalia esantis Q221R esant mažoms dNTP koncentracijoms kDNR sintezę vykdo efektyviau, palyginus su laukinio tipo baltymu. Dėl šios priežasties nutarta detaliau išnagrinėti minėtų taškinių mutantų bei dvigubų mutantų Q221R/V223A bei Q221R/V223M kinetines savybes. Substratu naudojant RNR su prilydytu oligonukleotidu ir reakcijas vykdančią 1x Taq polimerazės buferyje su skirtingomis dNTP koncentracijomis

(20 μM , 8 μM , 3,2 μM , 1,28 μM kiekvieno dNTP, žr. 2.3.22 skyrelį), buvo nustatyta maksimalaus reakcijos greičio vertė V_{max} , Michaelio konstanta K_m , bei apskaičiuota katalitinė konstanta k_{cat} . Parodyta, kad visi trys taškiniai ir abu dvigubi aktyvaus centro mutantai pasižymėjo 4-5 kartus mažesne K_m verte, palyginus su laukinio tipo baltymu (3 lentelė ir 39 pav.). Taip pat nustatyta, kad dvigubas aktyvaus centro mutantas Q221R/V223A turėjo ~2,5 karto mažesnes katalitinės konstantos k_{cat} ir maksimalaus reakcijos greičio V_{max} vertes. Vykdamas kDNR sintezės reakcijas Taq polimerazės buferyje 42 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje buvo nustatytas ir šių fermentų procesyvumas (žr. 2.3.21), o naudojant Taq buferį be MgCl_2 (žr. 2.3.19) nustatytas ir sąveikos su substratu stiprumas (K_d). Visų matavimų rezultatai pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. M-MuLV AT laukinio tipo baltymo ir aktyvaus centro mutantų kinetinės savybės, procesyvumas ir disociacijos konstanta. Pateiktos trijų nepriklausomų matavimų vidutinės ± 1 SD.

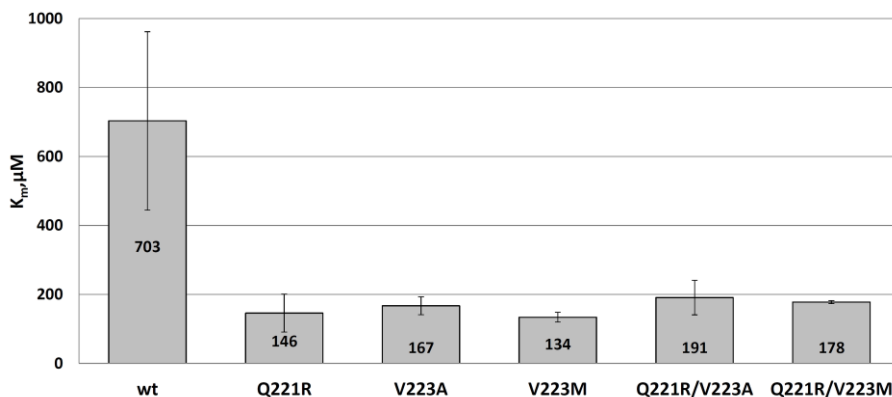
Baltymas	K_m (dNTP), μM	k_{cat} , s^{-1}	V_{max} , nM/s	Procesyvumas, nt	K_d , pM
WT	703 \pm 259	8,2 \pm 2,8	327 \pm 114	22 \pm 5	772 \pm 172
Q221R	146 \pm 55	5,1 \pm 1,1	204 \pm 46	10 \pm 2	407 \pm 205
V223A	167 \pm 26	5,0 \pm 0,2	201 \pm 7	39 \pm 5	1051 \pm 166
V223M	134 \pm 14	6,4 \pm 0,5	257 \pm 20	20 \pm 6	785 \pm 361
Q221R/V223A	191 \pm 50	2,9 \pm 0,8	115 \pm 33	15 \pm 3	466 \pm 89
Q221R/V223M	178 \pm 5	7,6 \pm 0,1	303 \pm 5	15 \pm 5	555 \pm 103

3.3.4 Polimerazės aktyvaus centro mutantų procesyvumas ir sąveikos su substratu stiprumas

Laukinio tipo fermento ir aktyvaus polimerazės centro mutantų pusiausvyrinės disociacijos konstantos buvo nustatytos taikant elektroforetinio judrumo poslinkio poliakrilamidiniame gelyje metodą. Nustatyta, kad Q221R pakeitimą turinčio baltymo varianto, kaip ir dvigubų aktyvaus centro mutantų, turinčių šią mutaciją (Q221R/V223A ir Q221R/V223M) K_d reikšmės yra beveik du kartus mažesnės nei laukinio tipo baltymo (3 lentelė). Kitų dviejų taškinių mutantų sąveikos su substratu stiprumas, lyginant su laukinio tipo baltymu, išliko beveik nepakitęs.

Q221R bei laukinio tipo M-MuLV AT disociacijos konstantos buvo nustatytos ir analizuojant temperatūrai atsparių mutantų sąveikos su substratu stiprumą – gautos atitinkamai 0,8 nM 1,5 nM K_d reikšmės (3.2.5 skyrius, 30 pav.). Šiame eksperimente baltymų sąveikos su substratu stiprumas buvo

tiriamas 1 x Taq polimerazės buferyje, greičiausiai dėl to K_d reikšmės gautos maždaug du kartus mažesnės (0,4 nM ir 0,77 nM), tačiau jų santykis išliko toks pat.



39 pav. M-MuLV AT laukinio tipo ir aktyvaus centro mutantų Michaelis konstantos (K_m) reikšmės. Pateikiami mažiausiai dviejų matavimų vidurkiai ($\pm 1SD$).

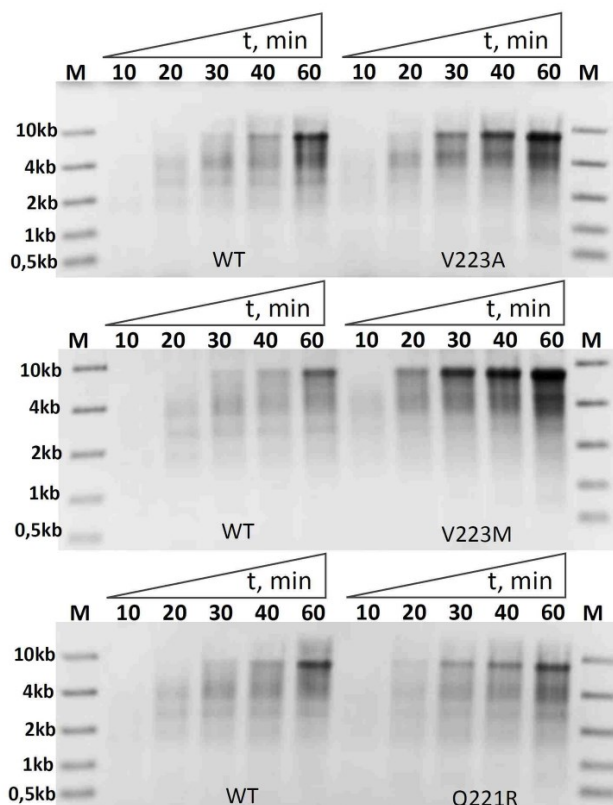
Toliau tęsiant baltymų biocheminių savybių tyrimą, buvo nustatytas pavienių ir dvigubų aktyvaus centro mutantų procesyvumas, naudojant žymėtą DNR/RNR substratą ir pridodant perteklių nežymėto oligodT/poliA. Nepaisant skirtumų tarp reakcijose naudotų buferinių tirpalų sudėčių, nustatyta laukinio tipo polimerazės procesyvumo vertė buvo panaši į ankstesniame eksperimente charakterizuojant termostabilius M-MuLV mutantus nustatytą vertę, atitinkamai 22 (± 5) ir 24 (± 12) nukleotidai (3 lentelė ir 31 pav.). Tuo tarpu Q221R mutanto atveju skirtinga buferių sudėtis turėjo reikšmės, kadangi procesyvumas, nustatytas šiame eksperimente naudojant 1 x Taq buferį, pasirodė 5 kartus mažesnis nei nustatytas anksčiau (3 lentelė ir 31 pav.). V223A mutantas pasižymėjo didžiausiu procesyvumu (39 nukleotidai), tuo tarpu V223M pakeitimas šiai fermento savybei įtakos neturėjo (20 nukleotidų). Įdomu tai, kad abiejų dvigubų mutantų procesyvumas buvo mažesnis nei pavienių V223A ir V223M mutantų, greičiausiai dėl neigiamos Q221R pakeitimo įtakos.

3.3.5 7,5 kb ilgio kDNR sintezės tyrimas

Geriausi M-MuLV AT baltymo variantai efektyviai sintetina ~3 kb ilgio kDNR fragmentus, nes tokio ilgio konstrukcija naudojama vykdant

evoliucijos eksperimentą. Siekiant patikrinti, ar atrinkti aktyvaus centro mutantai tinkami didesnio ilgio kDNR sintezei, atliktas atvirkštinės transkripcijos eksperimentas, naudojant 7,5 kb ilgio RNR. Reakcijos vykdytos 1x Taq polimerazės buferyje 42°C temperatūroje 10 – 60 min, produktai išanalizuoti atliekant šarminę elektroforezę agarozės gelyje.

Pastebėta, kad laukinio tipo baltymas nedidelį kiekį pilno ilgio produkto susintetina per 30 min (40 pav.). V223A bei Q221R mutantai (40 pav.), kaip ir dvigubi aktyvaus centro mutantai (duomenys nepublikuoti) pasižymėjo panašiu į laukinio tipo baltymo sintezės efektyvumu. Tuo tarpu tiriant V223M baltymo variantą pastebėta, kad gana didelis pilno ilgio produkto kiekis susintetinamas per 20 min nuo reakcijos pradžios, o per 60 minučių susikaupia kelis kartus daugiau kDNR, palyginus su laukinio tipo baltymu (40 pav.).



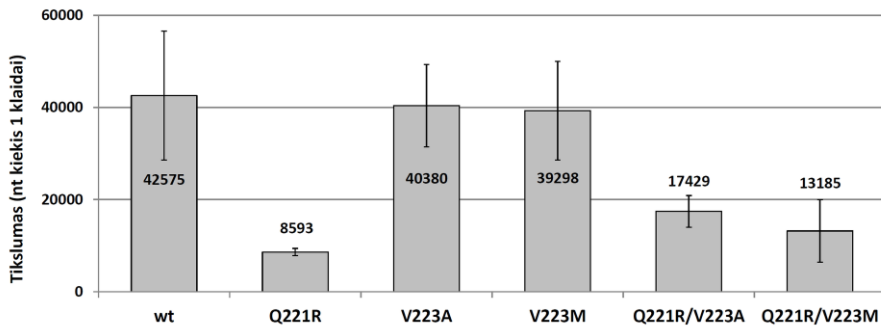
40 pav. 7,5 kb ilgio kDNR sintezės produktų elektroforezės šarminiame gelyje rezultatai. Reakcijos atliktos naudojant M-MuLV AT laukinio tipo baltymą ir aktyvaus centro taškinis mutantus.

3.3.6 kDNR sintezės tikslumas

M-MuLV AT aktyvaus centro mutantų tikslumas nustatytas atlikus atvirkštinę transkripciją, gautų produktų sekas nustatčius naujos kartos sekoskaitos metodais ir įvertinus kDNR sintezės reakcijos metu įvestų klaidingų nukleotidų kiekį. Kiekviena unikali kDNR molekulė prieš padauginimą vykdant PGR ir sekoskaitą buvo pažymėta unikaliu 14 atsitiktinių nukleotidų indeksu, kurio dėka nustatyta, ar sekoje esančios klaidos buvo įterptos kDNR sintezės metu, ar vėlesniuose bibliotekos ruošimo etapuose arba sekoskaitos metu. Ši metodika anksčiau buvo pritaikyta tiek nuo DNR priklausomų DNR polimerazių, tiek atvirkštinių transkriptazių tikslumui įvertinti (82,83,196). Palyginus su kDNR klonavimu ir klonų sekoskaita pagrįstu metodu, aprašytu 2.3.16 skyrelyje, šis metodas žymiai patikimesnis, kadangi leidžia išanalizuoti didelius susintetintų molekulių kiekius. Galimybė panaudoti tokį metodą atsirado todėl, kad Taq buferyje veikiančių mutantų atranka buvo atlikta keletą metų vėliau ir todėl nuspręsta pasinaudoti greitai besivystančios naujos kartos sekoskaitos galimybėmis. Atsižvelgiant į tai, kad *E. coli* ląstelėse vykstančios RNR sintezės metu įterpiamų klaidingų nukleotidų skaičius (1 iš 10^5 , (197,198)) mažesnis už T7 polimerazės padaromą klaidų skaičių vykdant reakciją *in vitro* (2 iš 10^4 , (199)), buvo pasirinkta RNR matricą susintetinti *in vivo*.

Naudojant laukinio tipo ir aktyvaus centro mutantų baltymų preparatus įvykdyta 0,21 kb ilgio kDNR sintezė, po to iš kiekvieno reakcijos mišinio paėmus po $\sim 1,2 \times 10^4$ susintetintų kDNR molekulių, vykdant du PGR ciklus jos pažymimos unikaliu 14 nukleotidų ilgio indeksu. Tokiu būdu sekoskaitai paruošiama po $\sim 2,5 \times 10^6$ nukleotidų, kurie susintetinti naudojant kiekvieną iš tiriamųjų baltymų. Atlikus sekoskaitą gauti DNR fragmentai pagal indeksus sugrupuoti į šeimas, laikant, kad unikalų indeksą turintys fragmentai yra gauti iš tos pačios kDNR molekulės. Skaičiuojant fermentų tikslumą daroma prielaida, kad visuose tą patį indeksą turinčios šeimos nariuose esančios mutacijos atsirado kDNR sintezės metu (200).

Išmatavus penkių aktyvaus centro mutantų bei laukinio tipo M-MuLV AT tikslumą paaiškėjo, kad wt baltymo ir V223A bei V223M pakeitimus turinčių variantų tikslumas yra panašus (1 klaida iš ~ 40000 , 41 pav.). Tuo tarpu kito taškinio mutanto Q221R tikslumas buvo ~ 5 kartus mažesnis nei wt baltymo (1 klaida iš ~ 8600). Įdomu tai, kad abu dvigubi mutantai, gauti kombinuojant Q221R mutaciją su pakeitimais V223 pozicijoje pasižymėjo 2-3 kartus mažesniu tikslumu, palyginus su laukinio tipo baltymu.



41 pav. M-MuLV AT laukinio tipo baltymo ir aktyvaus centro mutantų tikslumas, išreikštas teisingai įterptų nukleotidų skaičiumi 1 klaidai. Pasikliautiniai intervalai yra paskaičiuoti binominei proporcijai pagal (201).

3.4 Rezultatų aptarimas

Thermo Fisher Scientific Baltics mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtos centre sukurtas kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodas yra naujas atrankos būdas, priklausantis grupei metodų, kuriuos taikant visos eksperimento stadijos atliekamos tik *in vitro*. Šis metodas suteikia galimybę vykdyti atranką tokiais sąlygomis, kuriose fermentas gali laisvai sąveikauti su substratu.

Kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodo efektyvumas pirmiausia buvo pademonstruotas vykdant termostabilių M-MuLV AT variantų atranką. Parodyta, kad mutantai, gauti atlikus penkis atrankos ciklus, sugeba efektyviai vykdyti kDNR sintezę aukštesnėje temperatūroje, palyginus su laukinio tipo fermentu (žr. 3.2.3 skyrelį). Sukurto evoliucinio spaudimo sąlygas tenkinantiems baltymams taip pat būdingas ir padidintas aktyvumas 50°C temperatūroje (žr. 3.2.2 skyrelį). Analizuojant atrinktas taškines mutacijas parodyta, kad didelė jų dalis yra aprašytos literatūroje, kaip didinančios baltymo termostabilumą, reakcijos efektyvumą ir kitas savybes. Šalia šių mutacijų, gausiai aptikta ir naujų, prieš tai neaprašytų aminorūgščių pakeitimų, kurie taip pat didina baltymo termostabilumą ir efektyvumą aukštoje temperatūroje (žr. 3.2.4 skyrelį).

Atrankos eksperimento metu gauti M-MuLV AT mutantai turėjo po keletą aminorūgščių pakeitimų. Dalis mutacijų yra galimai atsitiktinės ir neutralios, pasikartojančios po vieną ar du kartus. Kita dalis aminorūgščių pakeitimų yra palankūs termostabilumui. Šių pakeitimų dažnis yra didesnis, jų indėlis į termostabilumą parodytas arba literatūroje, arba šiame tyrime (žr. 3.2.2 ir 3.2.4 skyrius). Dažnai aptinkami variantai, turintys daugiau nei po

vieną palankią mutaciją (žr. publikacijos (162) priedus S2 ir S3). Kai kurie eksperimento metu atrinkti mutantai turėjo net po penkias - šešias palankias mutacijas.

Baltymo variantai, kuriuose sukombinuota daug palankių mutacijų, atsirinkti galėjo keliais būdais. Pirmiausia, tokie mutantai galėjo egzistuoti pradinėje bibliotekoje ir išlikti bei būti padauginami vykdant atranką. Taip pat labai tikėtina, kad dalis pakeitimų buvo įvesti atrankos metu vykstant fermentinėms reakcijoms – kDNR sintezei, transkripcijai ir PGR. Atsižvelgiant į tai, kad kiekvieno atrankos etapo metu vykdomos kelios PGR paremtos bibliotekos amplifikacijos, galima teigti, kad ši reakcija turėtų būti svarbiu veiksmu padidinant bibliotekos variantiškumą. Atliekant PGR, polimerazė retkarčiais įterpia klaidingus nukleotidus, todėl mutacijos kaupiasi kiekvieno padauginimo metu. Taip pat klaidos atsiranda dėl grandinės persokimo ties antrinėmis struktūromis ir rekombinacijos, vykstančios nepilnai pratęstiems pradmenims nuo vienos matricos patenkant ant kitos ir susiformuojant chimerinėms molekulėms (202,203). Tokiu būdu mutantų biblioteka, praturtinta palankias savybes įgijusiais nariais, po kiekvieno atrankos ciklo vykdant manipuliacijas su nukleorūgštimis papildoma naujais variantais, atsirandančiais daugiausia dėl PGR artefaktų, šitaip sumažinant tikimybę eksperimento metu atsirinkti vienintelį genotipą.

Žinoma, atsitiktinai atsirandančios mutacijos gali būti ne tik palankios, tačiau ir turėti neigiamą poveikį. Pavyzdžiui, analizuojant daugybinius mutantus, gautus po penkių atrankos ciklų, aptikta tokių, kurie šalia teigiamą poveikį turinčių aminorūgščių pakeitimų, išjungiančių RNazės H aktyvumą, kartu turi ir baltymo aktyvumą panaikinančių arba termostabilumą sumažinančių mutacijų (žr. publikacijos (162) priedą S2). Labai tikėtina, kad šios mutacijos įsivedė atliekant manipuliacijas su DNR po paskutinio atrankos ciklo. Atrankos eksperimento metu taikant evoliucinį spaudimą tokie mutantai turėtų būti pašalinami iš bibliotekos. Taip pat gali būti, kad neigiamą poveikį turinčios mutacijos galutinėje bibliotekoje atsirado dėka *E. coli* ląstelėse veikiančio reparacijos mechanizmo. Vykdamas bibliotekos padauginimui skirtą PGR, dalis DNR fragmentų galėjo susiformuoti kaip heterodupleksai, turintys po vieną ar kelis nesuporuotus nukleotidus. Šiuos PGR fragmentus įterpus į plazmidę ir ją panaudojus *E. coli* transformacijai, bakterijose veikiant nesuporuotų nukleotidų taisymo fermentams, galėjo būti atsitiktinai pasirinktas ir ištaisytas vienas iš netinkančių nukleotidų. Nepaisant tikėtino nedidelio atsitiktinių mutacijų skaičiaus, atsirandančio vykdant manipuliacijas su bibliotekos DNR po paskutinio atrankos ciklo, atlikus nuskaitytų 103 klonų sekų analizę galima teigti, kad CRD metodas yra

tinkamas daugybinių mutantų atrankai. Ši teiginį patvirtina gauti rezultatai, jog mutacijos atrankos metu kaupiasi tam tikrose baltymo vietose, be to, atrenkamos literatūroje aprašytos mutacijos, kurių reikšmė baltymo savybėms parodyta.

Siekiant ištirti, kokią įtaką pavienės mutacijos turi M-MuLV AT savybėms ir kDNR sintezei aukštoje temperatūroje, buvo sukonstruoti 28 taškiniai mutantai, turintys dažniausiai atrankos eksperimento metu pasitaikiusias ir naujas, anksčiau neaprašytas mutacijas. Buvo nustatyti šių fermentų aktyvumai įprastoje 37°C bei 50°C temperatūrose (27 pav.), taip pat ištirta, kaip vyksta kDNR sintezė aukštos temperatūrose.

Kitam eksperimentui buvo pasirinktos 6 baltymo pozicijos, kuriose atrankos eksperimento metu susikaupė daugiausia mutacijų bei kitos 6 pozicijos, kuriose įvestos mutacijos nulėmė didžiausią aktyvumą santykiu 50°C/37°C. Šiose M-MuLV AT baltymo vietose buvo įvesta daugiau įvairių aminorūgščių pakeitimų, atliekant iš dalies įsotinančią mutagenezę ir ištirti gautų mutantų aktyvumai 37°C bei 50°C. Tokiu būdu šalia atrankos eksperimento metu gautų mutacijų buvo aptikta ir kitų tos pačios baltymo pozicijos pakeitimų, kurie turi teigiamą įtaką atvirkštinės transkriptazės baltymo termostabilumui.

Norint atlikti detalią biocheminių savybių analizę, buvo ištirta dvylika geriausių taškinių mutantų. Baltymų termostabilumo tyrimas, atliktas inkubuojant juos aukštoje temperatūroje su DNR/RNR hibridu parodė, kad taškinių mutantų D200N, L603W, T330P ir L139P inaktyvacijos puslaikis 50°C temperatūroje yra 2 – 4 kartus didesnis, palyginus su laukinio tipo atvirkštine transkriptaze (29 pav.). Šios keturios M-MuLV AT mutacijos yra kaip tik dažniausiai atrankos eksperimento metu aptiktos mutacijos, neskaičiuojant trijų jau senokai žinomų ir gerai išanalizuotų RNazės H aktyvumą išjungiančių aminorūgščių pakeitimų (1 lentelė). Įdomu tai, kad visų tirtų mutantų termostabilumas nesant substrato beveik nesiskyrė nuo laukinio tipo baltymo (duomenys nepublikuoti). Tolimesni tyrimai parodė, kad mutantams, pasižymintiems didžiausiu termostabilumu, būdingas padidėjęs sąveikos su substratu stiprumas – disociacijos konstanta sumažėja 1,5 – 5 kartus (30 pav.). Taip pat šie mutantai pasižymėjo ir 2 – 4 kartus padidėjusiu procesyvumu (31 pav.). Baltymų biocheminio tyrimo rezultatai leidžia daryti pagrįstą išvadą, kad tiriamųjų mutantų termostabilumas padidėja dėl sustiprėjusios sąveikos su substratu. Toks atvirkštinės transkriptazės baltymo stabilizavimo būdas yra gerai žinomas, aprašytas literatūroje (66,75). Vykdamas *in vitro* M-MuLV mutantų atranką, evoliucinis spaudimas buvo taikomas kDNR sintezės reakcijos metu, t.y. tuo metu, kai vyksta fermento ir

substrato sąveika. Todėl nenuostabu, kad atrinkti mutantai termostabilumą įgyja dėka stipresnės sąveikos su substratu. Galima numatyti, jog norint atrinkti atvirkštinės transkriptazės mutantus, pasižyminčius vidiniu baltymo stabilumu ir atsparumu temperatūrinei denatūracijai, reikėtų sukurti tokias sąlygas, kuriomis baltymų biblioteką galima būtų painkubuoti aukštesnėje temperatūroje dar prieš baltymams sąveikaujant su substratu.

Siekiant suprasti, kokie struktūriniai baltymo pokyčiai lemia pagerėjusias biochemines jo savybes, buvo sukurtas pilno ilgio M-MuLV modelis (42 pav.). Pagal šį modelį, vienas iš atrankos metu aptiktų geriausiomis savybėmis pasižyminčių mutantų D200 yra α – spiralėje netoli fermento aktyvaus centro (42 pav. B). Atstumas nuo šios aminorūgšties šoninės grandinės iki katalizinę funkciją vykančių aspartatų D224 ir D225 šoninių grandinių yra 7 – 9 Å. D200 šoninės grandinės įsiterpimas į atvirkštinės transkriptazės aktyvų centrą paaiškina tai, kad aminorūgščių pakeitimai šioje pozicijoje turi didelę įtaką fermento savybėms. Pastebėta, kad įvairūs aminorūgščių pakeitimai D200 pozicijoje, išskyrus aktyvumą išjungiantį pakeitimą D200P, pagerina fermento aktyvumą 50°C temperatūroje, palyginus su 37°C temperatūra (28 pav.). Be to, D200N mutantas, sugebantis sintetinti kDNR aukštesnėje nei 50°C temperatūroje, pasižymi ryškiai padidėjusiu termostabilumu, sąveikos su substratu stiprumu, procesyvumu ir nukleotidų įjungimo į grandinę greičiu, palyginus su laukinio tipo fermentu (29, 30, 31 ir 35 pav.).

Netoli nuo fermento aktyviojo centro, delno subdomeno šerdyje yra L139 aminorūgštis, kuri formuoja hidrofobinį klasterį su keletos aminorūgščių šoninėmis grandinėmis (42 pav. C), tarp kurių yra ir aktyviojo centro motyvui β juosta – kilpa – β juosta priklausančios aminorūgštys. Šis klasteris suardomas L139 pozicijoje įterpiančios polines aminorūgštis, dėl ko stipriai sumažėja baltymo termostabilumas (28 pav.). Tuo tarpu L139P mutantas pasižymi padidėjusiu termostabilumu, sąveikos su substratu stiprumu ir procesyvumu (29, 30, 31 pav.). Kaip žinoma, dėl unikalios ciklinės struktūros prolinas apriboja C α grandinės sukimąsi ir tokiu būdu stabilizuoja baltymo struktūrą, be abejo, jei toks judrumo apribojimas nepakenkia fermento funkcijai. Galima numatyti, kad 139 pozicijoje esantis prolinas stabilizuoja hidrofobinį klasterį, sudarytą iš I218, L220 ir L273 aminorūgščių liekanų, padidindamas šios struktūros stabilumą (204,205).

Kaip ir L139P mutacijos atveju, T330 aminorūgšties pakeitimas į proliną pagerina atvirkštinės transkriptazės sąveikos su substratu stiprumą, termostabilumą ir procesyvumą (29, 30, 31 pav.). Pagal pilno ilgio M-MuLV AT modelį, T330 pozicija yra nedidelės spiralės, esančios nykščio subdomene, gale (42 pav. D). Ši spiralė yra netoli numatomos baltymo

sąveikos su substratu vietos, o šalia T330 esančios K329 aminorūgšties šoninė grandinė galimai sudaro sąveiką su fosfodiesteriniu karkasu. Pagal analogiją su L139P mutacija, prolino įvedimas 330 pozicijoje padidina spiralės motyvo rigidiškumą, tokiu būdu stabilizuodamas baltymą ir padidindamas sąveikos su substratu stiprumą.

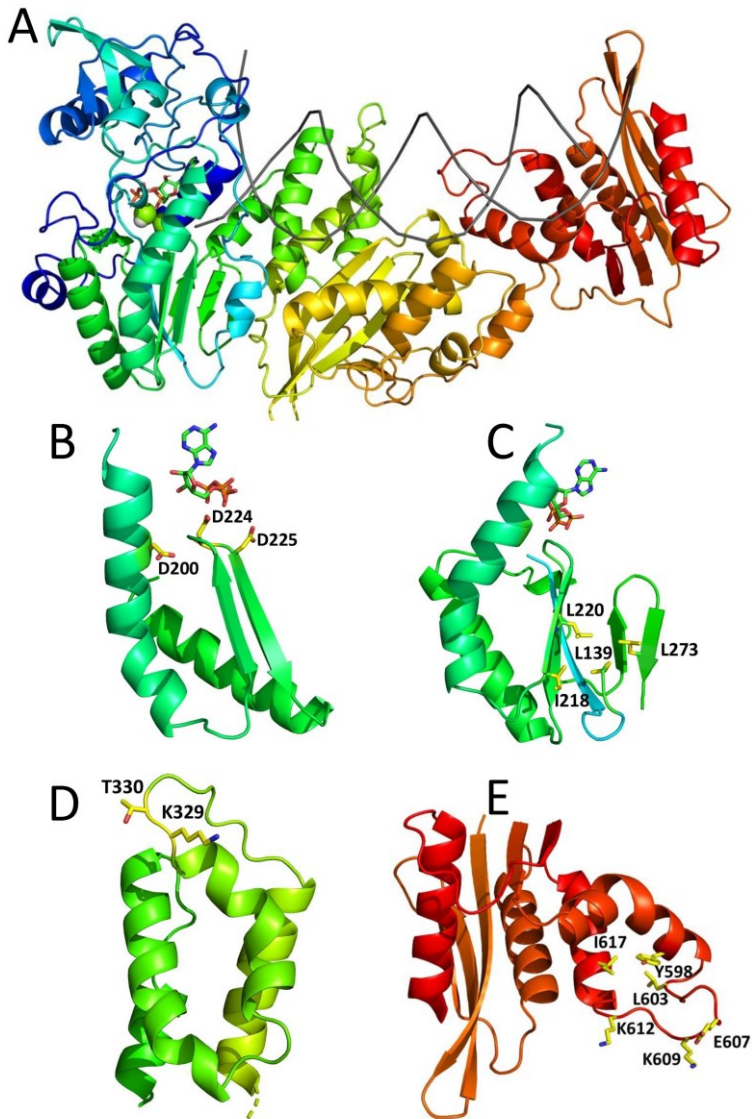
L603W pakeitimui taip pat gali būti pritaikytas struktūros stabilizavimo mechanizmas, panašus į aukščiau aprašytą. L603 pozicija yra RNazės H domene esančios vadinamosios „C – spiralės“ gale, už kurios prasideda aiškios struktūros neturinti kilpa (46). Pagal sudarytą modelį, L603 kartu su I617 ir Y598 sudaro hidrofobinį klasterį ir yra toje pačioje kilpoje, kaip ir K609 bei K612 aminorūgštys (42 pav. E), kurioms priskiriama sąveika su substrato fosfodiesteriniu karkasu (46). Tiriant L603 mutantų aktyvumą skirtingose temperatūrose pastebėta, kad 603 pozicijoje įvedus aminorūgštis, turinčias dideles hidrofobines ar aromatinės šonines grandines, padidėja 50°C/37°C aktyvumų santykis (28 pav.). Tokie duomenys leidžia manyti, kad minėti aminorūgščių pakeitimai stabilizuoja hidrofobinį klasterį, taip pat galimai stabilizuojama ir „C – spiralė“ bei visa kilpa, sudaranti kontaktus su substratu. Dėl šios priežasties padidėja mutantų termostabilumas, sąveikos su substratu stiprumas ir procesyvumas (29, 30, 31 pav.). Toje pačioje RNazės H domeno kilpoje yra ir E607 pozicija. Buvo parodyta, kad glutamo rūgšties pakeitimas į liziną šioje pozicijoje (E607K) padidina sąveikos su substratu stiprumą ir procesyvumą (30 ir 31 pav.). Tokį savybių pasikeitimą galima paaiškinti neigiamo krūvio pakeitimu į teigiamą, kas žymiai sustiprina sąveiką su neigiamai įkrautu substrato fosfodiesteriniu karkasu. Tiriant 50°C/37°C aktyvumų santykį (28 pav.) nustatyta, kad baltymo aktyvumą aukštesnėje temperatūroje padidina ir glicino bei alanino įvedimas šioje pozicijoje (E607G bei E607A). Tai reiškia, kad baltymo savybes reikšmingai pakeičia tiek neigiamo krūvio panaikinimas E607 pozicijoje, tiek pakeitimas teigiamu.

Aukščiau aprašytos penkios pagrindinės aminorūgščių mutacijos, aptiktos atrankos eksperimento metu, yra išsidėsčiusios skirtinguose baltymo subdomenuose. Dėl to galima tikėtis, kad apjungiant šiuos aminorūgščių pakeitimus, teigiamos baltymo savybės taip pat sumuosis. Norint patikrinti šią prielaidą, buvo sukurti daugybiniai M-MuLV AT mutantai. Kaip ir tikėtasi, aminorūgščių pakeitimų įvedimas palaiapsniui didino mutantinių baltymų termostabilumą, sąveikos su substratu stiprumą ir procesyvumą. Geriausiomis savybėmis pasižymėjo mutantas, gautas apjungiant visas penkias mutacijas. Palyginus su laukinio tipo fermentu, mut5 atvirkštinės transkriptazės termostabilumas inkubuojant 50°C temperatūroje padidėjo ~12 kartų, sąveika su substratu pagėrėjo ~50 kartų, procesyvumas padidėjo ~65

kartus (žr. 32, 33, 34 pav.). Iki 1,5 kb išaugęs procesyvumas leidžia šį fermentą panaudoti ilgos kDNR sintezei, kas buvo parodyta vykdant 7,5 kb ilgio RNR atvirkštinę transkripciją įvairiose temperatūrose (36 pav.).

Įdomu pastebėti, kad pagerėjusias biochemines savybes demonstravę ir efektyvia kDNR sinteze pasižymėję mutantai mut1 – mut5 turėjo laukinio tipo RNazės H domenui būdingą aktyvų centrą ir išlaikė ribonukleazinį aktyvumą. Šie duomenys suteikia papildomos informacijos apie atvirkštinių transkriptazių savybes, reikalingas efektyviai ilgos kDNR sintezei, kadangi anksčiau buvo pademonstruota, kad atvirkštinę transkripciją efektyviau vykdo ribonukleazinio aktyvumo neturintys mutantai (66). Vykdamas atrankos eksperimentą, RNazės H aktyvumą panaikinančių aktyvaus centro mutacijų D524, D653 ir D583 dažnis buvo panašus į mut1 – mut5 mutantams konstruoti panaudotų mutacijų dažnį (1 lentelė). Šis rezultatas rodo, kad efektyviai kDNR sintezei aukštoje temperatūroje stipresnis susirišimas su matrica yra toks pats svarbus kaip ir RNazės H aktyvumo išjungimas. Pagal analogiją su tyrimais, padarytais su ŽIV RT (206), galima daryti prielaidą, kad M-MuLV AT su substratu taip pat galėtų rištis dviem būdais. Sintetinės kDNR grandinės 3' gale atsidūrus pirštų subdomenui vykta grandinės pratęsimas, o fermentui apsisukus priešinga kryptimi – RNR grandinės skaidymas. Tokiu būdu, polimerazinis ir RNazės H aktyvumai konkuruoja tarpusavyje. Laukinio tipo M-MuLV fermento atveju abu šie aktyvumai yra suderinti efektyviam genomui padauginimui ir viruso plitimui užtikrinti. Tuo tarpu, norint turėti *in vitro* sąlygomis efektyviai aukštoje temperatūroje kDNR sintetinančią fermentą, galima arba išjunti RNazės H aktyvumą, arba stiprinti baltymo susirišimą su substratu.

Atrankos eksperimentas padėjo atrasti nemažai naujų mutacijų, suteikiančių M-MuLV AT termostabilumo, tuo pačiu pagerinančių ir kitas savybes. Analizuojant po atrankos gautus daugybinius mutantus nebuvo aptikta nė vieno, apjungiančio geriausiomis savybėmis pasižyminčias mutacijas D200N, L603W, T330P, E607K ir L139P. Tris iš šių mutacijų turėjo daugybinis mutantas mut4_S. Nustatyti šio mutanto sąveikos su substratu stiprumo, procesyvumo, termostabilumo parametrai neprilygo geriausiomis savybėmis pasižymėjusio dirbtinai sukonstruoto mutanto mut5 savybėms. Šis rezultatas rodo, kad gautų taškinių mutantų analizė ir dirbtinių jų kombinacija gali duoti geresnius rezultatus nei naudojant tiesiogiai atrankos eksperimente aptiktus daugybinius mutantus.



42 pav. Atrankos eksperimento metu aptiktų mutacijų padėtis M-MuLV baltymo struktūroje. A) Pilno ilgio M-MuLV AT struktūros modelis. B) Aktyvaus centro struktūra, kurioje D200 amino rūgšties šoninė grandinė yra šalia aktyvaus centro aminorūgščių D224 ir D225 šoninių grandinių. C) L139 aminorūgštis įeina į hidrofobinio klasterio sudėtį. D) T330 ir K329 aminorūgščių padėtis nykščio subdomene. E) RNazės H domeno struktūra, kurioje L603 aminorūgštis kartu su K609, K612 ir E607 aminorūgštimis sudaro kilpą, galimai sąveikaujančią su substratu.

Kompartimentalizuotų ribosominių kompleksų metodas, iš pradžių panaudotas termostabilių M-MuLV AT mutantų atrankai, buvo sėkmingai pritaikytas ir kinetinėms šio fermento savybėms keisti. Atrankos eksperimento metu buvo siekiama atrinkti AT mutantus, Taq polimerazei skirtame buferyje efektyviai sintetinančius kDNR. Efektyvi kDNR sintezė yra svarbus vieno žingsnio AT-PGR (*angl. One-Step RT-PCR*) etapas. Parenkant optimalias vieno žingsnio AT-PGR sąlygas, dažniausiai siekiama surasti tokios sudėties buferinį tirpalą, kuriame efektyviai veiktų tiek AT, tiek termofilinė DNR polimerazė. Įprastai AT reakcijoje ir PGR naudojami buferiniai tirpalai skiriasi pH reikšmėmis, vienvalenčių ir divalenčių jonų bei dNTP koncentracijomis (žr. 2.3.14 skyrelį). AT buferyje, palyginus su Taq polimerazės buferiu yra didesnė druskų koncentracija, taip pat reikšmingas skirtumas tarp optimalių dNTP koncentracijų – atitinkamai 1 mM ir 0,2 mM. Optimizuojant reakcijos sąlygas, dNTP koncentraciją AT buferyje galima būtų parinkti tokią, kuri reikalinga M-MuLV AT fermentui, tačiau padidintos dNTP koncentracijos mažina DNR polimerazių tikslumą, ypač tų, kurios pasižymi 3'-5' egz nukleaziniu aktyvumu (207,208). Be to, esant didesnėms dNTP koncentracijoms, reakcijos mišinyje atitinkami turi būti daugiau Mg^{2+} jonų, kas irgi galėtų mažinti DNR polimerazių tikslumą. Norint klonuoti AT-PGR metu padaugintas sekas, reakcijos tikslumas gali būti svarbus.

Aptartą fermentų ir buferinio tirpalo suderinamumo klausimą galima bandyti spręsti kompromiso būdu parenkant abu fermentus tenkinančią buferio sudėtį. Vis dėlto svarbu atkreipti dėmesį į tai, kad vykdant AT-kPGR, kDNR grandinė yra sintetinama tik vieną kartą, tuo tarpu DNR polimerazė amplifikuoja DNR apie 20-40 kartų. Dėl šios priežasties dažniausiai pirmenybė teikiama optimaliam kPGR buferiui. Nekeičiant kPGR buferio sudėties, bet pasitelkiant *in vitro* evoliucijos technologiją, galima būtų atrinkti atvirkštinę transkriptazę, geriausiai veikiančią kPGR buferiniame tirpale.

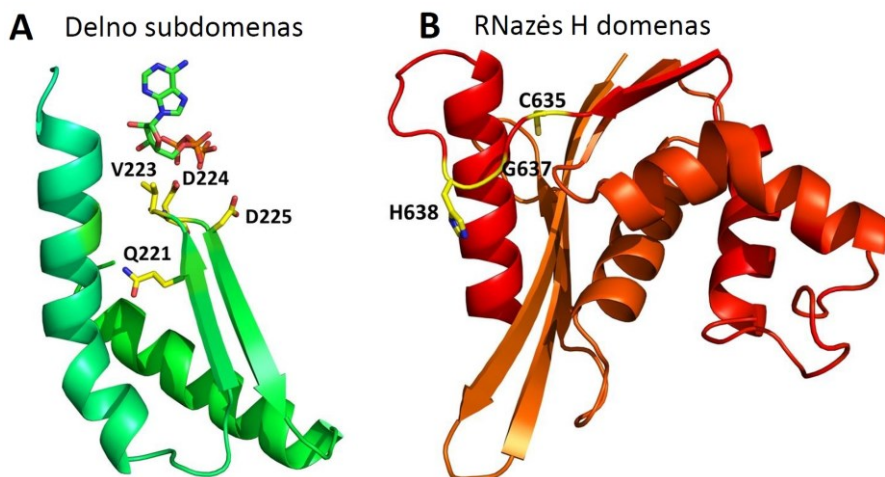
Pasirinkus pastarąjį variantą, atranka buvo vykdoma Taq polimerazei skirtame buferyje, kurio pagrindinis skirtumas nuo M-MuLV AT fermentui optimalaus buferinio tirpalo yra maža dNTP koncentracija. Įprastai atvirkštinės transkripcijos reakcija vykdoma mišinyje esant 0,5 mM - 1 mM dNTP koncentracijai, o standartinis Taq polimerazės buferis turi 0,2 mM dNTP koncentraciją. Tokiu būdu buvo tikimasi atrinkti Taq polimerazės buferyje efektyviai veikiančius M-MuLV AT variantus, kurie be papildomo reakcijos sąlygų optimizavimo galėtų tikti vieno žingsnio AT-PGR.

Vykdant atrankos eksperimentą buvo atlikti septyni atrankos ciklai, kDNR sintezės laiką palaipsniui trumpinant nuo 60 minučių iki 5 minučių. Iš atrinktos mutantų bibliotekos atsitiktinai paimti 29 genai ir nustatytos jų

sekos, siekiant išaiškinti, kokie aminorūgščių pakeitimai susikaupė atrankos eksperimento metu.

Paaikškėjo, kad 26 iš 29 atrinktų M-MuLV AT variantų turėjo pakeitimus baltymo RNazės H domene (2 lentelė). Kai kurios mutacijos, tokios kaip pakeitimai D524 ir D583 pozicijose, yra gerai žinomos dėl savo savybės išjungti RNazės H aktyvumą (66,182). Šalia jų buvo aptikta kitų mutacijų, kurios iš dalies sumažina RNazės H aktyvumą (C635Y, G637R ir S643G). Mutacijos C635 pozicijoje poveikis buvo žinomas iš ankstesnių tyrimų (193), pagal kuriuos C635V mutantas išlaiko 84 % RNazės H aktyvumo. Šiame atrankos eksperimente aptiktas mutantas C635Y išlaiko tik 19 % RNazės H aktyvumo (38 pav.). C635 ir G637 pozicijos yra išsidėsčiusios RNazės H domene esančioje kilpoje, vadinamoje H – kilpa (arba His-kilpa), kurios seka yra CPGHQK, o aminorūgštys nuo P636 iki K640 yra konservatyvios tarp visų RNazių H (31). Ši kilpa yra vienas iš trijų regionų M-MuLV struktūroje, kurių padėtis nėra aiškiai išspręsta (46). Mūsų sukurtas pilno ilgio M-MuLV AT modelis rodo, kad C635 pozicija galėtų būti šalia konservatyvios H638, kuri įeina į RNazės H aktyvų centrą (43pav.). Tokiu būdu pakeitimai C635 pozicijoje galėtų turėti įtakos RNazės H sąveikai su DNR/RNR hibridu. Taip pat galima numanyti, kad panašiu būdu M-MuLV AT įtakoja ir G637R mutacija, sumažinanti RNazės H aktyvumą iki 7 % (38 pav.).

Viena iš įdomesnių mutacijų, aptiktų atlikus atrankos eksperimentą, yra I597V (2 lentelė). I597 pozicija yra teigiamą krūvį turinčioje kilpoje, kurios neaptinkama ŽIV RNazės H struktūroje, tačiau ji būdinga *E. coli* RNazei H, kur kilpos sudėtyje esančios bazinės aminorūgštys sudaro kontaktus su RNR/DNR hibridu. Panašią funkciją šis struktūrinis elementas atlieka ir M-MuLV AT RNazės H sąveikoje su substratu (46).



43 pav. Atrankos eksperimento metu aptiktų aktyvaus centro (žalia spalva) ir RNazės H domeno (raudona spalva) mutacijų padėtis M-MuLV AT baltymo struktūroje. A) Polimerazės aktyviajame centre esančių Q221, V223, D224 ir D225 aminorūgščių liekanos pavaizduotos kartu su įeinančiu nukleozido trifosfatu. B) C635, G637 ir H638 aminorūgščių liekanos pavaizduotos RNazės H domene esančioje kilpoje.

Buvo parodyta, kad M-MuLV AT, pašalinus bazinėmis aminorūgštimis pasižyminčią kilpą, netenka beveik viso RNazės H aktyvumo, o polimerazinis aktyvumas taip pat susilpnėja (209). Minėtos kilpos sudėtyje yra nedidelė aštuonių aminorūgščių struktūra, pavadinta C α -spirale, kurios įtaka fermento aktyvumui detalai išnagrinėta tiriant taškinius mutantus. Šios spiralės sudėtyje įvedus mutaciją I597A, RNazės H aktyvumas išlieka beveik toks pats, kaip ir laukinio tipo fermento (194). Panašiai ir mutacija I597V, gauta atliekant atrankos eksperimentą, beveik neturi įtakos fermento aktyvumui, nes izoleucinas ir valinas yra panašios hidrofobinės aminorūgštys (38 pav.).

D. Lim ir kolegų atliktas *in vivo* tyrimas parodė, kad I597A mutacija sutrukdo viruso replikacijos ciklą, kadangi mutantinio viruso dalelių plitimas iš ląstelių vėluoja 14 dienų, palyginus su laukinio tipo baltymu. Tai reiškia, kad šios mutacijos įvedimas sukuria evoliucinį spaudimą, kurio metu turėtų atsirinkti viruso mutantai, pasižymintys greitesniu replikacijos ciklu. Atliekant *in vivo* eksperimentą gauti DNR sekoskaitos rezultatai parodė, kad replikacijos ciklas sutrumpėjo tiems viruso mutantams, kurių atvirkštinės transkriptazės 597 pozicijoje esantis alaninas dėka spontaniškų mutacijų pasikeitė būtent į valiną. Tokiu būdu I597V mutacijos atsiradimas *in vitro*

evoliucijos eksperimento metu netikėtai sutampa su natūralios viruso evoliucijos *in vivo* rezultatu.

Didžioji dalis mutacijų, aptiktų atlikus Taq polimerazės buferyje efektyviai veikiančių M-MuLV AT variantų atrankos eksperimentą, buvo susikaupę polimerazės aktyviame centre. Mutacijų susikaupimas konkrečiame baltymo motyve dažniausiai rodo, kad atrankos eksperimentas įvyko sėkmingai ir tiriamasis baltymas įgijo reikšmingų pokyčių, padedančių išlikti evoliucinio spaudimo sąlygomis.

Daugiausia aminorūgščių pakeitimų aptikta baltymo 223 pozicijoje, kuri priklauso aktyviame centre esančiam konservatyviam YVDD motyvui. Valinas yra vienintelė variabili šio atvirkštinėms transkriptazėms būdingo YXDD motyvo aminorūgštis, kuri atrankos metu mutavo į metioniną arba alaniną (žr. 2 lentelę). Įdomu pastebėti, kad metioniną YXDD motyvo sekoje turi dauguma atvirkštinių transkriptazių – žmogaus imunodeficitu viruso (*angl. HIV*) AT, kačių imunodeficitu viruso (*angl. FIV*) AT, beždžionių imunodeficitu viruso (*angl. SIV*) AT (210) ir paukščių mieloblastozės viruso (*angl. AMV*) (211) AT. YADD seka pasižymi kai kurie atvirkštinės transkriptazės aktyvumą turintys fermentai, kurių genus koduoja retroelementams priskiriamos sekos (212) taip pat CRISPR-Cas sistemos baltymai (213). Tuo tarpu tiriamoji pelių leukemijos viruso AT ir kačių leukemijos viruso (*angl. FLV*) AT aktyviojo centro motyvo seka yra YVDD (210).

Nustačius, kad evoliucijos eksperimento metu gausiai aptinkami aktyvaus centro mutantai, buvo ištirtos jų savybės – polimerazinis aktyvumas, baltymo ir substrato disociacijos konstanta, kinetiniai parametrai, procesyvumas, tikslumas. Taip buvo siekiama atsakyti į klausimą, koku būdu fermentas prisitaikė prie kintančių aplinkos sąlygų atrankos eksperimento metu.

Kadangi valino, esančio M-MuLV AT aktyviame centre, pakeitimų į metioniną, alaniną, izoleuciną ir seriną reikšmė baltymo savybėms buvo tirama ir kitų mokslininkų grupių (58,190,191,214), atsirado galimybė palyginti minėtose publikacijose ir šiame tyrime gautus rezultatus.

Lyginant laukinio tipo M-MuLV AT ir taškinių aktyvaus centro mutantų V223A, V223M, Q221R bei dvigubų mutantų Q221R/V223A ir Q221R/V223M sąveikos su substratu stiprumą, reikšmingų skirtumų nenustatyta (3 lentelė). Galima pastebėti, kad sąveika tarp M-MuLV AT ir DNR/RNR hibrido yra gana stipri, kadangi nustatyta disociacijos konstanta $K_d = 0,8$ nM. Palyginimui, kitų mokslininkų grupių nustatytos K_d reikšmės kinta plačiose ribose nuo 1 nM iki 152 nM (58,66,187,188,189,157). Šį platų

K_d reikšmių intervalą galima būtų paaiškinti eksperimentų sąlygų skirtumais, įskaitant substratą ir buferio sudėtį.

Aktyvaus centro mutantų V223A ir V223M sąveikos su RNR/DNR hibridu stiprumas, kaip minėta, yra panašus į laukinio tipo fermento (3 lentelė). Ši sąveika yra žymiai stipresnė, nei nustatyta kitų tyrėjų, naudojant dvigrandės DNR substratą. Laukinio tipo fermentui nustatyta sąveikos su DNR K_d buvo 151,7 nM, V223A ir V223M mutantams atitinkamai 159,2 nM ir 142,8 nM (58). Nepaisant truputį besiskiriančių buferinių tirpalų sudėčių, galima daryti išvadą, kad AT ir jos mutantai žymiai stipriau rišasi su RNR/DNR hibridu, kuris yra pagrindinis substratas, nei su dvigrande DNR.

Nustačius aptariamų mutantų ir laukinio tipo M-MuLV AT procesyvumą, nežymiai išsiskiria Q221R variantas, kurio procesyvumas yra ~2 kartus mažesnis nei WT baltymo. Atitinkamai ir dvigubų mutantų, į kurių sudėtį įeina Q221R pakeitimas, procesyvumai truputį mažesni (3 lentelė).

Apibendrinant galima teigti, kad aktyvaus centro mutantų sąveikos su substratu ir procesyvumo tyrimai neparodė akivaizdžių ir reikšmingų skirtumų, lyginant su laukinio tipo fermentu. Tokie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad šio atrankos eksperimento metu sukurto evoliucinio spaudimo dėka išliko mutantai, turintys kitokias savybes negu mutantai, gauti atliekant 3.2 skyriuje aprašytą termostabilių fermentų atranką.

Dar viena svarbi polimerazių savybė, galinti pasikeisti atrankos eksperimento metu, yra DNR sintezės tikslumas. Kaip ir kitų dažniausiai tyrimuose naudojamų atvirkštinių transkriptazių, M-MuLV AT tikslumas yra gerai ištyrinėtas naudojant klasikinius LacZ α komplementacijos (81), pradmens pratęsimo taikant įvairius dNTP mišinius (58,81) metodus. Pastaraisiais metais tokiuose eksperimentuose pasitelkiamos naujos kartos sekoskaitos galimybės (83,196,212), sėkmingai pritaikytos ir šiame tyrime, nustatant M-MuLV AT ir jos mutantų tikslumą. Nepaisant skirtumų tarp metodų, nustatytas wt fermento tikslumas, siekiantis 1 klaidą iš 4×10^4 į grandinę įtrauktų nukleotidų (41 pav.), yra artimas kitų mokslininkų grupių pateikiamam rezultatui.

Lyginant nustatytą aktyvaus centro mutantų tikslumą su literatūros duomenimis galima pastebėti, kad kitų tyrėjų teigimu V223A ir V223M mutantai turėtų būti mažiau tikslūs, palyginus su wt fermentu (58). Mūsų atliktas tyrimas rodo, kad konservatyviame motyve YVDD valiną pakeitus alaninu arba metioninu, fermento tikslumas praktiškai nenukenčia (41 pav.). Šį nesutapimą galima būtų paaiškinti reakcijos sąlygų skirtumu. Atliekant tyrimą 1x Taq buferyje buvo naudota vos 1,5 mM Mg^{2+} jonų koncentracija, kas galėjo turėti teigiamos įtakos minėtų mutantų tikslumui. Destefano

vadovaujamos grupės atlikti tyrimai parodė, kad ŽIV AT, aktyviame centre turinti YMDD seką, vykdo kDNR sintezę 4 - 9 kartus tiksliau reakcijos mišinyje esant 0,5 mM ar 0,25 mM Mg^{2+} jonų koncentracijai, palyginus su 6 mM Mg^{2+} koncentracija (81,215). Tuo tarpu laukinio tipo M-MuLV AT tikslumui Mg^{2+} koncentracija įtakos neturi.

Reikšmingas klaidų skaičiaus padidėjimas kDNR sintezės metu pastebėtas tiriant Q221R variantą (41 pav.). Įdomu tai, kad dvigubi mutantai Q221R/V223M ir Q221R/V223A, turintys tikslumą mažinančią mutaciją, yra apie 2 kartus tikslesni nei Q221R mutantas. Iš šių rezultatų galima daryti prielaidą, kad arginino šoninė grandinė, atsiradusi fermento katalitiniame centre (43 pav.) sukelia erdvinis trukdžius, kas sumažina fermento tikslumą. Tuo tarpu greta esančio valino, turinčio šakotą šoninę grandinę, pakeitimas į metioniną arba alaniną sumažina erdvines sąveikas ir tokiu būdu iš dalies kompensuoja tikslumo praradimą.

Svarbiausius fermento pokyčius, įvykusius atrankos eksperimento eigoje, atskleidė aktyvaus centro mutantų kinetinių savybių tyrimas. Pusiausvyros sąlygomis nustatytas M-MuLV AT ir jos mutantų K_m ir k_{cat} konstantas yra publikavę daug tyrėjų grupių (58,76,91,189,209). Tyrimai buvo atliekami įvairių sudėčių ir pH reikšmių buferiniuose tirpaluose, taikant skirtingas reakcijos sąlygas. Dėl šios priežasties nustatytos K_m reikšmės varijuoja plačiose ribose nuo 3,3 μM (189) iki 232 μM (91). Dažniausiai eksperimentuose buvo naudojami homopolimeriniai substratai, kurie suteikia galimybę įvertinti vieno konkretaus nukleotido įtraukimo į grandinę kinetiką. Atliekant šį tyrimą, siekiant sukurti aktualias kDNR sintezės sąlygas, reakcijos mišinyje buvo natūrali RNR/DNR matrica ir visi keturi nukleotidai. Panašiomis sąlygomis wt fermento veikimas buvo patikrintas kitų tyrėjų, kurie parodė, kad kDNR sintezės efektyvumas susilpnėja reakcijoje esant mažesnei nei 0,25 mM dNTP koncentracijai, tačiau K_m reikšmės nepateikė (76). Mūsų eksperimente nustatyta M-MuLV AT K_m reikšmė dNTP mišinio kaip substrato atžvilgiu lygi 0,7 mM. Šis skaičius yra gerokai didesnis, nei pateikiama anksčiau paminėtuose tyrimuose, kuriuose buvo homopolimeriniai substratai. K_m reikšmių skirtumą galima paaiškinti atsižvelgiant į tai, kad realiomis kDNR sintezės sąlygomis į fermento aktyvųjų centrą gali patekti visi keturi nukleotidai, tačiau į sintetinamą grandinę turi būti įjungiamas tik vienas teisingai suporuotas nukleotidas.

Taškinių M-MuLV mutantų kinetiniai tyrimai atskleidė, kad pakeitimai aktyviajame centre lemia K_m reikšmės sumažėjimą 4-5 kartus. Tai reiškia, kad minėti mutantai pusę maksimalaus reakcijos greičio pasiekia reakcijos mišinyje esant žymiai mažiau nukleotidų, palyginus su wt baltymu.

Atrankos eksperimento metu AT reakcija buvo vykdoma Taq polimerazės buferyje, kuriame nukleotidų koncentracija yra 0,2 mM, t.y. žymiai mažesnė nei nustatyta laukinio tipo baltymo K_m reikšmė. Tokios aplinkos sąlygos sukūrė aiškų evoliucinį spaudimą, kurio metu buvo atrinkti mutantai, galintys efektyviai veikti esant mažoms dNTP substrato koncentracijoms.

Maža dNTP koncentracija ir trumpinamas reakcijos laikas veikė kaip evoliucinis spaudimas, kurio metu fermentas pakeitė savo aktyvųjį centrą, kad prisitaikytų prie pasikeitusių aplinkos sąlygų. Įgijus V223M mutaciją, onkoretrovirusinės M-MuLV AT aktyvusis centras tapo panašus į lentivirusinės AT aktyvųjį centrą. Lentivirusai, tokie kaip žmogaus, beždžionių arba kačių imunodeficitu virusai, infekuoja diferencijuotas, nesidalijančias ląsteles, tuo tarpu onkoretrovirusai dauginasi naudodami aktyviai besidalijančias ląsteles (76). Natūralu, kad besidalijančiose ląstelėse yra žymiai didesnė dNTP koncentracija, palyginus su nesidalijančiomis ląstelėmis. Pavyzdžiui, aktyviuose T limfocituose dNTP koncentracija yra daugiau nei 20 kartų didesnė, palyginus su žmogaus makrofagais, kurie yra ŽIV taikiny (216). Tokiu būdu, onkoretrovirusinė M-MuLV atvirkštinė transkriptazė evoliucijos eksperimento metu supanašėjo su lentivirusine tam, kad galėtų vykdyti polimerazinę reakciją terpėje, kurioje yra mažai dNTP substrato. Apibendrinant atrinktų M-MuLV mutantų savybes galima pastebėti, kad šio atrankos eksperimento metu baltymas įgijo tokius pokyčius, kurie atkartoją gamtinės evoliucijos eigoje vykstančius procesus.

Galima numatyti, kad kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metodą įmanoma pritaikyti įvairioms atvirkštinės transkriptazės savybėms keisti. Pavyzdžiui, evoliucinį spaudimą galima būtų panaudoti atrinkti AT mutantus, sintetinančius ilgas kDNR molekules, įveikiančius antrines struktūras žemoje temperatūroje arba į sintetinamą grandinę įtraukiančius modifikuotus nukleotidus. Taip pat galima būtų keisti ir fermento aktyvumą, tokius kaip terminalinės transferazės ar grandinės nustūmimo.

Kompartimentalizuotų ribosominių kompleksų metodas galėtų būti taikomas ne tik atvirkštinės transkriptazės, bet ir kitų nukleorūgštis modifikuojančių fermentų, pavyzdžiui DNR ir RNR ligazių, savybėms keisti. Pasinaudojus ta savybe, kad genetinė informacija koduojama mRNR, ši metodą taip pat galima būtų panaudoti įvairiomis savybėmis pasižyminčių DNazių mutantų atrankai. Ribosominių kompleksų technologija gali turėti tam tikrų apribojimų kalbant apie kitų fermentų atranką, ypač tų, kurių veikimas ne visada gali būti suderinamas su Mg^{2+} jonų buvimu reakcijos mišinyje. Nesant stabilizuojančių jonų, keturnaris kompleksas gali suirti prieš

suformuojant emulsiją, todėl esminis genotipo – fenotipo ryšys būtų prarastas. Tokiu atveju atrankos eksperimentą galima vykdyti pasitelkiant mikroskopsčių technologiją, suliejant iš anksto suformuotus lašelius, turinčius stabilų keturnarį kompleksą su lašeliais, kuriuose patalpintas substratas. Mg^{2+} jonų koncentracija galėtų būti reguliuojama naudojant chelatuojančius reagentus arba pasirenkant skirtingo dydžio lašelius ir stipriai praskiedžiant metalo jonus. Šiuo būdu ruošiant emulsiją, keturnaris kompleksas suirtų tik suliejus lašelius. Tokia galimybė kontroliuoti keturnario komplekso stabilumą ir reikiamu momentu sukelti jo disociaciją galėtų stipriai praplėsti metodo galimybes. Be to, naudojant vienodo dydžio lašelius atsiranda galimybė kontroliuoti fermento koncentraciją eksperimento metu. Tuo tarpu taikant kitokias *in vitro* kompartmentalizacija pagrįstas atrankos schemas fermento koncentraciją lašelyje reguliuoti sudėtinga, nes baltymo molekulių kiekis, susintetinamas transkripcijos – translacijos mišiniu užpildytuose kompartmentuose sunkiai kontroliuojamas.

Atvirkštinės transkriptazės yra fermentai, turintys didelę taikomąją vertę. Tai liudija įvairių kompanijų dėmesys šiems fermentams ir patentų bei sukurtų komercinių produktų gausa. Vienas iš pirmųjų tokių produktų buvo M-MuLV AT mutantas su pašalintu RNazės H domenu, gavęs pavadinimą Superscript II (217). Vėliau šis fermentas buvo patobulintas paliekant RNazės H domeną, bet panaikinus aktyvumą, įvedant keletą mutacijų šio domeno aktyviajame centre (218). Toliau tyrinėjant įvairių mutacijų įtaką M-MuLV AT biocheminėms savybėms buvo sukurti ir užpatentuoti Superscript III ir Superscript IV produktai (219), vis dėlto laikotarpis tarp pradinės ir paskutinės produkto versijos išleidimo yra daugiau nei du dešimtmečiai.

M-MuLV AT intensyviai stengėsi tobulinti ir kitos kompanijos. Tuometinės kompanijos Stratagene mokslininkai pritaikę didelės apimties patikros metodą aptiko naujų mutacijų, pagerinančių fermento termostabilumą ir procesyvumą (75). Panašiu metu M-MuLV AT mutacijų rinkinį užpatentavo ir Applied Biosystems kompanija (220), kiek vėliau New England Biolabs (221).

Bandymai tobulinti M-MuLV AT ir kitas atvirkštines transkriptazes atliekami iki šiol. Per porą pastarųjų dešimtmečių įvairių mokslininkų grupių vykdyti AT tyrimai parodė, kad pagrindinis mechanizmas, pagerinantis labiausiai pageidaujamas AT savybes (termostabilumą, procesyvumą) yra sąveikos su substratu padidėjimas (75,91,156,219). Įvairiais būdais sukurtas ir ištirtas didelis kiekis taškinių ir daugybinių mutantų suteikia daug informacijos apie M-MuLV AT ir kitų atvirkštinių transkriptazių pozicijas, kuriose įvedus pakeitimus galima tikėtis pagerinti minėtas savybes. Užduotį

palengvina ir nauja informacija apie struktūrinės baltymo ypatybes (47). Pasitelkiant šias žinias ir taikant kryptingą mutagenezę galima surasti naujų mutacijų ir jų kombinacijų, kurios reikšmingai pagerina AT savybes (222,223,224). Tokie tyrimai parodo, kad galimybės tobulinti M-MuLV AT ir panašias atvirkštines transkriptazes dar nėra išsemtos.

Šioje disertacijoje aprašomi darbai taip pat turėjo reikšmės M-MuLV AT tobulinimo lenktynėse. Atlikus termostabilių mutantų atranką aptiktas didelis rinkinys naujų iki šiol neištirtų mutacijų, kurias apjungus gauti fermentai, tinkami kDNR sintezei aukštoje temperatūroje ir pasižymintys dideliu procesyvumu, todėl galintys gaminti ilgas kDNR grandines. Dalis šių mutacijų buvo panaudotos kuriant atvirkštinės transkriptazės produktų liniją, galinčią sėkmingai konkuruoti su kitų įmonių atitinkamais produktais.

M-MuLV AT populiarumas paskatino mokslininkus ieškoti ir kitų fermentų, galinčių RNR grandinę paversti į viengrandę DNR. Atvirkštinės transkriptazės aktyvumas gamtoje nėra retas, jis aptinkamas ne tik retrovirusuose, bet ir bakterijose, archėjose ir eukariotuose. Keletas nevirusinės kilmės atvirkštinių transkriptazių taip pat tapo komerciniais produktais. Viena iš žinomiausių yra Marathon AT, kurios genas koduojamas *Eubacterium rectale* II tipo intronų sekose. Pagrindinis šio fermento bruožas yra didelis procesyvumas sąlyginai nedidelėse (37°C – 42°C) temperatūrose (212). Neseniai buvo pristatyta ir patobulinta fermento versija UltraMarathon. Deklaruojama, kad šis fermentas gali sintetinti daugiau nei 20 kb ilgio kDNR fragmentus, vykdant reakcijas 20°C - 42°C temperatūrose (225). Rinkoje yra ir termostabilių introninės kilmės atvirkštinių transkriptazių, tokių kaip NEB kompanijos produktas Induro, kurio savybė sintetinti ilgas kDNR kopijas buvo pritaikyta nanoporų tipo sekoskaitoje (226). Šie pavyzdžiai liudija, kad pastangos tobulinti atvirkštines transkriptazes nesustoja ir ieškoma vis naujesnių galimybių, stengiantis šio tipo fermentus panaudoti įvairiuose taikymuose.

Pastaruosiu metu naują postūmį atvirkštinių transkriptazių tyrimams suteikė genomo redagavimo įrankių sukūrimas ir vystymas. 2019 metais dr. Liu su kolegomis pristatė kompleksinį įrankį, sudarytą iš nikazės aktyvumą turinčio Cas9 nukleazės mutanto, sulieto su M-MuLV atvirkštine transkriptaze bei RNR, kuri nukreipia šią sistemą link taikinio genome (10). Pirmos kartos PE (*angl. Prime Editing*) kompleksas buvo sukonstruotas naudojant laukinio tipo M-MuLV atvirkštinę transkriptazę, tačiau iškart po to buvo sutelktas dėmesys į AT tobulinimą. Stengiantis padidinti M-MuLV AT sąveikos su substratu stiprumą, įvestos mutacijos (D200N, L603W, T330P), kurios aptiktos vykdant būtent šioje disertacijoje aprašytą termostabilių M-

MuLV AT mutantų atranką. Šis pokytis keletą kartų padidino PE komplekso efektyvumą. Po to įvestos dar dvi mutacijos (T306K/W313F), dėl ko redagavimo efektyvumas padidėjo 5 kartus, palyginus su pradiniu PE variantu (10). Tolimesnės PE tobulinimo pastangos buvo nukreiptos į kitus komplekso narius (227), o atvirkštinė transkriptazė išliko nepakitusi, turinti aukščiau išvardintas mutacijas. Patobulintas kompleksas, vadinamas PEmax, tapo populiariu genų redagavimo įrankiu, kurį klientams siūlo keletas kompanijų – Genscript, Intact Genomics (228,229).

Tolimesni PEmax komplekso tyrimai parodė, kad genų redagavimo efektyvumas ląstelėse gali būti prislopintas dėl mažos dNTP koncentracijos. Dėl šios priežasties buvo išbandyta M-MuLV AT su pakeistu aktyviuoju centru, įvedant mutacijas, kurios aptiktos vykdant mažose dNTP koncentracijose veikiančių mutantų atranką (Q221R, V223A, V223M), taip pat iš kitų tyrimų žinomą pakeitimą V223Y. Parodyta, kad V223M mutantas pasižymi padidintu genu redagavimo efektyvumu (11).

Atrinkti optimaliausius genų redagavimo įrankius buvo bandoma ir panaudojant *in vitro* evoliucijos metodus. Dr. Liu su kolegomis pristatė darbą, kuriame šalia kitų PE įrankių tobulinimo bandymų buvo mėginama keisti ir PE2 komplekso savybes, taikant pačių autorių anksčiau sukurtą faų raiška pagrįstos nuolatinės evoliucijos metodą (PACE) (151). Išanalizavus atrankos eksperimento metu gautus mutantus, pasižyminčius geriausiu genų redagavimo efektyvumu, nustatytos pagrindinės M-MuLV AT baltymo pozicijos, kuriose susikaupė daugiausia mutacijų. Įdomu pastebėti, kad dalis pozicijų sutampa su šioje disertacijoje aprašomomis – tai V223, priklausanti aktyvaus centro motyvui YVDD bei D200, kuri buvo ypač dažnai aptinkama vykdant termostabilių mutantų atranką. Atrinkti PE kompleksai turėjo pakeitimus V223A/M/L/E, o 200 pozicijoje esantis asparaginas (N), kuris buvo įvestas vietoje asparto rūgšties (D) konstruojant PE2 kompleksą, buvo pakeistas į N200S/Y (151). Šis panašumas tarp skirtingų atrankos eksperimentų rezultatų rodo, kad kai kurios baltymo mutacijos gali būti universalios ir turėti platesnį pritaikymą, ne tik atitikti evoliucinio spaudimo sąlygas konkrečiame eksperimente.

IŠVADOS

1. Kompartmentalizuotų ribosominių kompleksų metode naudojamo keturnario komplekso stabilumui kritiškai svarbi Mg^{2+} jonų koncentracija ir temperatūra. Mg^{2+} jonų koncentracijos ir temperatūros pokytis destabilizuoja kompleksą, todėl atrankos eksperimento sąlygomis keturnaris ribosomos, baltymo, mRNR ir tRNR kompleksas suyra labai greitai ir reakcijos prasideda realiu laiku.
2. Kontroliniame atrankos eksperimente naudojant aktyvų ir neaktyvų fermentą nustatytas 50 kartų prasiurtinimo koeficientas rodo, kad atrankos eksperimento metu mutantų biblioteka efektyviai prasiurtina aktyviais nariais.
3. Įvykdžius termostabilių M-MuLV AT mutantų atranką ir ištyrus atrinktų baltymų biochemines savybes nustatyta, kad M-MuLV AT mutantų atsparumą aukštai temperatūrai daugiausia lemia padidėjęs sąveikos su substratu stiprumas. Kai kurių mutantų atsparumą temperatūrai padidina bendras paties baltymo stabilizavimas. Taip pat atrankos metu stebimas ir RNazės H aktyvumo panaikinimas.
4. Įvykdžius Taq polimerazės buferyje efektyviai veikiančių M-MuLV AT mutantų atranką ir ištyrus atrinktų baltymų biochemines savybes nustatyta, kad padidėjusį kDNR sintezės efektyvumą lemia padidėjęs afiniškumas dNTP substratui (sumažėjusi K_m , dNTP). Atrankos metu taip pat yra stebimi kitų baltymo savybių pokyčiai – bendras paties baltymo stabilizavimas bei RNazės H aktyvumo panaikinimas arba stiprus sumažinimas.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Naowarajna N, Cheng R, Lopez J, Wong C, Qiao L, Liu P. Chemical modifications of proteins and their applications in metalloenzyme studies. *Synth Syst Biotechnol.* 2021; 6(1): p. 32-49.
2. Chandra A, Tünnermann L, Löfstedt T, Gratz R. Transformer-based deep learning for predicting protein properties in the life sciences. *Elife.* 2023; 12: p. e82819.
3. Roda S, Terholsen H, Heike JR, Cañellas-Solé A, Guallar V, Bornscheuer U, et al. AsiteDesign: a Semirational Algorithm for an Automated Enzyme Design. *J Phys Chem B.* 2023; 127(12): p. 2661-2670.
4. NobelPrize.org. [Tinkle].; 2024 [cituota 2025 10 25. pasiekama: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/press-release/>].
5. Mills D, Peterson RL, Spiegelman S. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967; 58(1): p. 217-224.
6. Yan W, Li X, Zhao D, Xie M, Li T, Lu Q, et al. Advanced strategies in high-throughput droplet screening for enzyme engineering. *Biosens Bioelectron.* 2024; 248: p. 115972.
7. Fu X, Zhang Y, Xu Q, Sun X, Meng F. Recent Advances on Sorting Methods of High-Throughput Droplet-Based Microfluidics in Enzyme Directed Evolution. *Front. Chem.* 2021; 9: p. 666867.
8. NobelPrize.org. [Tinkle].; 2018 [cituota 2025 10 25. pasiekama: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/press-release/>].
9. Li R, Kang G, Hu M, Huang H. A Potent Display Technology used for Selecting and Evolving Specific Binders with Desired Properties. *Mol Biotechnol.* 2019; 61: p. 60-71.
10. Anzalone AV, Peyton B, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019; 576: p. 149–157.
11. Liu P, Ponninselvan K, Nyalile T, Oikemus S, Joynt AT, Iyer S, et al. Increasing intracellular dNTP levels improves prime editing efficiency. *Nat Biotechnol.* 2025; 43: p. 539–544.
12. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* 1970; 226(5252): p. 1209-1211.

13. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 1970; 226(5252): p. 1211–1213.
14. NobelPrize.org. [Tinkle].; 1975 [cituota 2025 10 27. pasiekiamo: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1975/press-release/>].
15. Yeager M, Wilson-Kubalek EM, Weiner SG, Brown PO, Rein A. Supramolecular organization of immature and mature murine leukemia virus revealed by electron cryo-microscopy: Implications for retroviral assembly mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95(13): p. 7299-7304.
16. Hunter E. Viral entry and receptors. In Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p. 71-119.
17. Schultz A, Rein A. Maturation of murine leukemia virus env proteins in the absence of other viral proteins. *Virology*. 1985; 145(2): p. 335-339.
18. Pierce BA. Bacterial and viral genetic systems. In Pierce BA. *Genetics Essentials. Concepts and connections*. New York: W. H. Freeman and Company; 2013. p. 175-205.
19. Auerbach MR, Brown KR, Kaplan A, de Las Nueces D, Singh IR. A Small Loop in the Capsid Protein of Moloney Murine Leukemia. *Journal of Virology*. 2006; 80(6): p. 2884–2893.
20. Rein A, McClure MR, Rice NR, Luftig RB, Schultz AM. Myristylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by Moloney murine leukemia virus. *PNAS*. 1986; 83(19): p. 7246–7250.
21. Riffel N, Harlos K, Iourin O, Rao Z, Kingsman A, Stuart D, et al. Atomic Resolution Structure of Moloney Murine Leukemia Virus Matrix Protein and Its Relationship to Other Retroviral Matrix Proteins. *Structure*. 2002; 10(12): p. 1627–1636.
22. Johnson SF, Garcia EL, Summers MF, Telesnitsky A. Moloney murine leukemia virus genomic RNA packaged in the absence of a full complement of wild type nucleocapsid protein. *Virology*. 2012; 430(2): p. 100-109.
23. Prizan-Ravid A, Elis E, Laham-Karam N, Selig S, Ehrlich M, Bacharach E. The Gag Cleavage Product, p12, is a Functional Constituent of the Murine Leukemia Virus Pre-Integration Complex. *PLOS Pathogens*. 2010; 6(11): p. e1001183.

24. Elis E, Ehrlich M, Prizan-Ravid A, Laham-Karam N, Bacharach E. p12 Tethers the Murine Leukemia Virus Pre-integration Complex to Mitotic Chromosomes. *PLOS Pathogens*. 2012; 8(12): p. e1003103.
25. Wight DJ, Boucherit VC, Wanaguru M, Elis E, Hirst EMA, Wilson L, et al. The N-Terminus of Murine Leukaemia Virus p12 Protein Is Required for Mature Core Stability. *PLOS Pathogens*. 2014; 10(10): p. e1004474.
26. Segura-Morales C, Pescia C, Chatellard-Causse C, Sadoul R, Bertrand E, Basyuk E. Tsg101 and Alix Interact with Murine Leukemia Virus Gag and Cooperate with Nedd4 Ubiquitin Ligases during Budding. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(29): p. 27004-27012.
27. Bartusch C, Prange R. ESCRT Requirements for Murine Leukemia Virus Release. *Viruses*. 2016; 8(4): p. 103.
28. Swanstrom R, Wills JW. Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. In *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p. 263-334.
29. Lesbats P, Engelman AN, Cherepanov P. Retroviral DNA Integration. *Chemical Reviews*. 2016; 116(20): p. 12730–12757.
30. Das D, Georgiadis MM. The Crystal Structure of the Monomeric Reverse Transcriptase from Moloney Murine Leukemia Virus. *Structure*. 2004; 12(5): p. 819-829.
31. Cote ML, Roth MJ. Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase: Structural Comparison with HIV-1 Reverse Transcriptase. *Virus Research*. 2008; 134(1-2): p. 186-202.
32. Shinnick TM, Lerner RA, Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus. *Nature*. 1981; 293(5833): p. 543-548.
33. Rulli, Jr. SJ, Hibbert CS, Mirro J, Pederson T, Biswal S, Rein A. Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J. Virol*. 2007; 81(12): p. 6623–6631.
34. Gherghe C, Lombo T, Leonard CW, Datta SAK, Bess, Jr. JW, Gorelick RJ, et al. Definition of a high-affinity Gag recognition structure mediating packaging of a retroviral RNA genome. *PNAS*. 2010; 107(45): p. 19248–19253.
35. Rein A. Murine leukemia viruses: objects and organisms. *Adv virol*. 2011;: p. 2011:403419.

36. Feng YX, Yuan H, Rein A, Levin JJ. Bipartite signal for read-through suppression in murine leukemia virus mRNA: an eight-nucleotide purine-rich sequence immediately downstream of the gag termination codon followed by an RNA pseudoknot. *J. Virol.* 1992; 66(8): p. 5127-5132.
37. Elis E, Ehrlich M, Bacharach E. Dynamics and restriction of murine leukemia virus cores in mitotic and interphase cells. *Retrovirology.* 2015; 12(95).
38. Viral Zone. [Tinkle]. [Cituota 2016 11 18. pasiekiamo: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/67.html.
39. Herschorn A, Hizi A. Retroviral reverse transcriptases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67(16): p. 2717-2747.
40. Le Grice SFJ. "In the beginning": initiation of minus strand DNA synthesis in retroviruses and LTR-containing retrotransposons. *Biochemistry.* 2003; 42(49): p. 14349–14355.
41. Sarafianos SG, Das K, Tantillo C, Clark, Jr AD, Ding J, Whitcomb JM, et al. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J.* 2001; 20(6): p. 1449 - 1461.
42. Taube R, Loya S, Avidan O, Perach M, Hizi A. Reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus : expression in bacteria, purification and biochemical characterization. *Biochem. J.* 1998; 329(3): p. 579-587.
43. Perach M, Hizi A. Catalytic features of the recombinant reverse transcriptase of bovine leukemia virus expressed in bacteria. *Virology.* 1999; 259(1): p. 176 - 189.
44. Georgiadis MM, Jessen SM, Ogata CM, Telesnitsky A, Goff SP, Hendrickson WA. Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure.* 1995; 3(9): p. 879-892.
45. Najmudin S, Cote ML, Sun D, Yohannan S, Montano SP, Gu J, et al. Crystal structures of an N-terminal fragment from Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase complexed with nucleic acid: functional implications for template-primer binding to the fingers domain. *J Mol Biol.* 2000; 296(2): p. 613-632.
46. Lim D, Gregorio GG, Bingman C, Martinez-Hackert E, Hendrickson WA, Goff SP. Crystal structure of the Moloney murine leukemia virus RNase H domain. *J Virol.* 2006; 80(17): p. 8379-8389.

47. Tang X, Zhu Y, Baker SL, Bowler MW, Chen BJ, Chen C, et al. Structural basis of suppression of host translation termination by Moloney Murine Leukemia Virus. *Nature communications*. 2016; 7(12070): p. 1-10.
48. Nowak E, Potrzebowski W, Konarev PV, Rausch JW, Bona MK, Svergun DI, et al. Structural analysis of monomeric retroviral reverse transcriptase in complex with an RNA/DNA hybrid. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41(6): p. 3874–3887.
49. Zhou D, Chung S, Miller M, Le Grice SFJ, Wlodawer A. Crystal structures of the reverse transcriptase-associated ribonuclease H domain of xenotropic murine leukemia-virus related virus. *J. Struct. Biol.* 2012; 177(3): p. 638–645.
50. Karakas E, Truglio JJ, Croteau D, Rhau B, Wang L, Van Houten B, et al. Structure of the C-terminal half of UvrC reveals an RNase H endonuclease domain with an Argonaute-like catalytic triad. *EMBO J.* 2007; 26(2): p. 613-622.
51. Champoux JJ, Schultz SJ. Ribonuclease H: properties, substrate specificity, and roles in retroviral reverse transcription. *FEBS J.* 2009; 276(6): p. 1506-1516.
52. Tanese N, Goff SP. Domain structure of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mutational analysis and separate expression of the DNA polymerase and RNase H activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85(6): p. 1777–1781.
53. Telesnitsky A, Blain SW, Goff SP. Defects in Moloney murine leukemia virus replication caused by a reverse transcriptase mutation modeled on the structure of *Escherichia coli* RNase H. *J Virol.* 1992; 66(2): p. 615-622.
54. Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science.* 1998; 282(5394): p. 1669-75.
55. Paulson BA, Zhang M, Schultz SJ, Champoux JJ. Substitution of alanine for tyrosine-64 in the fingers subdomain of M-MuLV reverse transcriptase impairs strand displacement synthesis and blocks viral replication in vivo. *Virology.* 2007; 366(2): p. 361-76.
56. Winshell J, Champoux JJ. Structural alterations in the DNA ahead of the primer terminus during displacement synthesis by reverse transcriptases. *J. Mol. Biol.* 2001; 306(5): p. 931-43.

57. Talele TT, Upadhyay A, Pandey VN. Influence of the RNase H domain of retroviral reverse transcriptases on the metal specificity and substrate selection of their polymerase domains. *Virology*. 2009; 6(1): p. 159.
58. Kaushik N, Chowdhury K, Pandey VN, Modak MJ. Valine of the YVDD motif of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: role in the fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry*. 2000; 39(17): p. 5155-5165.
59. Kaushik N, Singh K, Alluru I, Modak MJ. Tyrosine 222, a member of the YXDD motif of MuLV RT, is catalytically essential and is a major component of the fidelity center. *Biochemistry*. 1999; 38(9): p. 2617-2627.
60. Gao G, Orlova M, Georgiadis MM, Hendrickson WA, Goff SP. Conferring RNA polymerase activity to a DNA polymerase: a single residue in reverse transcriptase controls substrate selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1997; 94(2): p. 407-411.
61. Schmidt WM, Mueller MW. CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27(21): p. e31.
62. Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M. Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Sci Rep*. 2017; 7(41769): p. 1-10.
63. Zilionis R, Nainys J, Veres A, Savova V, Zemmour D, Klein AM, et al. Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics. *Nat Protoc*. 2017; 12(1): p. 44-47.
64. Jia E, Shi H, Wang Y, Zhou Y, Liu Z, Pan M, et al. Optimization of library preparation based on SMART for ultralow RNA-seq in mice brain tissues. *BMC Genomics*. 2021; 22(1): p. 809.
65. Bagnoli JW, Ziegenhain C, Janjic A, Wange LE, Vieth B, Parekh S, et al. Sensitive and powerful single-cell RNA sequencing using mcSCRBS-seq. *Nat Commun*. 2018; 1(2937): p. 9.
66. Gerard GF, Potter JR, Smith MD, Rosenthal K, Dhariwal G, Lee J, et al. The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(14): p. 3118-3129.
67. Chursov A, Kopetzky SJ, Bocharov G, Frishman D, Schneider A. RNAtips: analysis of temperature-induced changes of RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res*. 2013;(12): p. 486-491.

68. Chowdhury S, Ragaz C, Kreuger E, Narberhaus F. Temperature-controlled structural alterations of an RNA thermometer. *J Biol Chem.* 2003; 278(48): p. 47915-47921.
69. Draper DE. A guide to ions and RNA structure. *RNA.* 2004; 10(3): p. 335-343.
70. Ganji M, Docter M, Le Grice SFJ, Abbondanzieri EA. DNA binding proteins explore multiple local configurations during docking via rapid rebinding. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(17): p. 8376–8384.
71. Moser MJ, DiFrancesco RA, Gowda K, Klingele AJ, Sugar DR, Stocki S, et al. Thermostable DNA polymerase from a viral metagenome is a potent RT-PCR enzyme. *PLoS One.* 2012; 7(6): p. e38371.
72. Kong H, Kucera RB, Jack WE. Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(3): p. 1965-1975.
73. Bedford E, Tabor S, Richardson CC. The thioredoxin binding domain of bacteriophage T7 DNA polymerase confers processivity on *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94(2): p. 479-484.
74. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Enzymes: basic concepts and kinetics. In *Biochemistry*, 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. p. 348-351.
75. Arezi B, Hogrefe H. Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(2): p. 473-481.
76. Skasko M, Weiss KK, Reynolds HM, Jamburuthugoda V, Lee K, Kim B. Mechanistic differences in RNA-dependent DNA polymerization and fidelity between murine leukemia virus and HIV-1 reverse transcriptases. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(13): p. 12190-12200.
77. Kopp EB, Miglietta JJ, Shrutkowski AJ, Shih CK, Grob PM, Skoog MT. Steady state kinetics and inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by a non-nucleoside dipyridodiazipinone, BI-RG-587, using a heteropolymeric template. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(11): p. 3035 - 3039.
78. Driscoll MD, Rentergent J, Hay S. A quantitative fluorescence-based steady-state assay of DNA polymerase. *FEBS J.* 2014; 281(8): p. 2042-2050.

79. Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J. Virol.* 2010; 84(19): p. 9733–9748.
80. Menendez-Arias L. Mutation rates and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases. *Viruses.* 2009; 1(3): p. 1137-1165.
81. Achuthan V, Keith BJ, Connolly BA, DeStefano JJ. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase displays dramatically higher fidelity under physiological magnesium conditions in vitro. *J. Virol.* 2014; 88(15): p. 8514-8527.
82. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(23): p. 9530-9535.
83. Ellefson JW, Gollihar J, Shroff R, Shivram H, Iyer VR, Ellington AD. Synthetic evolutionary origin of a proofreading reverse transcriptase. *Science.* 2016; 352(6293): p. 1590-1593.
84. Hwang CK, Svarovskaia ES, Pathak VK. Dynamic copy choice: steady state between murine leukemia virus polymerase and polymerase-dependent RNase H activity determines frequency of in vivo template switching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(21): p. 12209-12214.
85. Kelleher CD, Champoux JJ. Characterization of RNA strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(16): p. 9976-9986.
86. Schultz SJ, Champoux JJ. RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus Res.* 2008; 134(1-2): p. 86-103.
87. Schultz SJ, Zhang M, Kelleher CD, Champoux JJ. Analysis of plus-strand primer selection, removal, and reutilization by retroviral reverse transcriptases. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(41): p. 32299 - 32309.
88. Schultz SJ, Zhang M, Champoux JJ. Sequence, distance, and accessibility are determinants of 5'-end-directed cleavages by retroviral RNases H. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(4): p. 1943-1955.
89. Jung U, Jiang X, Kaufmann SHE, Patzel V. A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA. *RNA.* 2013; 19(12): p. 1864-1873.
90. Schultz SJ, Champoux JJ. RNase H domain of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase retains activity but requires the polymerase domain for specificity. *J. Virol.* 1996; 70(12): p. 8630-8630.

91. Yasukawa K, Nemoto D, Inouye K. Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *J. Biochem.* 2008; 143(2): p. 261 - 268.
92. Celej MS, Montich GG, Fidelio GD. Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. *Protein Sci.* 2003; 12(7): p. 1496-1506.
93. Chen T, Romesberg FE. Directed polymerase evolution. *FEBS Lett.* 2014; 588(2): p. 219-229.
94. Coluzza I. Computational protein design: a review. *J Phys Condens Matter.* 2017; 29(14): p. 143001.
95. Huang S, Boyken SE, Baker D. The coming of age of de novo protein design. *Nature.* 2016; 537(7620): p. 320-327.
96. Alley EC, Khimulya G, Biswas S, AlQuraish M, Church GM. Unified rational protein engineering with sequence-based deep representation learning. *Nat Methods.* 2019; 16(12): p. 1315-1322.
97. Joyce GF. Forty Years of In Vitro Evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007; 46(34): p. 6420-6436.
98. Matsuura T, Yomo T. In vitro evolution of proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 2006; 101(6): p. 449-456.
99. Leemhuis H, Stein V, Griffiths AD, Hollfelder F. New genotype–phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005; 15(4): p. 472-478.
100. Griffiths AD, Tawfik DS. Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends Biotechnol.* 2006; 24(9): p. 395-402.
101. Packer MS, Liu DR. Methods for the directed evolution of proteins. *Net. Rev. Genet.* 2015; 16(7): p. 379-394.
102. Aharoni A, Griffiths AD, Tawfik DS. High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr Opin Chem Biol.* 2005; 9(2): p. 210-216.
103. Chandran A, Syed J, Taylor RD, Kashiwazaki G, Sato S, Hashiya K, et al. Deciphering the genomic targets of alkylating polyamide conjugates using high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(9): p. 4014 - 4024.
104. Lai YP, Huang j, Wang LF, Li J, Wu ZR. A new approach to random mutagenesis in vitro. *Biotechnol Bioeng.* 2004; 86(6): p. 622-627.

105. Myers RM, Lerman LS, Maniatis T. A general method for saturation mutagenesis of cloned DNA fragments. *Science*. 1985; 229(4710): p. 242-247.
106. Bridges BA, Woodgate R. Mutagenic repair in *Escherichia coli*: products of the *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(12): p. 4193 - 4197.
107. Greener A, Callahan M, Jerpseth B. An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Methods Mol Biol*. 1996; 57: p. 375-385.
108. Cadwell CR, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl*. 1992; 2(1): p. 28-33.
109. Zacco M, Williams DM, Brown DM, Gherardi E. An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *J Mol Biol*. 1996; 255(4): p. 589-603.
110. Gupta RD, Tawfik DS. Directed enzyme evolution via small and effective neutral drift libraries. *Nat. Methods*. 2008; 5(11): p. 939-942.
111. Wells JA, Vasser M, Powers DB. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene*. 1985; 34(2-3): p. 315-323.
112. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter CJ, Hutchison III CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*. 2009; 6(5): p. 343-345.
113. Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc*. 2011; 6(2): p. 242-251.
114. Lehmann M, Pasamontes L, Lassen SF, Wyss M. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1543(2): p. 408-415.
115. Chen F, Gaucher EA, Leal NA, Hutter D, Havemann SA, Govindarajan S, et al. Reconstructed evolutionary adaptive paths give polymerases accepting reversible terminators for sequencing and SNP detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(5): p. 1948-1953.
116. Wijma HJ, Floor RJ, Jekel PA, Baker D, Marrink SJ, Janssen DB. Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization. *Protein Eng Des Sel*. 2014; 27(2): p. 49-58.

117. Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*. 1994; 370(6488): p. 389-391.
118. Coco WM, Levinson WE, Crist MJ, Hektor HJ, Darzins A, Pienkos PT, et al. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat Biotechnol*. 2001; 19(4): p. 354-359.
119. Müller KM, Stebel SC, Knall S, Zipf G, Bernauer HS, Arndt KM. Nucleotide exchange and excision technology (NExT) DNA shuffling: a robust method for DNA fragmentation and directed evolution. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(13): p. e117.
120. Zhao H, Giver L, Shao Z, Affholter JA, Arnold FH. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol*. 1998; 16(3): p. 258-261.
121. Ostermeier M, Shim JH, Benkovic SJ. A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat Biotechnol*. 1999; 17(12): p. 1205-1209.
122. Voigt CA, Martinez C, Wang ZG, Mayo SL, Arnold FH. Protein building blocks preserved by recombination. *Nat Struct Biol*. 2002; 9(7): p. 553-558.
123. Mastrobattista E, Taly V, Chanudet E, Treacy P, Kelly BT, Griffiths AD. High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. *Chem Biol*. 2005; 12(12): p. 1291-1300.
124. Gielen F, Hours R, Emond S, Fischlechner M, Schell U, Hollfelder F. Ultrahigh-throughput-directed enzyme evolution by absorbance-activated droplet sorting (AADS). *PNAS*. 2016; 113(47): p. 7383-7389.
125. Zurek PJ, Hours R, Schell U, Pushpanathb A, Hollfelder F. Growth amplification in ultrahigh-throughput microdroplet screening increases sensitivity of clonal enzyme assays and minimizes phenotypic variation. *Lab Chip*. 2021; 21(1): p. 163-173.
126. Goto H, Kanai Y, Yotsui A, Shimokihara S, Shitara S, Oyo R, et al. Microfluidic screening system based on boron-doped diamond electrodes and dielectrophoretic sorting for directed evolution of NAD(P)-dependent oxidoreductases. *Lab Chip*. 2020; 20(4): p. 852-861.
127. Suzuki M, Baskin D, Hood L, Loeb LA. Random mutagenesis of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: concordance of immutable sites in vivo with the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(18): p. 9670-9675.

128. Chelliserrykattil J, Ellington AD. Evolution of a T7 RNA polymerase variant that transcribes 2'-O-methyl RNA. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(9): p. 1155-1160.
129. Söte S, Kleine S, Schlicke M, Brakmann S. Directed evolution of an error-prone T7 DNA polymerase that attenuates viral replication. *Chembiochem.* 2011; 12(10): p. 1551-1558.
130. Smith GP, Petrenko VA. Phage display. *Chem Rev.* 1997; 97: p. 391-410.
131. Ren ZJ, Lewis GK, Wingfield PT, Locke EG, Steven AC, Black LW. Phage display of intact domains at high copy number: a system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. *Protein Sci.* 1996; 5(9): p. 1833-1843.
132. Sternberg N, Hoess RH. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(5): p. 1609-1613.
133. Fernandez-Gacio A, Uguen M, Fastrez J. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol.* 2003; 21(9): p. 408-414.
134. Holmberg RC, Henry AA, Romesberg FE. Directed evolution of novel polymerases. *Biomol Eng.* 2005; 22: p. 39-49.
135. Fa M, Radeghieri A, Henry AA, Romesberg FE. Expanding the substrate repertoire of a DNA polymerase by directed evolution. *J Am Chem Soc.* 2004; 126(6): p. 1748-1754.
136. Xia G, Chen L, Sera T, Fa M, Schultz PG, Romesberg FE. Directed evolution of novel polymerase activities: mutation of a DNA polymerase into an efficient RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(10): p. 6597-6602.
137. Andreas P. Ribosome display: a perspective. *Methods Mol Biol.* 2012; 805: p. 3-28.
138. Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(10): p. 4937-4942.
139. Plückthun A. Ribosome display: a perspective. *Methods Mol Biol.* 2012; 805: p. 3-28.
140. Odegrip R, Coomber D, Eldridge B, Hederer R, Kuhlman PA, Ullman C, et al. CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(9): p. 2806-2810.

141. Roberts RW, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(23): p. 12297-12302.
142. Takahashi K, Sunohara M, Terai T, Kumachi S, Nemoto N. Enhanced mRNA-protein fusion efficiency of a single-domain antibody by selection of mRNA display with additional random sequences in the terminal translated regions. *Biophys Physicobiol*. 2017; 14: p. 23-28.
143. Barendt PA, Ng DTW, McQuade CN, Sarkar CA. Streamlined Protocol for mRNA Display. *ACS Comb Sci*. 2013; 15(2): p. 77-81.
144. Ghadessy FJ, Ong JL, Holliger P. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(8): p. 4552-4557.
145. Ramsay N, Jemth AS, Brown A, Crampton N, Dear P, Holliger P. CyDNA: synthesis and replication of highly Cy-dye substituted DNA by an evolved polymerase. *J Am Chem Soc*. 2010; 132(14): p. 5096-5104.
146. Meyer AJ, Ellefson JW, Ellington AD. Directed Evolution of a Panel of Orthogonal T7 RNA Polymerase Variants for in Vivo or in Vitro Synthetic Circuitry. *ACS Synth Biol*. 2015; 4(10): p. 1070-1076.
147. Ellefson JW, Meyer AJ, Hughes RA, Cannon JR, Brodbelt JS, Ellington AD. Directed evolution of genetic parts and circuits by compartmentalized partnered replication. *Nat Biotechnol*. 2014; 32(1): p. 97-101.
148. Toprak E, Veres A, Michel JB, Chait R, Hartl DL, Kishony R. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet*. 2012; 44(1): p. 101 - 105.
149. Wright MC, Joyce GF. Continuous in vitro evolution of catalytic function. *Science*. 1997; 276(5312): p. 614 - 617.
150. Esvelt KM, Carlson JC, Liu DR. A system for the continuous directed evolution of biomolecules. *Nature*. 2011; 472(7344): p. 499-503.
151. Doman JL, Pandey S, Neugebauer ME, An M, Davis JR, Randolph PB, et al. Phage-assisted evolution and protein engineering yield compact, efficient prime editors. *Cell*. 2023; 186(18): p. 3983-4002.
152. Riechmann L, Holliger P. The C-Terminal Domain of TolA Is the Coreceptor for Filamentous Phage Infection of *E. coli*. *Cell*. 1997; 90(2): p. 351-360.

153. Packer MS, Rees HA, Liu DR. Phage-assisted continuous evolution of proteases with altered substrate specificity. *Nat Commun.* 2017; 8(1): p. 956.
154. DeStefano JJ, Buiser RG, Mallaber LM, Fay PJ, Bambara RA. Parameters that influence processive synthesis and site-specific termination by human immunodeficiency virus reverse transcriptase on RNA and DNA templates. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1131(3): p. 270-280.
155. Klarmann GJ, Schaubert CA, Preston BD. Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences in vitro. *J Biol Chem.* 1993; 268(13): p. 9793-9802.
156. Yasukawa K, Mizuno M, Konishi A, Inouye K. Increase in Thermal Stability of Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase by Site-directed Mutagenesis. *J Biotechnol.* 2010; 150(3): p. 299-306.
157. Konishi A, Hisayoshi T, Yokokawa K, Barrioluengo V, Menéndez-Arias L, Yasukawa K. Amino acid substitutions away from the RNase H catalytic site increase the thermal stability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase through RNase H inactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 454(2): p. 269-274.
158. Baba M, Kakue R, Leucht C, Rasor P, Walch H, Ladiges D, et al. Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination. *Protein Eng Des Sel.* 2017; 30(8): p. 551-557.
159. Arezi B, McCarthy M, Hogrefe H. Mutant of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase exhibits higher resistance to common RT-qPCR inhibitors. *Anal Biochem.* 2010; 400(2): p. 301-303.
160. Ong JL, Loakes D, Jaroslowski S, Too K, Holliger P. Directed evolution of DNA polymerase, RNA polymerase and reverse transcriptase activity in a single polypeptide. *J Mol Biol.* 2006; 361(3): p. 537-550.
161. Houlihan G, Arangundy-Franklin S, Porebski T, Subramanian N, Taylor A, Holliger P. Discovery and evolution of RNA and XNA reverse transcriptase function and fidelity. *Nat Chem.* 2020; 12(8): p. 683–690.
162. Skirgaila R, Pudžaitis V, Palikša S, Vaitkevičius M, Janulaitis A. Compartmentalization of destabilized enzyme–mRNA–ribosome complexes generated by ribosome display: a novel tool for the directed evolution of enzymes. *Protein Eng Des Sel.* 2013; 26(7): p. 453-461.

163. Sarkar G, Sommer SS. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*. 1990; 8(4): p. 404-407.
164. Smolarsky M, Tal M. Novel method for measuring polyuridylic acid binding to ribosomes. *Biochim Biophys Acta*. 1970; 199(2): p. 447-452.
165. Ghadessy FJ, Holliger P. A novel emulsion mixture for in vitro compartmentalization of transcription and translation in the rabbit reticulocyte system. *Protein Eng Des Sel*. 2004; 17(3): p. 201-204.
166. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq — a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015; 31(2): p. 166-169.
167. Shatsky M, Nussinov R, Wolfson HJ. A method for simultaneous alignment of multiple protein structures. *Proteins*. 2004; 56(1): p. 143-156.
168. Nowotny M, Gaidamakov SA, Ghirlando R, Cerritelli SM, Crouch RJ, Yang W. Structure of Human RNase H1 complexed with an RNA/DNA hybrid: insight into HIV reverse transcription. *Mol Cell*. 2007; 28(2): p. 264-276.
169. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993; 234(3): p. 779-815.
170. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*. 2010; 5(4): p. 725-738.
171. Goodwin KD, Lewis MA, Tanious FA, Tidwell RR, Wilson DW, Georgiadis MM, et al. A high-throughput, high-resolution strategy for the study of site-selective DNA binding agents: analysis of a "highly twisted" benzimidazole-diamidine. *J Am Chem Soc*. 2006; 128(24): p. 7846-7854.
172. Ren J, Bird LE, Chamberlain PP, Stewart-Jones GB, Stuart DI, Stammers DK. Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(22): p. 14410-14415.
173. Ren J, Esnouf R, Garman E, Somers D, Ross C, Kirby I, et al. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat Struct Biol*. 1995; 2(4): p. 293-302.
174. Das K, Bauman JD, Clark Jr AD, Frenkel YV, Lewi PJ, Shatkin AJ, et al. High-resolution structures of HIV-1 reverse transcriptase/TMC278

- complexes: Strategic flexibility explains potency against resistance mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(5): p. 1466-1471.
175. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024; 630: p. 493-500.
 176. Chandler DP, Wagnon CA, Bolton HJ. Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(2): p. 669-677.
 177. Sellner LN, Coelen R, Mackenzie JS. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20(7): p. 1487-1490.
 178. Suslov O, Steindler DA. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(20): p. e181.
 179. Sigel H. Isomeric equilibria in complexes of adenosine 5'-triphosphate with divalent metal ions. *Eur J Biochem*. 1987; 165(1): p. 65-72.
 180. Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol*. 2011; 6: p. 26.
 181. Singh K, Kaushik N, Jin J, Madhusudanan M, Modak MJ. Role of Q190 of MuLV RT in ddNTP resistance and fidelity of DNA synthesis: a molecular model of interactions with substrates. *Protein Eng*. 2000; 13(9): p. 635-643.
 182. Potter RJ, Lee JE, Smith MD, Dhariwal G, Gerard GF, Rosenthal K, inventors; Thermostable reverse transcriptases and uses thereof. US patent WO/2004/024749. 2004 Mar 25.
 183. Chen L, Setterquist R, Latham G, inventors; Recombinant reverse transcriptases. US patent US20050232934. 2005 Oct 20.
 184. Hogrefe H, Arezi B, Xing W, inventors; Mutant reverse transcriptase and methods of use. WO patent WO2007022045. 2007 Feb 22.
 185. Liu S, Goff SP, Gao G. Gln84 of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase regulates the incorporation rates of ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *FEBS Lett*. 2006; 580(5): p. 1497-1501.
 186. Heller RC, Chung S, Crissy K, Dumas K, Schuster D, Schoenfeld TW. Engineering of a thermostable viral polymerase using metagenome-

- derived diversity for highly sensitive and specific RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(7): p. 3619–3630.
187. Schultz SJ, Zhang M, Kelleher CD, Champoux JJ. Polypurine tract primer generation and utilization by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *J Biol Chem.* 1999; 274(49): p. 34547-34555.
188. Wu L, Huang MH, Zhao JL, Yang MS, Wang P. Study of MMLV RT-Binding with DNA using Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005; 37(9): p. 634-642.
189. Ndongwe TP, Adedeji AO, Michailidis E, Ong YT, Hachiya A, Marchand B, et al. Biochemical, inhibition and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(1): p. 345–359.
190. Halvas EK, Svarovskaia ES, Pathak VK. Development of an in vivo assay to identify structural determinants in murine leukemia virus reverse transcriptase important for fidelity. *J Virol.* 2000; 74(1): p. 312-319.
191. Halvas EK, Svarovskaia ES, Freed EO, Pathak VK. Wild-type and YMDD mutant murine leukemia virus reverse transcriptases are resistant to 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *J Virol.* 2000; 74(14): p. 6669-6674.
192. Baranauskas A, Paliksa S, Alzbutas G, Vaitkevicius M, Lubiene J, Letukiene V, et al. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Eng Des Sel.* 2012; 25(10): p. 657-668.
193. Radzvilavicius T, Lagunavicius A. Selective inactivation of M-MuLV RT RNase H activity by site-directed PEGylation: an improved ability to synthesize long cDNA molecules. *N Biotechnol.* 2012; 29(3): p. 285-292.
194. Lim D, Orlova M, Goff SP. Mutations of the RNase H C helix of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase reveal defects in polypurine tract recognition. *J Virol.* 2002; 76(16): p. 8360-8373.
195. Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol.* 1997; 8(1): p. 61-77.
196. Yasukawa K, Iida K, Okano H, Hidese R, Baba M, Yanagihara I, et al. Next-generation sequencing-based analysis of reverse transcriptase fidelity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 492(2): p. 147-153.

197. Blank A, Gallant JA, Burgess RR, Loeb LA. An RNA polymerase mutant with reduced accuracy of chain elongation. *Biochemistry*. 1986; 25(20): p. 5920-5928.
198. Imashimizu M, Oshima T, Lubkowska L, Kashlev. Direct assessment of transcription fidelity by high-resolution RNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(19): p. 9090-9104.
199. Huang J, Brieba LG, Sousa R. Misincorporation by Wild-Type and Mutant T7 RNA Polymerases: Identification of Interactions That Reduce Misincorporation Rates by Stabilizing the Catalytically Incompetent Open Conformation. *Biochemistry*. 2000; 39(38): p. 11571-11580.
200. Palikša S, Alzbutas G, Skirgaila R. Decreased Km to dNTPs is an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption required to perform efficient cDNA synthesis in One-Step RT-PCR assay. *Protein Eng Des Sel*. 2018; 31(3): p. 79-89.
201. Agresti A, Coull BA. Approximate Is Better than "Exact" for Interval Estimation of Binomial Proportions. *Am Stat*. 1998; 52(2): p. 119-126.
202. Kalle E, Kubista M, Rensing C. Multi-template polymerase chain reaction. *Biomol Detect Quantif*. 2014; 2: p. 11-29.
203. Potapov V, Ong JL. Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. *PLoS One*. 2017; 12(1): p. e0169774.
204. Sakaguchi M, Matsuzaki M, Niimiya K, Seino J, Sugahara Y, Kawakita M. Role of Proline Residues in Conferring Thermostability on Aqualysin I. *J Biochem*. 2007; 141(2): p. 213-220.
205. Prajapati RS, Das M, Sreeramulu S, Sirajuddin M, Srinivasan S, Krishnamurthy V, et al. Thermodynamic effects of proline introduction on protein stability. *Proteins*. 2007; 66(2): p. 480-491.
206. Abbondanzieri EA, Bokinsky G, Rausch JW, Zhang JX, Le Grice SFJ, Zhuang. Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase. *Nature*. 2008; 453(7192): p. 184-189.
207. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24(18): p. 3546-3551.
208. Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl*. 1991; 1(1): p. 17-24.

209. Boyer PL, Gao HQ, Frank P, Clark PK, Hughes SH. The Basic Loop of the RNase H Domain of MLV RT Is Important Both for RNase H and for Polymerase Activity. *Virology*. 2001; 282(1): p. 206-213.
210. Sharma PL, Nurpeisov V, Schinazi FR. Retrovirus reverse transcriptases containing a modified YXDD motif. *Antivir Chem Chemother*. 2005; 16(3): p. 169-182.
211. Baluda MA, Reddy EP. Anatomy of an integrated avian myeloblastosis provirus: structure and function. *Oncogene*. 1994; 9(10): p. 2761-2774.
212. Zhao C, Liu F, Pyle AM. An ultraprocessive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron. *RNA*. 2018; 24(2): p. 183-195.
213. Wang JY, Hoel CM, Al-Shayeb B, Banfield JF, Brohawn SG, Doudna JA. Structural coordination between active sites of a CRISPR reverse transcriptase-integrase complex. *Nat Commun*. 2021; 12(1): p. 2571.
214. Svarovskaia ES, Delviks KA, Hwang CK, Pathak VK. Structural determinants of murine leukemia virus reverse transcriptase that affect the frequency of template switching. *J Virol*. 2000; 74(15): p. 7171-7178.
215. Wang R, Belew AT, Achuthan V, Sayed NE, DeStefano JJ. Physiological magnesium concentrations increase fidelity of diverse reverse transcriptases from HIV-1, HIV-2, and foamy virus, but not MuLV or AMV. *J Gen Virol*. 2021; 102(12).
216. Diamond TL, Roshal M, Jamburuthugoda VK, Reynolds HM, Merriam AR, Lee KY, et al. Macrophage tropism of HIV-1 depends upon efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase. *J Biol Chem*. 2004; 279(49): p. 51545–51553.
217. Kotewicz ML, Gerard GF, inventors; Cloned genes encoding reverse transcriptase lacking RNase H activity. United States patent 5,244,797. 1993 Sep 14.
218. Potter RJ, Rosenthal K, inventors; High fidelity reverse transcriptases and uses thereof. United States patent US 7,056,716 B2. 2006 Jun 06.
219. Rogers J, Potter J, inventors; Reverse transcriptases for use in high temperature nucleic acid synthesis. United States patent US 9,663,770 B2. 2017 May 30.
220. Chen L, Setterquist RA, Latham GJ, inventors; Recombinant reverse transcriptases. United States patent US 7,595,179 B2. 2009 Sep 29.

221. Xu Y, Ong J, Guan S, Nichols N, inventors; Mutant reverse transcriptase. United States patent US 9,580,698 B1. 2017 Feb 28.
222. Yang Y, Li Z, Zhang J, Qi H. Engineering thermostable friend mouse leukemia virus reverse transcriptase through mutational combination. *Biochem Biophys Res Commun.* 2025; 760: p. 151716.
223. Yang Y, Zhang J, Li Z, Qi H. Enhancing thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase through greedy combination of multiple mutant residues. *Bioresour Bioprocess.* 2025; 12(1): p. 12.
224. Divbandi M, Yamchi A, Nikoo HR, Moradi A, Tabarraei A. Expression of thermostable MMLV reverse transcriptase in *Escherichia coli* by directed mutation. *AMB Express.* 2024; 14(11): p. 113.
225. newswire.com. [Tinkle].; 2024 [cituota 2025 11 04. pasiekiamas: <https://www.newswire.com/news/rnaconnect-launches-ultramarathonrt-an-ultra-processive-next-22340482>.
226. Zeglinski K, Montellese C, Ritchie ME, Alhamdoosh M, Vonarburg C, Bowden R, et al. An optimized protocol for quality control of gene therapy vectors using nanopore direct RNA sequencing. *Genome Res.* 2024; 34(11): p. 1966-1975.
227. Nelson JW, Randolph PB, Shen SB, Everette KA, Chen PJ, Anzalone AV, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat Biotechnol.* 2022; 40(3): p. 402-410.
228. genscript.com. [Tinkle]. [cituota 2025 11 04. pasiekiamas: <https://www.genscript.com/enzyme/RC00005-PEmax.html>.
229. intactgenomics.com. [Tinkle]. [cituota 2025 11 04. pasiekiamas: <https://intactgenomics.com/product/pemax-enzyme/>.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti darbo vadovui dr. Remigijui Skirgailai už galimybę dirbti jo vadovaujamoje grupėje ir tobulėti vykdant baltymų *in vitro* evoliucijos tyrimus. Ačiū už įkvėpimą mokytis, už perduotas žinias ir patirtį, patarimus ir idėjas bei nuoširdžią ir geranorišką pagalbą vykdant tyrimus, juos publikuojant ir ruošiant šią disertaciją.

Ačiū buvusiems bendradarbiams iš mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centro, ypač Renatai, Ramunei, Dangirai, Audrai, Aurimui, Tadiui, Gediminui už draugišką atmosferą, diskusijas moksliniais ir gyvenimiškais klausimais ir visus gražius prisiminimus.

Dėkoju moksliniam konsultantui dr. Giedriui Sasnauskui už vadovavimą studijuojant Biotechnologijos institute ir prof. Arvydui Janulaičiui už paskatinimą studijuoti doktorantūroje.

Dėkoju Thermo Fisher Scientific Baltics įmonei už galimybę vykdyti mokslinius tyrimus ir juos publikuoti. Dėkoju kolegoms iš UAB “Diagnolita” už draugišką palaikymą ir optimizmą.

Dėkoju savo mokytojams ir dėstytojams už jų kasdienį pasiaukojantį ir kantrų darbą. Ačiū draugams ir šeimai, ypač Laurutei, už palaikymą ir supratimą.

SUMMARY

ABBREVIATIONS

[3H]-dTMP	–	Tritium-labeled thymidine monophosphate
AMV	–	Avian Myeloblastosis Virus
cpm	–	Counts per minute
CRD	–	Compartmentalized Ribosome Display
CSR	–	Compartmentalized Self-Replication
FIV	–	Feline Immunodeficiency Virus
FLV	–	Feline Leukemia Virus
HIV	–	Human Immunodeficiency Virus
K_m	–	Michaelis constant
M-MuLV	–	Moloney Murine Leukemia Virus
Ni-NTA	–	Nickel-nitrilotriacetic acid
RMSD	–	Root Mean Square Deviation
RNase H	–	Ribonuclease H
RT	–	Reverse transcriptase
SD	–	Standard deviation
SDS-PAGE	–	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SIV	–	Simian Immunodeficiency Virus
TC	–	Ternary complex
UMI	–	Unique molecular identifier
WT	–	Wild type

INTRODUCTION

Reverse transcriptase (RT) is a retroviral RNA-dependent DNA polymerase that has a crucial role in the multiplication of viruses. The RT transforms viral ssRNA into dsDNA using RNA-dependent DNA polymerase, DNA-dependent DNA polymerase, and RNase H activities. Since its discovery in 1970, the reverse transcription reaction has gained significant importance in modern molecular biology. The combination of reverse transcription and quantitative or endpoint PCR enables the detection of low copies of RNA in biological samples. The copy DNA (cDNA) generated by RTs is used for cloning, gene expression analysis, and next-generation sequencing (1).

Many techniques of present-day biology require enzymes to function under conditions far or distinct from natural ones. The knowledge of the structure-function relationship of proteins and particular enzymes enables targeted protein engineering called ‘rational design’, which is used to alter a specific enzyme's behavior and force it to perform in a desired manner.

However, this approach is information-demanding since a high-resolution 3D structure of the enzyme is typically necessary to make a reasonable guess about which amino acids need to be changed. In addition, a deep understanding of kinetic parameters and mechanistic data is required to alter the enzyme properties successfully. In contrast to the rational design, directed evolution is an approach that is used to change the properties of the enzymes even without preliminary knowledge of the protein structure and the catalysis mechanism. The ability of biomolecules to evolve by mimicking Darwinian evolution was introduced by Spiegelman and colleagues (2). In the five decades since the first experiment, researchers have demonstrated many successful examples of protein *in vitro* evolution. Several methodologies of directed evolution have been demonstrated using DNA polymerases. An *in vivo* assay, known as the genetic complementation assay, was developed to select the active variants of *Thermus aquaticus* DNA (Taq DNA) polymerase, HIV RT, and T7 DNA polymerase (3,4,5). However, the complementation assay is limited, especially when selecting the polymerases that incorporate unusual substrates. For this purpose, Holliger and colleagues introduced a new technique, the compartmentalized self-replication assay (CSR), and used this approach to alter the properties of a DNA polymerase (6). In this method, a library of polymerase-encoding genes is cloned and expressed in *Escherichia coli*, and the cells are encapsulated in a water-in-oil emulsion. Compartmentalization ensures an essential relationship between the mutated polymerase (‘phenotype’) and the gene encoding that mutant (‘genotype’). An

evolutionary pressure, such as increased temperature or inhibitor concentration, is applied, and the selection of the most suitable protein is performed *in vitro*. Various display systems, e.g., a phage display and a cell display, in which the mutant protein library is expressed on the cell's surface or the coat of a filamentous phage, could also be used for *in vitro* evolution of polymerases. Romesberg and colleagues employed the phage display technique to broaden the substrate spectra of the DNA polymerase and convert the DNA polymerase into RNA polymerase (7). The main disadvantage of CSR and phage or cell display is the transformation step, which significantly restricts the library size. This particular issue could be solved using molecular display techniques, which are believed to be the most powerful tools suitable for changing the properties of proteins. A ribosome display, mRNA display, and CIS display are carried out entirely *in vitro* and could be used to explore much larger libraries compared to other methods, where the mutant protein synthesis occurs *in vivo* (8). Molecular display methods have been successfully employed to increase the affinity of binding proteins and peptides, especially antibodies. However, the adaptation of these techniques for the *in vitro* evolution of enzymes, particularly DNA polymerases, is limited.

An *in vitro* evolution method based on a ribosome display was developed a decade ago in the R&D laboratory of Thermo Fisher Scientific Baltics (legacy Fermentas). This assay enables the alteration of the catalytic properties of enzymes. This has been achieved by the *in vitro* compartmentalization of the enzyme–mRNA–ribosome ternary complex (TC) in the water-in-oil emulsion, which ensures a free intermolecular interaction between the enzyme and substrate after dissociation of TC and preserves the connection between the phenotype and the genotype (Fig.1). In contrast to the other molecular display techniques, the compartmentalized ribosome display (CRD) is suitable for *in vitro* evolution of multiple enzymatic properties in a desirable environment (9).

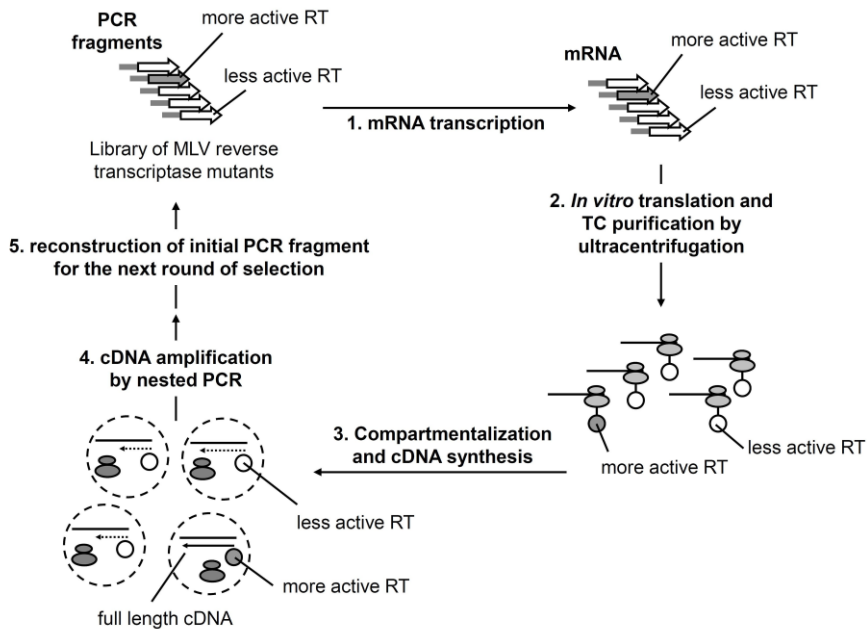


Fig. 1. The schematic representation of the CRD selection procedure: (1) the PCR fragments encoding the mutant library of M-MuLV RT are transcribed *in vitro*; (2) synthesized mRNAs are translated *in vitro*. The TCs of the enzyme–mRNA–ribosome are formed in the translation mixture and stabilized by low temperature (+4°C) and 50 mM concentration of Mg²⁺ ions. The mixture of TCs is purified by ultracentrifugation on sucrose cushions; (3) the precipitated TCs are dissolved in the ice-cold buffer containing 50 mM Mg²⁺ and added to a reverse transcription reaction mix, supplemented with the external dNTP set and a primer for cDNA synthesis; (4) the ice-cold RT reaction mixture is emulsified in such a way that every compartment (~10¹⁰ water-in-oil compartments ~2 μm in size) on average contains no more than one TC. The emulsion temperature is raised, and TCs dissociate. Only the active mutant enzyme molecules synthesize full-length cDNA encoding them; (5) A PCR is used to amplify the full-length cDNA, and the initial CRD construct is restored.

The CRD process begins with a translation of the mRNA library and the formation of TC. The TC is stabilized by low temperature and high concentration of Mg²⁺ ions (10), followed by purification using ultracentrifugation. The purified TC is dissolved, added to a particular reaction mixture, and emulsified to obtain the water-in-oil compartments. Compartmentalized TC dissociates after the temperature of the emulsion is

raised, and active thermostable enzyme molecules are released to reverse transcribe and synthesize the full-length cDNA that encodes them. Subsequently, the cDNA is amplified using a PCR to generate a mutant library for the next selection round (9).

Every selection method has its features; among them, the enrichment factor is one of the most important. In the first stage of this research, characterization of the CSR method was performed by analyzing the thermal stability of the TC and the detection of the enrichment factor by running one round of selection using the gene library, which consists only of the wild-type reverse transcriptase gene and the truncated gene, encoding the inactive enzyme. The aforementioned proof-of-principle experiment showed an approximate enrichment factor of 50.

Later, a mutant library of M-MuLV RT was constructed, and five selection rounds were performed, increasing the RT reaction temperature with every subsequent selection round. During this experiment, a final pool of thermostable M-MuLV RT mutants was selected, and tens of mutations associated with the increased thermal stability of the enzyme were identified. After that, various biochemical properties of the selected multiple mutant RT variants, as well as constructed point and combinatorial mutants, were examined. The analysis showed that mutations selected during the experiment were associated with increased protein–DNA binding affinity and, as a consequence, processivity of the DNA synthesis.

The second evolution experiment was conducted to select M-MuLV RT mutants that can synthesize cDNA faster and more efficiently compared to the wild-type enzyme. The selection was performed by placing the RT mutant library into a Taq DNA polymerase buffer for PCR and shortening the reverse transcription reaction time with every selection round.

The optimal buffer for M-MuLV RT contains up to 1 mM concentration of each dNTP and 5 mM concentration of Mg^{2+} ions. In contrast, the Taq DNA polymerase buffer contains only 0,2 mM of each dNTP and 1,5 mM of Mg^{2+} ions. Thus, the buffer in the selection experiment was relatively poor regarding substrate for DNA synthesis. This selection experiment resulted in a set of M-MuLV RT mutants having substitutions near the active center. Mutant variants of the RTs containing the substitutions mentioned above exhibit a 4-5 fold decrease in K_m for dNTPs, as shown by kinetic experiments.

Taking together the results of the two selection experiments, the biochemical analysis of the selected enzyme variants is the key to explaining the most intriguing question, how the enzyme has survived the evolutionary pressure during the CRD-driven selection process.

THE AIM AND THE TASKS

This work aimed to perform the directed evolution of M-MuLV reverse transcriptase using a novel CRD technique and to explore the link between the evolutionary pressure generated in the experiment and the properties of the selected enzymes. The following tasks were set:

1. To investigate the properties of the CRD method by determining the enrichment factor and the stability of the ternary complex under various conditions.
2. To carry out the selection of thermostable M-MuLV RT mutants and investigate their properties.
3. To carry out the selection of M-MuLV RT mutants active at low dNTP substrate concentrations and investigate their properties.

SCIENTIFIC NOVELTY

A novel compartmentalized ribosome display method, developed in the R&D center of Thermo Fisher Scientific Baltics, was used in this work for the directed evolution of the M-MuLV RT. This method encompasses well-known strategies of the ribosome display as well as the compartmentalization technique, which serves for the retention of the phenotype–genotype linkage.

The first experiment was carried out by increasing the reverse transcription reaction temperature stepwise. As a result, a collection of thermostable mutants with a number of previously unknown M-MuLV RT mutations that enable cDNA synthesis at elevated temperatures was identified. Detailed biochemical analysis revealed that the thermostability of the mutants is associated with tighter substrate binding. The most prominent mutations were selected when designing the new generation of commercial reverse transcriptases.

The second directed evolution experiment was built by shortening the reverse transcription reaction time. Additionally, the reaction mixture containing a low dNTP concentration was used. After seven rounds of selection, a group of mutants with an altered active center motif was found. Biochemical analysis showed that the K_m value of the selected mutant RTs decreased significantly compared to the wild-type enzyme. The results of this *in vitro* evolution experiment were in surprising agreement with the process of natural evolution because the active center of oncoretroviral RT was rendered to resemble the active center of the lentiviral RT. Additionally, this experiment proves that the kinetic properties of the enzyme could be changed using the CRD technique.

Other research groups have used the results of this study. Recently, a new type of genome editing method emerged, using a complex consisting of a Cas9 endonuclease mutant fused to a reverse transcriptase along with a prime editing guide RNA. Initially, the prime editing complex was constructed using the wild-type M-MuLV RT. Later on, some of the mutations described in this dissertation were introduced into the M-MuLV RT to achieve a tighter binding to the substrate. This change resulted in increased efficiency of the second-generation prime editing complex (11). Furthermore, some active center mutations were inserted into the M-MuLV RT. As a result, the efficiency of genome editing in particular cell types, having low dNTP levels, increased (12). The examples above highlight the value of the research presented in this dissertation.

METHODS

Plasmid construction

The initial plasmid pET_his_MLV_pD was constructed in the pET type plasmid with the modified T7 polymerase promoter and Shine-Dalgarno sequence region by inserting the M-MuLV reverse transcriptase coding sequence with the N-terminal His-tag and a fusion with glycine-serine linker, part of protein D from phage lambda and a second glycine-serine (gs) linker at the C terminus. A deletant plasmid was constructed by digesting the initial plasmid with the restriction endonuclease XmaJI and removing a gene fragment of 171 bp. The digested plasmid was self-ligated, yielding a plasmid pET_his_del_pD with the reverse transcriptase gene shorter by 171 nucleotides or exactly 57 amino acids (without the disruption of the original protein translation frame), encoding an inactivated enzyme (9).

Preparation of mRNA for *in vitro* translation

PCR fragments encoding the wt and deletant M-MuLV RT's were synthesized using pro-pIVEX 5'-GCGAGCCCGATCTTCCCCATCG-3' and pD-ter 5'-AAGAAGACACGATCCACCG-3' primers and the corresponding plasmid. The amplification was performed using Taq DNA polymerase in the presence of 8 % DMSO (Sigma). The transcription was performed for 3 h at 37°C using 20 µl of the unpurified PCR product per 100 µl of the reaction mixture, containing 1x T7 transcription buffer (200 mM HEPES-KOH pH 7,6 at 25°C, 30 mM Mg acetate, 2 mM spermidine, 40 mM DTT) with 7 mM of each NTP, 80 U of RiboLock RNase inhibitor and 80 U of T7 RNA polymerase. After the reaction, 100 µl of the ice-cold nuclease-free water and 200 µl of 6 M LiCl solution were added. The mixture was incubated for 30 min at +4 °C and centrifuged for 30 min at +4 °C in a cooling centrifuge at maximal speed (25000 g). The RNA pellet was washed with 500 µl of ice-cold 75% ethanol and centrifuged again for 5 min (+4 °C) at 25000 g, the supernatant was discarded. The RNA pellet was dried for 12 min at room temperature and resuspended in 200 µl of nuclease-free ice-cold water. The tubes were centrifuged again for 5 min at +4°C. 180 µl of the supernatant was transferred to a new tube with 20 µl of 10x DNase I buffer with Mg²⁺, 1 U DNaseI (Thermo Fisher Scientific), and incubated for 20 min at +37°C. RNA was precipitated by adding 20 µl of 3 M Sodium acetate, pH 5.0 at 25°C, and 500 µl of ice-cold 96% ethanol, incubating for 30 min at -20 °C, and centrifugation for 30 min (+4 °C) at 25000 g. The supernatant was discarded,

and the RNA pellet was washed, dried, and resuspended in water as described above. The concentration of mRNA was measured spectrophotometrically, confirmed using agarose gel electrophoresis (9).

cDNA amplification and PCR fragment recovery

The first PCR was performed using RD_Nde 5'-CTTTA AGAAAGAGGAGAAATTACATATG-3' and pD_55 5'-GCCGGG CGCGGTTG-3' primers. The second PCR was performed using M_Esp 5'-ATCGTCTCCCATGGGCATGACCCTAAATATAGAAGATGAG-3' and M_Eri 5'-AATGAATTCATTAATTAAGCGGGAATTGGGTG-3' for the whole gene amplification in every selection round. The final PCR fragment of the selection sample was agarose-gel purified using a gel extraction kit (Qiagen), digested with EcoRI and Esp3I, and again agarose-gel purified. The recovered MLV reverse transcriptase library was ligated with the START (244 bp) and the END (398 bp) fragments to restore the PCR fragment suitable for the CRD selection, as described (9).

Preparation of mutant M-MuLV reverse transcriptase library

The mutagenic PCR (30 cycles; 100 μ l) was performed using pET_his_MLV_pD plasmid (~150 ng), M_Esp, M_Eri primers ($T_{an}=55^{\circ}\text{C}$), 100 nM dPTP (TriLink BioTechnologies), 5 μ M 8-oxo-dGTP (TriLink BioTechnologies), and 2 u Taq DNA Polymerase. The PCR fragment was purified using a Qiagen PCR purification kit, digested with Esp3I, EcoRI, and finally purified from the agarose gel using a Qiagen Gel extraction kit, giving a DNA concentration of ~50 ng/ μ l. The mutagenesis efficiency and the library quality were assessed by sequencing the individual clones, subcloned back into the original pET_his_MLV_pD plasmid, and digested with NcoI and EcoRI. The mutated library was ligated with the START (244 bp) and the END (398 bp) fragments to get a PCR fragment suitable for the CRD selection. The reaction mixture contained (150 μ l): 1x ligation buffer, 15 u of T4 DNA Ligase, ~1300 ng of the mutated library digested with Esp3I and EcoRI (~ 5.9×10^{11} molecules); ~330 ng of the START fragment (NcoI end) (~ 1.2×10^{12} molecules), ~550 ng of the END fragment (EcoRI end) (~ 1.2×10^{12} molecules). The ligation reaction was carried out overnight at +4 $^{\circ}\text{C}$, then treated once with phenol and twice with chloroform, precipitated, and dissolved in 53 μ l of water. The approximate ligation yield of ~20 % (data not shown) was determined by comparing the amplification efficiency of the ligation mixture and the known amount of the plasmid pET_his_MLV_pD. Considering the 20% of the ligation yield, the diversity of the MLV RT

mutants library was defined as $\sim 1.2 \times 10^{11}$ molecules. The ligated M-MuLV RT library was amplified for 15 cycles in 1 ml of PCR mixture (Taq buffer with KCl, 20 U Taq DNA Polymerase, 8 % DMSO (Sigma), pro-pIVEX and pD-ter primers ($T_{an}=53^{\circ}\text{C}$) and 20 μl (out of 50 μl) of the ligated M-MuLV RT library, $\sim 5 \times 10^{10}$ molecules). The mutant library was amplified ~ 200 times to produce $\sim 30 \mu\text{g}$ of PCR product (2702 bp in length), which was then used directly for the *in vitro* transcription. The quality of the library was evaluated by sequencing of 10 randomly picked clones. As expected, the mutations were distributed randomly all over the amplified gene sequence. Among the 10 sequenced genes, 23 nucleotide mutations (20 transitions, 1 transversion, 2 deletions) were found, giving 15 amino acid changes, 5 silent mutations, 1 STOP codon, and 2 frameshift mutations – on average 1.5 amino acid substitutions per gene.

Sequencing of the M-MuLV RT mutant genes

The genes encoding the M-MuLV RT mutant proteins, obtained after the last selection round, were amplified by the nested PCR using M_Esp and M_Hind3+ 5'-CGGATCAAGCTTAATTAATTAAGCGGGAATTGGG TG-3' primers ($T_{an}=53^{\circ}\text{C}$). The synthesized PCR fragment was purified from the agarose gel using a Qiagen gel extraction kit, subsequently digested with HindIII and Esp3I for 1 hr at 37 $^{\circ}\text{C}$, and again purified from the agarose gel. The recovered M-MuLV reverse transcriptase library after the 5th selection round was ligated into the plasmid vector prepared from the pET_his_MLV_pD digested with NcoI and HindIII, giving a new plasmid, pET_his_MLV (7474 bp), encoding the M-MuLV reverse transcriptase without the pD fusion on the C terminus, but with the N-terminal his-tag used for affinity purification. The ligated M-MuLV reverse transcriptase library was electroporated into the T7 expression strain ER2566. The individual clones were sequenced using a capillary sequencer and analyzed.

Construction of the single and multiple M-MuLV RT mutants

Single and double mutations were introduced into the M-MuLV RT gene using the megaprimer method (13). The first PCR was performed to generate a gene fragment containing the specific mutation. Afterwards, the generated fragment serves as a megaprimer for the second PCR, enabling the amplification of a gene with the desirable mutation. Usually, 25–30 cycles of PCR were performed in 100 μl volume using 2U of Phusion Hot-Start II High-Fidelity DNA polymerase in Phusion HF buffer, containing 0.25 mM of dNTPs, 0.4 μM of forward and reverse primer each (during the first PCR), or

0.02 μM of megaprimer and 0.4 μM of reverse primer (during the second PCR).

Protein purification

The genes of all M-MuLV reverse transcriptase variants, along with the wt protein encoding gene, were cloned into the pET21b plasmid, containing N-terminal His-tag for affinity purification (Novagen). The reverse transcriptases were expressed in *E. coli* ER2566 cells and purified using affinity chromatography (Ni-NTA Superflow resin; Qiagen) as described (14). RT mutant enzymes intended for the detailed biochemical analysis experiments were additionally purified using ion exchange (P11 resin; Whatman) chromatography as described (14). Protein concentrations were determined using Bradford reagent and BSA standard. The homogeneity of the purified proteins was >90%, as judged by SDS-PAGE.

RT activity measurement

The reverse transcriptase activity of the purified enzymes was determined using poly(rA)/oligo(dT)₁₂₋₁₈ substrate, incubating reaction mixtures for 10 min at 37°C, as described (14). Additionally, the enzymatic activity of the thermostable mutants was measured at 50°C. The specific activity of reverse transcriptases was obtained by dividing reverse transcriptase activity by the total protein concentration.

cDNA synthesis at different temperatures

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) and its control RNA of 1.1 kb with a 3'-poly(A) tail, in combination with the oligo(dT)₁₈ primer, was used to check the ability of the purified reverse transcriptases to synthesize cDNA at different temperatures. cDNA was synthesized using the kit's components and following the provided protocol with only some minor modifications (the reverse transcription reactions were performed in a 96-well PCR plate in Eppendorf Mastercycler gradient PCR machine, applying the temperature gradient from 41.9 °C to 62.1 °C, without 5 min preincubation at 37 °C). The synthesized cDNA was analyzed using alkaline agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

cDNA synthesis reaction rate

The reaction rates were determined by measuring the [3H]-dTTP incorporation rate on a 28 nt DNA primer / 1.3 kb RNA template. The reactions were carried out in the RT buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C),

50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT) containing 200 nM primer-template, 1 mM of each dNTP, 1 μM 2.805 TBq/mmol [3H]-dTTP (PerkinElmer) and 10 nM enzyme at either 37° or 50°C. After 0, 8, 15, 30, 60, 120, 240, and 300 min of incubation, aliquots were taken from the reaction mixture and stopped by the addition of an ice-cold EDTA to a final concentration of 20 mM. The incorporation of [3H]-dTMP into the polynucleotide fraction was measured, and the amount of incorporated dTMP was calculated by comparing the radioactivity of the DE-81-bound cDNA to the radioactivity of the reaction mixture. The total number of incorporated nucleotides was determined by considering the sequence of the 1.3 kb RNA used as a template and plotted as a function of time. The initial velocity values were determined from the slope of the linear part of the graph.

Stability evaluation of ribosome-mRNA-reverse transcriptase ternary complexes

Synthesis and purification of tritium-labeled mRNA

The M-MuLV reverse transcriptase encoding mRNA was synthesized *in vitro* under the following conditions: 200 mM HEPES-KOH (pH 7,6 at 25°C) buffer, 30 mM magnesium acetate, 40 mM DTT, 2 mM spermidine, 7 mM of each NTP, 1 U/μl of Ribolock ribonuclease inhibitor (Thermo Fisher Scientific), 0,8 U/μl of T7 RNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), and 10 ng/μl of DNA fragment encoding the wt RT in the presence of 180 μCi of 2,5',8 - ³H Adenosine 5' - triphosphate (GE Healthcare, 295,2 Ci/mmol). The transcription reaction was carried out at 37°C for 3 hours. The radioactive mRNA was precipitated using 3 M LiCl and washed with 75% ethanol. The pellet was suspended in water, and DNase I was applied to digest the residual DNA template. Additional purification of mRNA was carried out using ethanol precipitation. The concentration of mRNA was determined spectrophotometrically and confirmed by gel analysis. The specific radioactivity of the RNA transcript was 704000 cpm/μg.

Synthesis and purification of ternary complexes

The *in vitro* translation reaction was performed in 25 μl total volume, using all the necessary components from the Roche RTS100, *E. coli* HY kit in the presence of 25 U of Ribolock (Thermo Fisher Scientific), 10 mM DTT, 200 μM of *assrA* oligo and 1,2 μg (~10¹² molecules) of mRNA, radioactive or non-radioactive, lacking a STOP codon. The reaction was carried out for 20 minutes at 30°C and stopped by adding 155 μl of ice-cold stopping buffer WBK₅₀₀ (50 mM Tris-acetate pH 7.5 at 25°C; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-

acetate; 500 mM KCl) with 10 mM DTT, 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma). The ternary complexes were purified by ultracentrifugation at 100'000 rpm for 9 min at +4 °C (TL-100 ultracentrifuge; TLA100.2 fixed angle rotor; transparent 1 ml ultracentrifugation tubes; all from Beckman) using 35% sucrose solution in buffer WBK₅₀₀+DTT+triton and dissolved in 30 µl of the same WBK₅₀₀+DTT+triton buffer.

Measurement of a ternary complex dissociation

To reduce the nonspecific binding of RNA to the leaflets of a nitrocellulose membrane (Protran BA 85; Schleicher & Schuell), the leaflets were treated with 0,5 M NaOH for 30 min and washed with an excess of nuclease-free water (15). Dissociation of the ternary complex was measured using 1x RT buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3 at 25°C, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT) supplied with 1 mM of each dNTP or using 1x Taq buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,8 at 25°C, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,08% Nonidet P40) supplied with 0,2 mM of each dNTP. The nitrocellulose membrane leaflets were equilibrated against the appropriate buffer in the presence of 10 ng/µl of yeast tRNA (Roche). The reaction mixtures, containing 1 µl of radioactive ternary complex solution (~8x10⁹ molecules) in 50 µl of RT or Taq buffer supplied with dNTPs, were incubated at different temperatures for varying reaction times. After incubation, the ribosomal complex dissociation was stopped by chilling the reaction tubes on ice and adding MgCl₂ to a final 50 mM concentration. Furthermore, unlabeled yeast tRNA (Roche) was added to the final concentration of 50 ng/µl to reduce the nonspecific binding of RNA to the nitrocellulose filter. Stopped reaction mixtures were filtered through the nitrocellulose leaflets using the laboratory vacuum pump. The leaflets were additionally washed with 200 µl of RT or Taq buffer supplemented with MgCl₂ to 50 mM concentration. Later, the leaflets were dried, and the radioactivity of each leaflet was measured.

Preparations of emulsions and cDNA synthesis

The reverse transcription reaction (50 µl volume) was held in RT buffer or Taq polymerase buffer, supplemented with RiboLock RNase inhibitor to 1U/µl concentration, pD_42 (5'-TTACGGCTGGAGGTG-3') primer to 1 mM concentration and 0,3 µl (2,7x10⁹ molecules) of TC. The oil-surfactant mixture for emulsification was prepared by mixing ABIL EM 90 (Goldschmidt) into mineral oil (Sigma) to a final concentration of 4% (v/v) (6). The emulsions were prepared at +4°C in 5 ml cryogenic vials (Corning) by mixing 950 µl of oil-surfactant mixture with 50 µl of RT reaction mix. The

RT mix was added in 10 µl aliquots every 30 s, continued mixing for two more minutes (total mixing time 4 min). This procedure generates 10¹⁰ water-in-oil compartments with one TC per 3-4 compartments. During the selection of the thermostable mutants, reverse transcription was performed for 1 h by increasing the temperature from 42°C to 60°C. Reactions were stopped by cooling the mixture to +4°C. During selection in the Taq buffer, reverse transcription was performed at 42°C by decreasing the reaction time from 1h to 5 min. Reactions were stopped by cooling the mixture to +4°C and adding EDTA to 50 mM final concentration.

Isolation of cDNA

After the cDNA synthesis, emulsions were moved to 1,5 ml tubes, centrifuged for 1 min at room temperature and at 25000 x g speed. The oil phase was removed, leaving a concentrated but still intact emulsion at the bottom of the tube, and 250 µl of binding buffer (PCR purification kit, Thermo Fisher Scientific) were added. Finally, the emulsions were broken by extracting them with 0,9 ml water-saturated ether, 0,9 ml water-saturated ethyl acetate, and again, 0,9 ml water-saturated ether. The water phase was dried for 5 minutes under vacuum at room temperature.

The synthesized cDNA was purified with a PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific) and eluted in 30 µl of elution buffer.

Fidelity analysis

Fidelity comparison of the thermostable multiple mutant mut5 and wild type enzyme was performed by synthesis of 1.3 kb cDNA from GAPDH mRNA at 37°C and 50°C, conversion of cDNA into double-stranded DNA (RevertAid Premium Double-Stranded cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific), cloning of the resultant DNA into the pJET1.2/blunt cloning vector (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific) and sequencing of the individual clones (15347 nucleotides in total were sequenced for the wt enzyme and 21437 nucleotides for the mut5 mutant).

The fidelity of the M-MuLV RT mutants obtained after selection in the Taq reaction buffer was measured using the massive parallel sequencing approach, as described (16). Briefly, control RNA was purified from *E. coli* JM109 cells, a DNA primer was annealed to the RNA, and cDNA was synthesized in a Taq reaction buffer. cDNA was quantified using qPCR and prepared for sequencing by adding unique molecular identifiers (UMIs). Sequencing was performed using the Ion PGM™ Sequencing 200 Kit V2, Ion 316™ Chip V2, and Ion PGM system, as specified by the manufacturer. Only

the reads that passed platform QC requirements and had an expected length of 14nt bases before the template matching region were used for analysis. A mutation in a read was analyzed only if the base calling quality at a position site was ≥ 20 . At least three reads with identical 14 nt length random sequence barcodes were required to be grouped into a valid read family. A mutation was considered to be of the enzyme origin and included in fidelity analysis only if it was present in all members of the family. The shortest length of the family members was used for analysis. The corresponding error rate was calculated by summing up the counts of mutations and the lengths of all read families.

Thermostability measurement of the M-MuLV RT mutants

The stability of RT mutants was determined by measuring the residual activity of the enzymes at 37°C after preincubation at 50°C in the presence of the template–primer substrate. The reaction mixture containing RT (1.85 ng/10 ml, 2.4 nM) and poly(rA)/oligo(dT)18 substrate (6 mM) in the RT reaction buffer (50 mM Tris–HCl (pH 8.3 at 25°C), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT) was incubated at 50°C. The aliquots of 10 ml were taken after 0, 8, 15, 30, 60, 120, 240 and 300 min and mixed with an equal volume of additional reaction mixture (RT buffer supplemented with 6 mM poly rA/oligo dT18, 0.5 mM dTTP and 0.365 μ M 0.555 TBq/mmol [3H]-dTTP) preincubated at 37°C. The reaction was carried out for 20 min at 37°C and stopped by adding 5 ml of ice-cold 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The activity units were determined by measuring the [3H]-dTMP incorporation into a polynucleotide fraction adsorbed on DE–81 filter paper (Whatman). The dependencies of the residual activity on the preincubation time were plotted using the Prism 4 program (GraphPad Software Inc.). The thermal inactivation rates k_{inact} were determined by fitting single exponentials to the experimental data. The thermal inactivation half-life values $t_{1/2}$ were calculated from the ratio $\ln(2)/k_{\text{inact}}$.

Measurement of the DNA/RNA substrate binding

The RNA oligonucleotide 5'-CGGGAUACCGUCCAGCGACAUUCU UCCUCGGUACAUAUUCUCCUUUGG-3' was labeled using T4 polynucleotide kinase (Thermo Fisher Scientific) and [γ -³²P]-ATP (6000 Ci/mmol; Perkin Elmer) and annealed with a 1.2 - fold excess of the complementary DNA oligonucleotide 5'-CCAAAGGAGATTATGTACC GAGGAAGAATGTCGCTG-3' in 50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C or 8.8 at 25°C), 10 mM EDTA, 20 mM KCl. The RTs were diluted with the dilution

buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.2% Triton X-100 or 1x Taq buffer without MgCl₂), mixed with the radiolabeled primer-template substrate in 20 µl of the binding buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 50 mM KCl, 10 mM DTT or 1x Taq buffer without MgCl₂) supplemented with 10 % glycerol and incubated for 30 min at room temperature. Free and protein-bound RNA-DNA heteroduplexes were separated on the 8% non-denaturing polyacrylamide gels. Radiolabeled bands were detected using a Typhoon Trio imager (GE Healthcare) and quantified using TotalLab software. The equilibrium dissociation constants (K_d) were determined by fitting equation $[E\cdot S] = \{K_D + [E]_0 + [S]_0 - [(K_D + [E]_0 + [S]_0)^2 - 4 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0]^{0.5}\} / 2$ to the experimental data. [E]₀ and [S]₀ are total enzyme and template-primer concentrations, respectively, and [E·S] is the concentration of the enzyme-substrate complex.

Measurement of the DNA synthesis effectivity

When measuring the cDNA synthesis using thermostable mutants, the RNA/DNA substrate was prepared by mixing 1 µg of 1.1 kb or 7.5 kb target RNA and 1 µl of 100 mM oligo(dT)₁₈ or 0.1 µl of 100 mM Eco31Irev 5'-CACGCTCACCGGCTCCAGAT-3' oligonucleotide, respectively. The mixture was supplemented with 2 µl of 10 mM dNTP mix and nuclease-free water to a final volume of 13.5 µl, heated at 65°C for 5 min, and placed in a cold rack. After that, RT buffer (final composition 50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 50 mM KCl, 10 mM DTT, 4 mM MgCl₂) and RiboLock RNase Inhibitor to 1 U/µl were added. RTs were diluted in the dilution buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.2% Triton X-100) to a 100 µl concentration. 2 µl (200 U) of each enzyme were added to 20 µl of the reaction mixture. Reactions were performed in the Mastercycler gradient PCR machine (Eppendorf) under a wide range of temperatures (37–69°C) for 1 h. The reactions were stopped by adding 4 µl of 6x alkaline electrophoresis loading buffer (180 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18% Ficoll 400, 0.05% bromocresol green) and incubated at 80°C for 10 min, chilled on ice, and loaded onto a 1% alkaline agarose gel. Electrophoresis was performed, and the gel was stained in ethidium bromide solution and visualized.

After the selection experiment in 1x Taq buffer, cDNA synthesis of the M-MuLV mutants was performed by annealing 2 µg of 7.5 kb RNA and 1 µl of 10µM Eco31Irev oligonucleotide along with 0.4 µl of 10 mM dNTPs in 15.3 µl of 1× Taq buffer without MgCl₂. The mixture was heated at 65°C for 5 min, placed in a cold rack (+4°C) for 10 min, and supplemented with 3.7 µl of 1× Taq buffer with RNase inhibitor (Thermo Scientific), MgCl₂ to a final

concentration of 1.5 mM, and 1 U/ μ l of RNase inhibitor. RTs were diluted in 1 \times Taq buffer without MgCl₂ to 100 U/ μ l, and 1 μ l of each enzyme was added to the final reaction volume of 20 μ l. Synthesis of cDNA was performed at 42°C in a water bath and stopped after 10, 20, 30, 40, and 60 min by adding 4 μ l of 6 \times alkaline electrophoresis buffer (180 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18% Ficoll 400, and 0.05% bromocresol green). The reaction products were analyzed as described above.

Processivity measurement

The processivity of the thermostable point mutants was measured as follows: 100 nM 5'-FAM-labeled primer FAMECO (5'-CACG CTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG GGCCGA-3') was annealed to the synthetic 7.5 kb RNA (200 nM) in the annealing buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 40 mM KCl, and 1 mM EDTA). The enzyme (10 nM) was preincubated for 30 min at room temperature with the substrate (2 nM) in 10 μ l of the reaction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 50 mM KCl, and 10 mM DTT) supplemented with dNTPs to a final concentration of 1 mM. The reactions were started by adding 40 μ l of the reaction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 50 mM KCl, 10 mM DTT and 5 mM MgCl₂ supplemented with a trap (8 mg/ml poly(A) RNA and 0.32 mg/ml oligo(dT)₁₈), incubated at 37°C for 30, 40, 50 or 60 min and stopped by adding EDTA to 100 mM. The control experiments were performed by adding the enzyme to the reaction mixture containing both the substrate and the trap and incubating the mixture at 37°C for 60 min. The synthesized cDNA was released from the RNA-cDNA-RT complex by treating the reaction mixture with proteinase K (0.5 mg/ml) in the presence of 3 M urea. After 3 h at 37°C, proteinase K was inactivated by heating at 65°C for 30 min, followed by phenol-chloroform extraction. The reaction products were ethanol-precipitated and dissolved in 10 μ l of nuclease-free water. One microliter of reaction products was mixed with 0.24 μ l of GeneScan 500 ROX size standard (Applied Biosystems) and 9 μ l of formamide. DNA fragments were fractionated using a sequence analyzer (Applied Biosystems) and analyzed with ABI PRISM GeneMapper Software version 3.0. The peaks with a signal level above the background were integrated to obtain the intensity at each position, and the product length for each position was determined by applying the amplified fragment length polymorphism analysis pattern. The processivity was calculated using the equation $P = \sum(L_n \times I_n)/P(I_n)$, where L_n is the length and I_n is the intensity of each analyzed cDNA fragment.

When measuring the processivity of the multiple thermostable mutants, DNA primer Eco31Irev was 5'-labeled using T4 PNK and [γ - ^{33}P]ATP and annealed to the 7.5 kb synthetic RNA, yielding the radiolabeled primer-template substrate. Reactions were performed as above; the products were analyzed by alkaline agarose gel electrophoresis along with the 5'- ^{33}P phosphorylated DNA size markers. The DNA fragments in dried gels were visualized by a phosphoimager. The approximate fragment lengths and intensities required for processivity determination were quantified using TotalLab software.

The substrate for the processivity measurement of the mutants, selected in 1x Taq buffer, was prepared by annealing the DNA oligonucleotide to synthetic RNA as described above with minor modifications in annealing buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 40 mM KCl and 1 mM EDTA). The RTs were diluted to 125 nM concentration using 1xTaq buffer (without MgCl_2) and preincubated for 30 min at room temperature with 25 nM substrate in 10 μl of 1xTaq buffer without MgCl_2 , supplemented with 0.5 mM of each dNTP. The reactions were started by adding 15 μl of 1x Taq buffer with 2.5 mM MgCl_2 (final concentration after mixing 1.5 mM), along with a trap, as described above. Reactions were incubated at 42°C for 30, 40, 50, and 60 min and stopped by adding EDTA solution to 20 mM. The reaction products were fractionated using a sequence analyzer, and the average length of the product was calculated.

Kinetic analysis of the polymerase reaction

The substrate for kinetic analysis was prepared by annealing 5-FAM labeled oligonucleotide FAMGAPDH (1 μM) to 1.3 kb GAPDH RNA (1.5 μM) in the annealing buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 40 mM KCl, and 0.2 mM EDTA). The RTs were diluted in 1x Taq buffer without MgCl_2 (10 mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C, 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40). Prior to the reactions, the mutant enzymes (1 μM) were preincubated with the RNA/DNA substrate (40 nM) along with the variable concentrations of dNTPs (20 μM , 8 μM , 3.2 μM , and 1.28 μM of each dNTP) in 1x Taq buffer without MgCl_2 for 5 min at 37°C. The reactions were started by adding MgCl_2 to a 1.5 mM concentration and terminated by adding EDTA solution to a 20 mM concentration after 1–12 min of incubation. For cDNA analysis, 0.5 μl of the reaction products was mixed with 0.5 μl of GeneScan LIZ1200 size standard (Applied Biosystems) and 9.5 μl of formamide. The DNA fragments were fractionated using a sequence analyzer ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (POP7, 50 cm, Applied Biosystems) and analyzed with ABI PRISM GeneMapper Software version

3.0. The peaks with a signal level above the background were integrated to obtain the intensity at each position, and the product length for each position was determined by applying the amplified fragment length polymorphism analysis pattern. The average length of the reaction product was calculated using the equation $P = \Sigma(L_n \times I_n) / \Sigma(I_n)$, where L_n is the length and I_n is the intensity of each analyzed cDNA fragment. The amount and the concentration of incorporated dNTPs were calculated from the average reaction product. The K_m and V_{max} values were estimated by fitting the Q4 kinetic data to Eadie–Hofstee plots, and k_{cat} was calculated by dividing $V_{max} / [E]_{total}$.

Measurement of RNase H activity

To measure the RNase H activity of M-MuLV RT, the enzymes were diluted with 1× Taq buffer (without $MgCl_2$) to a concentration of Q5 0.2 mg/ml. About 5 μ l of reaction substrate (240 mM [3H] – poly(A):poly(dT) (1:2)) was mixed with 1 mg of the enzyme and incubated for 20 min at 37°C in 50 μ l of 1× Taq buffer, supplemented with 1.5 mM $MgCl_2$. The reactions were stopped by placing the tubes on ice and adding 50 μ l of BSA (10 mg/ml) and 100 μ l of 10% trichloroacetic acid (Sigma) to precipitate all proteins and nucleic acids. Reaction mixtures were incubated on ice for an additional 10 min and centrifuged for 10 min at 12000× g. About 100 μ l of the supernatant containing the acid-soluble fraction were taken for radioactivity measurements. The RNase H activity of RTs was calculated, considering that 1 U of the enzyme hydrolyzes 1 nmol of RNA in 3H-labeled poly(A):poly(dT) substrate to acid-soluble material in 20 min at 37°C.

Data analysis

Nonlinear regression for dissociation constant and kinetic analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc.). The results from repeated experiments are presented as the average value \pm 1SD unless otherwise noted.

The model of the full-length M-MuLV reverse transcriptase

The model of the full-length RNase H domain was produced using the PDB structures 2hb5 and 2qk9 (17,18) as templates. The structural superposition was performed using the MultiProt server (19). The superposition was done at 3 Å resolution by considering the sequence order. After visual examination of the superimposed structures, it was decided to use the 2hb5 structure with excluded H96-I104 residues and the C-helical region comprising the residues from A93 to I239 from the 2qk9 structure for further modeling. 300 model

structures were generated using the MODELLER 9.9 program (20) with default parameters for the automodel class. The model having the lowest DOPE score was selected for further work. The initial full-length M-MuLV RT model was generated using the I-Tasser server (21) (version available on the 23rd of August, 2011), using the PDB structure 2fjw:A as a template (22). I-Tasser modeling engine additionally used the M-MuLV RT structures 1rw3:A (23) and 1mml:A (24), and the HIV reverse transcriptase structures 1mu2:A (25), 1vrt:A (26), and 2zd1:A (27). Therefore, the initial model of the RNase H domain and its orientation was generated entirely based on the structures of the HIV RT. The C-alpha RMSD between the initial model and the M-MuLV structure 1rw3 was 1.09 Å (421 residues were aligned by the Multiprot server). The final full-length model was produced by replacing the RNase H domain in the initial full-length model with the model of the RNase H domain described above using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4.1, Schrödinger, LLC). To remove the steric clashes, the resultant structure was supplied as a user-specified template for the I-Tasser server (version available on the 5th of September, 2011). The RMSD between the final model and the PDB structure 1rw3 of the M-MuLV polymerase domain was 1.04 Å (421 residues aligned), and the RMSD between the final model and the PDB structure 2hb5 of the RNase H domain was 1.27 Å (132 residues aligned).

RESULTS

Thermostability of the ribosomal ternary complex

An *in vitro* evolution method based on the compartmentalization of the ternary complex (TC), consisting of mRNA, protein, ribosome, and tRNA, was developed in the R&D center of Thermo Fisher Scientific Baltics. This method allows the selection for catalytic activity under the conditions of free intermolecular interaction between the enzyme and a substrate. The selection experiment using bulk solutions of TCs is only possible if, during incubation, the TCs maintain their integrity and the product of the reaction catalyzed by the enzyme molecule of each TC becomes physically linked to the mRNA of the same TC. Otherwise, the genotype–phenotype linkage would be lost. Because of this, in the first stage of this research, the properties of the TC were investigated. The nitrocellulose filter binding assay was employed to measure the thermostability of the ribosomal ternary complex, consisting of M-MuLV reverse transcriptase, *E. coli* ribosome, and mRNA encoding the reverse transcriptase. The radioactively labeled mRNA was synthesized using [³H]-

ATP, and *in vitro* translation reaction was performed to obtain the ternary complexes. After that, TCs were purified and resuspended in the reverse transcription buffer with 50 mM MgCl₂. Such a mixture was incubated at +4°C for 8 to 64 minutes and filtered through specifically prepared leaflets of a nitrocellulose membrane. Nitrocellulose binds proteins but does not bind nucleic acids. Tritium-labeled mRNA is retained on a nitrocellulose filter only if a ternary complex is undisrupted. The amount of intact TCs was revealed by measuring the radioactivity of nitrocellulose leaflets. As expected, TCs appeared to be stable at high magnesium concentration and low temperature (Fig. 1A). Reverse transcription reaction buffer with 4 mM of MgCl₂ and 1 mM of each dNTP and Taq buffer with 1.5 mM MgCl₂ and 0.2 mM of each dNTP were used to evaluate TC stability at different temperatures. It was shown that TCs decay rapidly at higher temperatures; however, they are a bit more stable in the Taq buffer (Fig. 1B, C). It should be noted that the amount of intact TC unexpectedly increases during incubation at 50 °C (Fig. 1C). This could be explained by considering the property of M-MuLV RT to melt on the substrate during thermal denaturation (28,29,30).

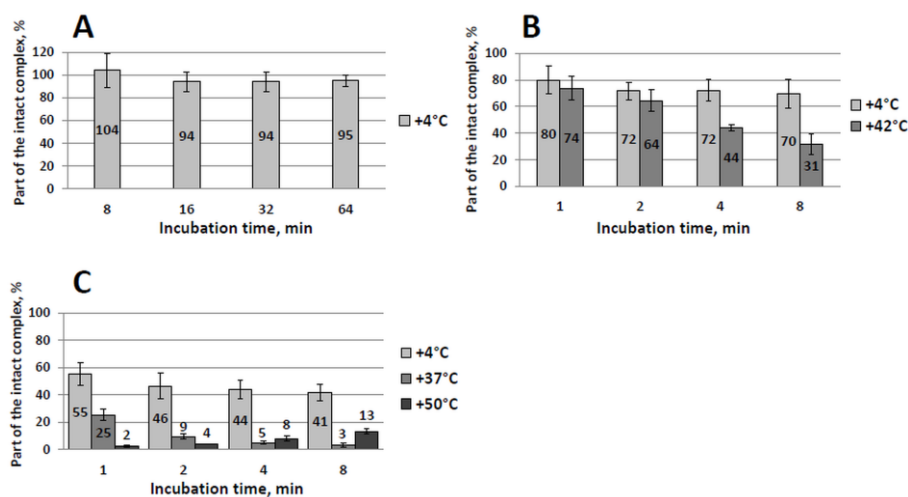


Fig. 2 Stability of TC in various conditions. A – TC was incubated in RT buffer supplemented with 50 mM MgCl₂, B – Taq polymerase buffer with 1.5 mM MgCl₂ and 0.2 mM of each dNTP, C – RT buffer with 4 mM MgCl₂ and 1 mM of each dNTP.

Proof of principle experiment

To demonstrate the power of selection, a mixture of mRNA's encoding the wild type and deletant variants of RT at the ratio 1:50 was prepared and

subjected to one round of selection according to the CRD scheme shown in Fig. 1. Three independent experiments resulted in a final gene ratio roughly 1:1 (Fig. 3, lane 2) that corresponded to the enrichment factor of 50, defined as a ratio between the final and initial ratios of wt/del. Several control experiments performed in parallel indicated that the obtained result was dependent on the selection and was not an artifact. The band corresponding to the wt M-MuLV gene was not observed in the gel when the reaction mixture was supplemented with the active RT before emulsification (Fig. 3, lane 3) or dNTPs were omitted during the cDNA synthesis step (Fig. 3, lane 1).

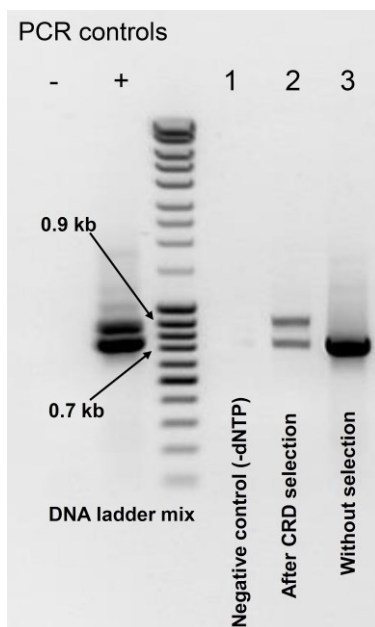


Fig. 3 Single-round selection for active RT. All CRD selection reactions, performed in emulsions, were set up with a 1:50 ratio of the wt M-MuLV:del M-MuLV mRNA and incubated for 1 h at 42°C. A nested PCR was used to amplify the region of synthesized cDNA, within which the deletion of del M-MuLV variant was located. The positive (the DNA target was a mixture of the 1:1 wt and del genes of M-MuLV RT) and negative (no DNA) PCR controls are given on the left side of the gel for the reference. The expected length of the PCR fragments is 907 bp for the wt and 736 bp for the del variants of M-MuLV. Lane 1—a negative control of the reverse transcription reaction (performed without dNTP) used to control for the DNA contamination and sample cross-contamination; lane 2—cDNA amplification after the CRD selection; lane 3—the control of the cDNA amplification without selection

pressure applied (cDNA is synthesized in emulsion, using the reverse transcription reaction supplemented with the RevertAid H minus RT).

Selection and characterization of thermostable M-MuLV transcriptase variants

The efficiency of cDNA synthesis is highly dependent on RNA secondary structures. Elevated temperature is a key factor required to destabilize these structures. Therefore, a thermostable reverse transcriptase that functions effectively at elevated temperatures is a highly desirable enzyme.

Results of selection of thermostable M-MuLV mutants

The mutant library of M-MuLV RT was constructed by the error-prone PCR of the whole gene. The final *in vitro* amplified M-MuLV RT library was used to generate TCs. Formed TCs ($\leq 2.7 \times 10^9$ molecules) were emulsified in the reverse transcription reaction mixture and incubated for 1 h at temperatures increasing with every subsequent selection round: 50°C, 52.5°C, 55°C, 57.5°C, and 60°C. The library of genes after the last selection round was cloned into the expression vector. Among 103 randomly picked and sequenced genes, we have found 97 unique mutated sequences and 1 wild-type sequence. Five sequences were repeated twice. Mutational load in selected genes as compared with the initial library was substantially increased, on average 8.1 nucleotide mutations per gene versus 2.3, correspondingly. The ratio of transversions to transitions after the selection (1:4.5) was also substantially increased compared with the initial library (1:20). The number of amino acid changes in selected mutants varied from 1 to 12, with an average of 5 amino acid substitutions per gene (1.5 in the initial library). Most mutants (70/102) had 3–6 amino acid substitutions per sequence.

After multi-round selection, we have identified mutations at amino acid positions, which were already known to affect the different properties of the M-MuLV RT: turn off the RNase H activity, increase thermostability, fidelity, processivity, resistance to common reverse transcription-quantitative PCR inhibitors, affinity for the template-primer, decrease the terminal deoxynucleotidyl transferase activity (31,32,33,34,35,36,37,38). According to the literature, all these mutations contributed to the thermostability and/or improved enzyme performance at elevated temperature in one way or another.

In addition, we have identified many previously unknown “hot spots” in the RT at positions D200, L603, T330, L139, Q221, and T287. The most frequently mutated positions of the M-MuLV found in our selection are presented in Table 1.

Table 1. The most frequently found mutations of M-MuLV RT after selection of thermostable mutants

Position	Number of clones	Mutation	Number of substitutions
D524 (39,32)	31	G	20
		A	10
		N	1
D200	30	N	25
		A	3
		G	2
D653 (33)	23	N	10
		G	5
		A	4
		H	3
		V	1
D583 (39,32)	21	N	10
		G	7
		A	3
		E	1
L603		W	17
		M	1
T330	15	P	15
L139	14	P	14
H204 (32)	7	R	7
Q221	6	R	6
T287	6	A	6
I49	5	V	4
		T	1
N479	5	D	5
H594	5	R	4
		Q	1
		S	3
F625	5	L	2
		S	4
H126	4	R	2
		S	2
L333	4	Q	3
		P	1
A502	4	V	4
E607	4	K	2
		A	1
		G	1
		R	4
K658	4	R	3
P130, Q237, Y344, M428, D449, A644, N649, L671	3	Q	1

Thermostability testing of the selected mutants

To assess the phenotype of the selected clones, 55 randomly picked genes from the pool of sequenced genes were expressed in *E. coli* and purified using single-step His-tag affinity chromatography. Over 70% of tested variants revealed RT activity, which was evaluated at different temperatures. The RT activity at 50°C (shows stability with substrate) and residual activity at 37°C after 5 min of preincubation without a substrate in RT buffer at 50°C (shows intrinsic stability) were normalized to the activity of the enzyme at 37°C, designated to be 100% (Fig. 4). The average value of the wt M-MuLV RT activity at 50°C reached almost 50% of the activity at 37°C.

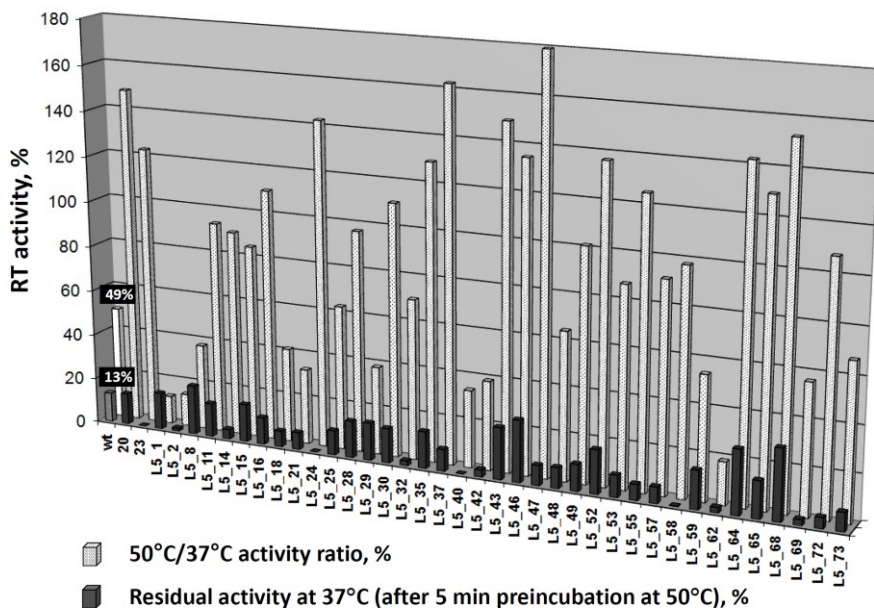


Fig. 4 Normalized RT activities of the wt and mutant RT variants. Two types of columns show the percent of RT activity at 50°C normalized to the activity at 37°C (light columns) and the residual RT activity at 37°C after 5 min incubation without the substrate at 50°C (dark columns).

Three-quarters of the tested mutants were, on average, twice more active at 50°C when compared with the wt enzyme, while the activity of some mutants exceeded 3-fold increase (Fig. 4). Less than half of the tested enzymes showed increased residual activity compared with the wt variant when pre-incubated at 50°C for 5 min without a substrate.

Some enzymes with higher RT activity at 50°C, with or without improved intrinsic stability, were present in the screened pool of clones, as well as enzymes with reduced RT activity at 50°C but higher intrinsic stability.

Our results imply that CRD selection was predominantly directed towards increased thermostability of the enzyme in the complex with a substrate and not necessarily towards increased intrinsic thermostability of the enzyme alone. This notion is supported by previous reports showing that RT bound to a substrate is stabilized against heat inactivation, and mutants with increased binding affinity to primer template are preferentially selected (32,33,39,40).

Some of the best-performing enzymes were tested for their ability to synthesize a 1.1 kb cDNA from the RNA template at different temperatures (Fig. 5). Mutants 20, L5_35, L5_64, L5_65, and L5_43 could accomplish the synthesis of the full-length 1.1 kb cDNA at 53–58°C. In contrast, the synthesis by the wt enzyme could not occur above 48°C. Activity testing and ability to synthesize 1.1 kb cDNA at increased temperatures show that *in vitro* evolution of M-MuLV using the CRD approach resulted in the selection of thermostable RT mutants.

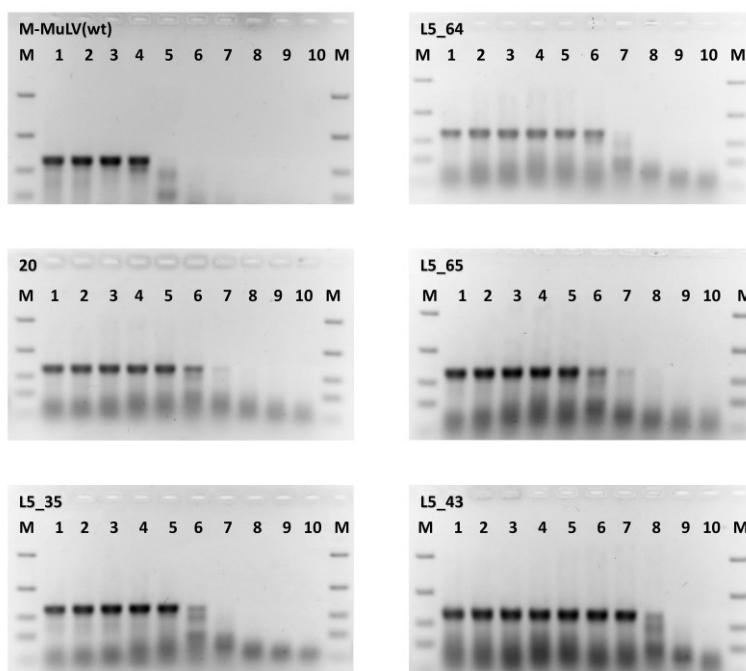


Fig. 5 Synthesis of the 1.1 kb cDNA at different temperatures. Alkaline agarose gel electrophoresis was performed with the L5_64, 20, L5_65, L5_35, L5_43 mutants of the M-MuLV RT and the wt enzyme. M—marker; lanes 1–10 cDNA synthesized at different temperatures: 41.9°C, 43.6°C, 45.5°C, 47.8°C, 50.4°C, 53.1°C, 55.8°C, 58.1°C, 60.1°C, 62.1°C, respectively.

Thermostability testing of the point mutants

M-MuLV RT single point mutants, containing the 28 most frequent mutations obtained in the selection experiment, were constructed, and the enzymes were expressed and affinity-purified. The thermostability of the RT point mutants was evaluated by measuring the RT activities on a synthetic poly(rA):oligo(dT)₁₈ substrate at 37°C and 50°C, and calculating the 50°C/37°C activity ratio. The best performing mutants (D200N, L603W, T330P, Q221R, N479D, H594R, E607K, P130S, D449G, M66L and W388R) exhibited a substantially higher 50°C/37°C activity ratio ($\geq 70\%$, Fig. 6) than the wt M-MuLV RT ($\sim 50\%$). The wt RT and all mutant enzymes were also tested in a reverse transcription reaction for the ability to synthesize 1.1 kb cDNA at elevated temperatures. The reactions were performed on a synthetic RNA substrate in a temperature gradient using a PCR instrument, and the highest temperature of the 1.1 kb cDNA synthesis was determined by analyzing the reaction products on an alkaline agarose gel. The maximum temperature determined for the wt RT was 48°C (data not shown). Despite the significantly increased 50°C/37°C activity ratio of many point mutants, only four RT variants were able to accomplish full-length 1.1 kb cDNA synthesis at higher temperatures than the wt enzyme: L603W ($\leq 53^\circ\text{C}$), and D200N, Q221R, E607K ($\leq 50^\circ\text{C}$).

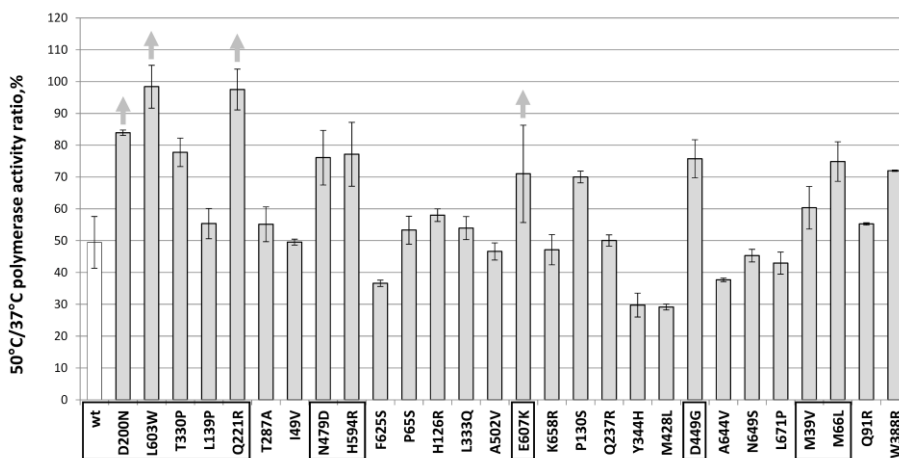


Fig. 6. The 50°C/37°C activity ratio of the wt enzyme (white column) and point mutants (gray columns). The average values of at least two independent measurements are given. Gray arrows above the columns indicate RT variants synthesizing 1.1 kb cDNA at $\geq 50^\circ\text{C}$. Amino acid positions selected for partial site-saturation mutagenesis are denoted by gray rectangles.

Furthermore, the partial site-saturation mutagenesis at the most frequently mutated amino acid positions D200, L603, T330, L139, Q221, and T287 was performed. This group was also supplemented with N479, H594, E607, D449, M39 and M66 amino acids, as their mutations resulted in a higher 50°C/37°C activity ratio (Fig. 6). Typically, the set of mutations at each amino acid position included all the mutations selected during the original *in vitro* evolution experiment (e.g. D200N, D200A, D200G), similar amino acids (e.g. D200Q, D200E), amino acids with the opposite properties (e.g. negatively/positively charged—D200K, D200R, D200H, polar/ non-polar—D200V) and completely different amino acids (D200W, D200P). The best-performing amino acid positions were mutagenized more extensively (D200 – 11 variants; L603 – 8 variants) than the others (M39 – 4 variants, M66 – 3 variants). All the mutants were constructed, expressed, affinity-purified, and examined for the 50°C/37°C activity ratio and the maximum 1.1 kb cDNA synthesis temperature. Results of the measurement are shown in Fig. 7.

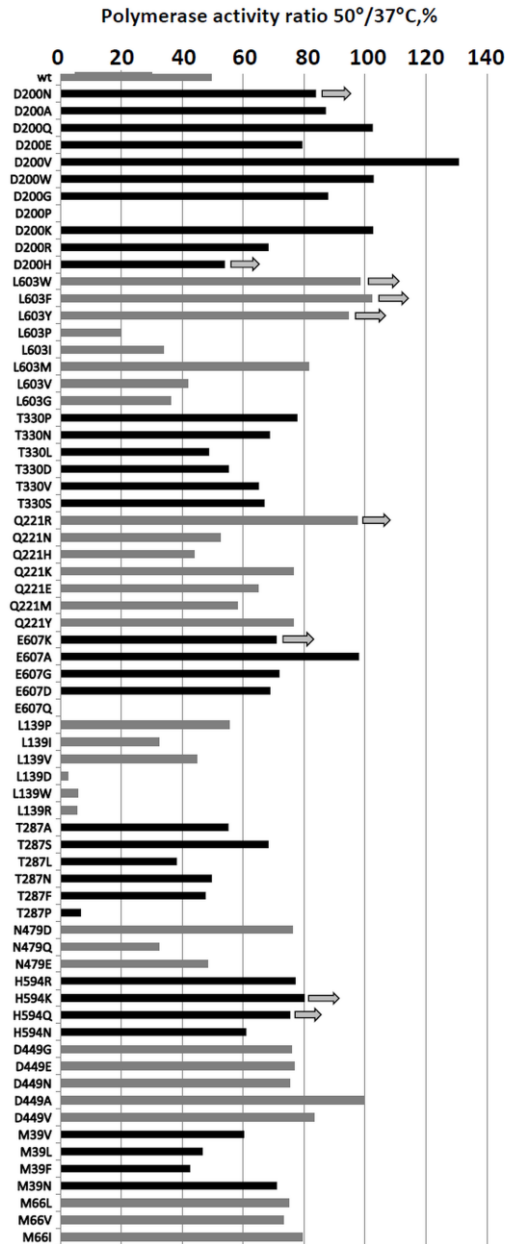


Fig. 7. The 50°/37°C activity ratio (expressed in percentage) of the wt enzyme and point mutants. The average values of at least two independent measurements are given. The mutant groups with substitutions at the same amino acid position are denoted in alternating grey and black colors. The grey arrows above the columns indicate reverse transcriptase variants that synthesize 1.1 kb cDNA at $\geq 50^{\circ}\text{C}$.

Biochemical characterization of the point mutants

To understand the mechanism behind the beneficial effect of individual mutations, the detailed biochemical characterization of the wt enzyme and the best-performing point mutants D200N, L603W, T330P, L139P, Q221R, T287A, N479D, H594K, E607K, D449G, M66L, and W388R was done.

The thermal inactivation rates of the wt enzyme and purified point mutants at 50°C in the presence of the template-primer were measured. The $t_{1/2}$ values obtained for the mutants D200N (~180 min), L603W (~150 min), L139P (~100 min) and T330P (~90 min) exceeded the $t_{1/2}$ of the wt enzyme (40 min) up to 4-fold (Fig. 8A). The $t_{1/2}$ values of the other mutants fell within the range of 45–76 min. Intriguingly, a decreased thermal inactivation rate at 50°C of some mutants did not result in a higher 50°C/37°C activity ratio. For example, despite the longer $t_{1/2}$ of the L139P mutant, its 50°C/37°C activity ratio (~60%) was only slightly higher in comparison with the wt enzyme (~50%, Fig. 6). On the contrary, the $t_{1/2}$ of the Q221R mutant (~50 min) was comparable to the wt enzyme. Still, the 50°C/37°C activity ratio was significantly higher (~94%, Fig. 6).

Additionally, the equilibrium dissociation constants (K_d) for the interaction of the wt and mutant RTs with the RNA–DNA substrate were determined using the electrophoretic mobility shift assay. The substrate-binding affinity of the D200N, L603W, L139P, N479D, H594K, E607K, and D449G mutants was 2- to 5-fold increased in comparison with the wt enzyme (Fig. 8B). This may account for the slower thermal inactivation (Fig. 8A) and higher 50°C/37°C activity ratio (Fig.6) of these RT variants.

The processivity of the wt and mutant RTs was tested using an FAM-labeled DNA primer annealed to a long RNA transcript in the presence of a substrate trap. The elongated primer was analyzed on a sequencing machine along with the 35–500 nt ROX-labeled DNA ladder and quantified. The stretches of cDNA synthesized by the E607K, Q221R, L139P, L603W, and D200N mutants during a single polymerization event were 2- to 4-fold longer in comparison with the wt enzyme (Fig. 8C). Increased processivity of these mutants correlates with tighter substrate binding (Fig. 8B). However, mutants N479D, H594K, and D449G, despite their improved affinity to the substrate (Fig. 8B), displayed comparable processivity to the wt enzyme (22–32 nt, Fig. 8C).

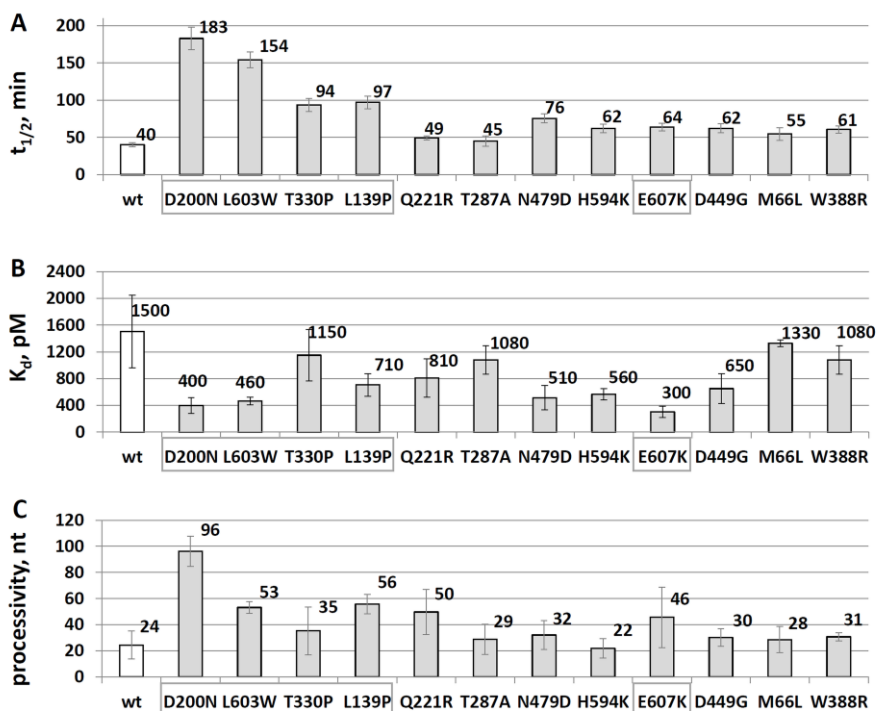


Fig. 8 Biochemical characterization of the M-MuLV RT point mutants. (A) Thermal inactivation half-life of point mutants at 50°C. (B) Substrate-binding affinity. (C) Enzyme processivity in nucleotides at 37°C. The average values of at least three (A) or two (B and C) independent measurements +1 SD are given. Mutations selected for the construction of multiply-mutated RTs are denoted by gray rectangles.

Construction and characterization of the multiple mutants

New previously uncharacterized point mutations were combined to generate the following multiple mutants: double mutant mut2 (D200N; L603W); triple mutant mut3 (D200N; L603W; T330P); quadruple mutant mut4 (D200N; L603W; T330P; E607K); and quintuple mutant mut5 (D200N; L603W; T330P; E607K; L139P). The multiple mutant mut4_S identified during the *in vitro* evolution procedure that contains three of the five mutations selected for the rational construction (L139P; D200N; E607K) and an additional W388R mutation was also characterized.

The thermal inactivation of the multiply-mutated variants was analyzed in the presence of the substrate at 50°C. The experiment shows that the combination of the beneficial D200N and L603W mutations in the double mutant mut2 increased the half-life of the enzyme to ~360 min (Fig. 9A). The

addition of the T330P mutation in the triple mutant mut3 further increased the half-life to ~430 min. The E607K mutation slightly decreased the half-life of the quadruple mutant mut4 to ~360 min, but the fifth replacement L139P yielded the most thermostable RT variant mut5, with a 12-fold higher $t_{1/2}$ value than the wt enzyme and a 1.5-fold higher $t_{1/2}$ value than the multiple mutant mut4_S identified in the evolution *in vitro* experiment (~310 min).

Substrate binding affinity measurement revealed that the double mutant mut2 binds the primer–template with comparable affinity ($K_d \sim 500$ pM) to the mutants bearing the individual D200N and L603W mutations (Fig. 9B). However, the addition of the T330P mutation in the triple mutant mut3 increased the affinity 3-fold ($K_d \sim 150$ pM); further addition of the E607K and L139P mutations in the multiple mutants mut4 and mut5 resulted in even higher DNA-binding affinities (Fig. 9B). The K_d of the best-performing variant mut5 (~30 pM) was 50-fold higher in comparison with the wt enzyme (~1500 pM, Fig. 9B) and was similar to the K_d of the multiple mutant mut4_S identified in the original selection (36 pM).

The processivity measurement showed that the combination of the beneficial D200N and L603W mutations acted cooperatively in the mut2 double mutant, increasing its processivity to 610 (± 14) nt; a stepwise addition of the T330P, E607K and L139P mutations in the mut3, mut4 and mut5 variants led to the processivity values of ~1000 – 1500 nt, up to 64-fold higher in comparison with the wt enzyme (Fig. 9C). The processivity of the multiple mutant mut4_S identified in the selection experiment was ~1000 nt and fell within the processivity range (~600–1500 nt) of the rationally designed mutants mut2–mut5. As expected, the processivity of the mutants correlated with increased affinity for the substrate (Fig. 9B and C), suggesting that a tighter substrate binding is the primary mechanism behind the higher thermostability and processivity of the multiply-mutated RTs.

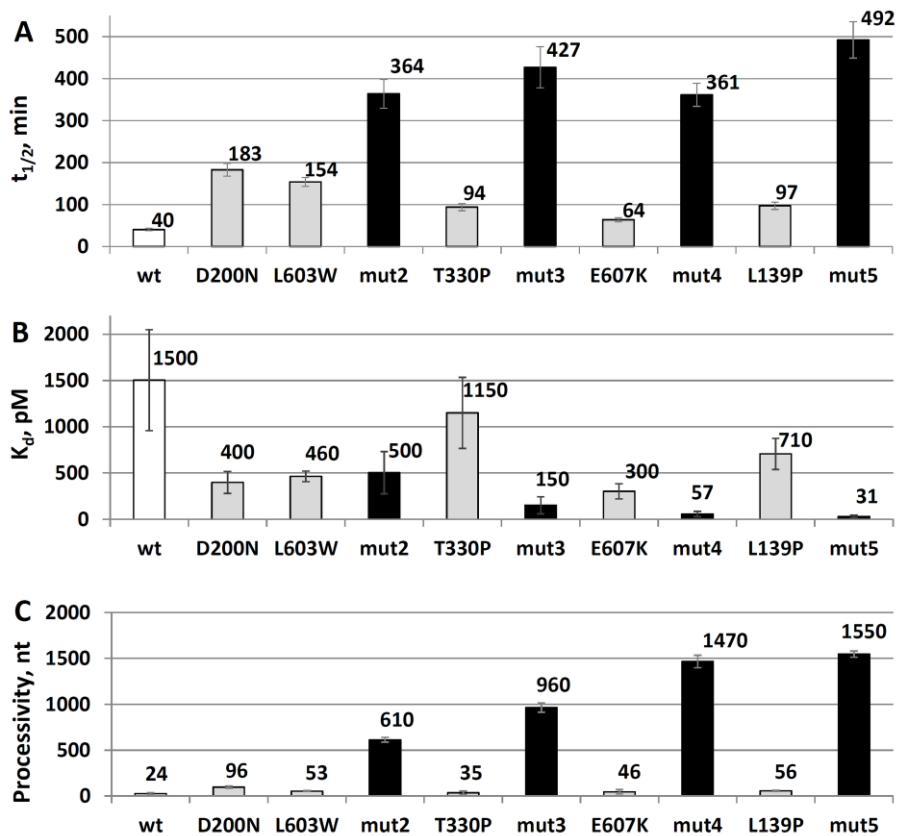


Fig. 9. Biochemical characterization of the multiple M-MuLV RT mutants. (A) Thermal inactivation half-life at 50°C. (B) Affinity to substrate. (C) Enzyme processivity in nucleotides at 37°C. The average values of at least three (A) or two (B and C) independent measurements ± 1 SD are given. For clarity, all graphs contain data for the multiple mutants (black columns), the wt enzyme (white column), and point mutants used for the rational design of the multiple mutants mut2-mut5 (gray columns).

Additionally, the DNA synthesis rate for the wild-type and mutant enzymes was determined using RNA substrate. The initial reaction rate measurements were performed using the wt enzyme, single (D200N and L603W), and multiple mutants at 37°C and 50°C. The initial nucleotide incorporation rate, corresponding to the reaction V_{max} , of all RT variants at 50°C was about 1.5- to 2-fold higher than at 37°C. Interestingly, the reaction rates of multiple mutants slightly decreased with the number of point mutations introduced when constructing the particular mutant (Fig. 10).

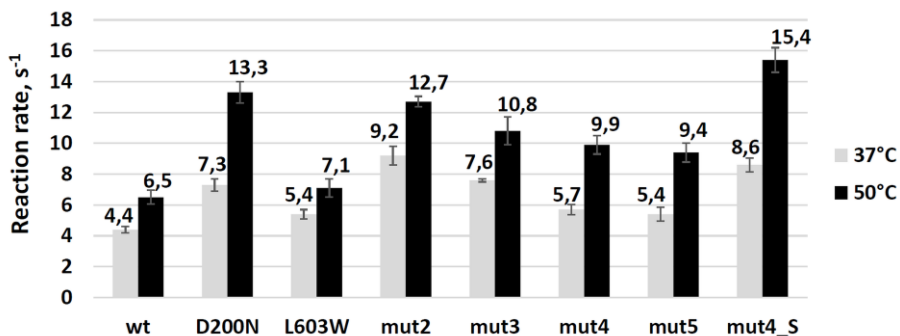


Fig. 10. The rate of DNA synthesis. The average rate of nucleotide incorporation was measured for the wild-type reverse transcriptase, point mutants, and multiple mutants at 37°C (gray columns) and 50°C (black columns). The average values of at least three independent measurements ± 1 SD are given.

To compare the performance of the wt M-MuLV RT and the newly generated variants in real-life applications, the highest temperature suitable for the synthesis of 7.5 kb cDNA was determined. The reactions with the wt enzyme, single mutants used to generate the multiple mutants, and all the multiply-mutated variants were carried out at 37°C–69°C for 1 h using a 7.5 kb-long RNA transcript as a template. The wt RT could accomplish synthesis of the full-length 7.5 kb cDNA only at 45°C (Fig.11). Single amino acid mutants, except T330P, could synthesize 7.5 kb cDNA at higher temperatures than the wt enzyme. The multiple mutants mut2, mut3, mut4, and mut5 showed a further increase in the maximum synthesis temperature (56°C, 59°C, 62°C, and 62°C, respectively, Fig.11), while the multiple mutant mut4_S could synthesize 7.5 kb cDNA at $\geq 59^\circ\text{C}$. Thus, the best-performing multiple mutant mut5 was able to accomplish synthesis of the full-length 7.5 kb cDNA at 17°C higher temperature than the wt enzyme.

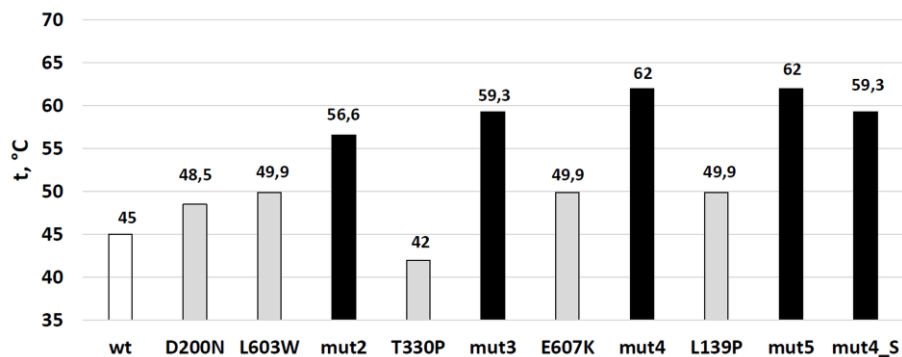


Fig. 11. The highest 7.5 kb cDNA synthesis temperatures of the wt RT (white column), the multiple mutants mut2–mut5 (black columns), and the point mutants used for the rational design of the mut2–mut5 multiple mutants (gray columns).

Selection and characterization of M-MuLV RT variants, effective at low dNTP concentrations

Results of M-MuLV RT mutant selection, performed using low dNTP concentrations

The CRD assay was employed to select M-MuLV RT variants capable of efficient cDNA synthesis in Taq DNA polymerase buffer, thus making them suitable for the one-step RT-PCR technique. The concentration of dNTPs in the Taq polymerase buffer is five times lower compared to that in a typical RT buffer. Since the M-MuLV RT wild-type enzyme showed substantial activity in Taq buffer, a stepwise adaptation to the reaction buffer during the selection was not necessary. For the first selection round, the reverse transcription reaction was performed for 1 h at 42°C. The incubation time was decreased stepwise down to 5 min. After the seven rounds of selection, 29 randomly picked genes of selected M-MuLV RT were sequenced and analyzed. All the encoded mutant proteins were unique, having 2–10 amino acid substitutions, with an average of 5.2 amino acid changes per gene, indicating an accumulation of mutations during the selection process as compared to the initial mutant library of RT.

Among all the genes analyzed, 2/3 of them appeared to have mutations in the active site of the enzyme: either in the V223 position of the active site motif YVDD (24,41) or in the Q221 position nearby this motif (Table 2).

Table 2. The most frequently found mutations of M-MuLV RT after selection of mutants, functional at low dNTP concentrations

Position	Number of clones	Mutation	Number of clones
V223 (41,42,43)	10	M	6
		A	4
Q221 (14)	8	R	8
C635 (44)	7	Y	6
		R	1
E12	4	G	3
		D	1
L10	3	P	3
L139 (14)	3	P	3
V418	3	I	3
D583 (39,32)	3	G	1
		A	1
		N	1
I597 (45)	3	V	2
		M	1
K628	3	T	3
G637	3	R	2
		E	1
S643	3	G	2
		N	1
S675	3	P	3
K15, M39 (9), E201, K274, Q277, E282, T306 (32), E319, P431, V433 (46), N454 (36), L491, D524 (39,32), T567, L603 (14), H638 (32,33)	2		

A significant number of mutations was found in the C-terminal part of the enzyme, mainly in the RNase H domain (C635Y/R, D583G/A/N, I597V/M, K628T, G637R/E, S643G/N, S675P, D524G/N, L603S and H638R), suggesting that specific alteration of the present domain was favorable for the *in vitro* selection. In addition, some previously unidentified mutations have been found in the N-terminus of the polymerase (E12G/D, L10P, K15R, and M39V).

For the detailed analysis, individual mutants of RT containing a single amino acid change identified three or more times in the selection were

constructed. In addition, two double mutants, combining the most frequent mutations Q221R and V223A or V223M, were constructed to elucidate whether the biochemical properties of these mutations are synergistic and additive.

RNase H activity of the mutant enzymes

It is well known that elimination or significant decrement of the RNase H activity could have a positive impact on enzyme stability and cDNA synthesis efficiency (39,47). Thus, the RNase H activity of all the constructed mutants was measured (Fig. 12). Aspartate D583 is a part of the highly conserved motif, forming the catalytic triad of acidic residues that coordinate one or two Mg^{2+} or Mn^{2+} ions in the RNase H active center (17). As expected, and referenced before, mutation D583N disrupts the RNase H active center and has no detectable RNase H activity. In addition to the D583N mutation, we have found that mutations S643G, G637R, and C635Y reduce RNase H activity significantly. Other mutations identified in the RNase H domain (I597, K628T, and S675P), as well as mutations in the N-terminal part of the protein, have not shown any significant impact on the RNase H activity (Fig. 12).

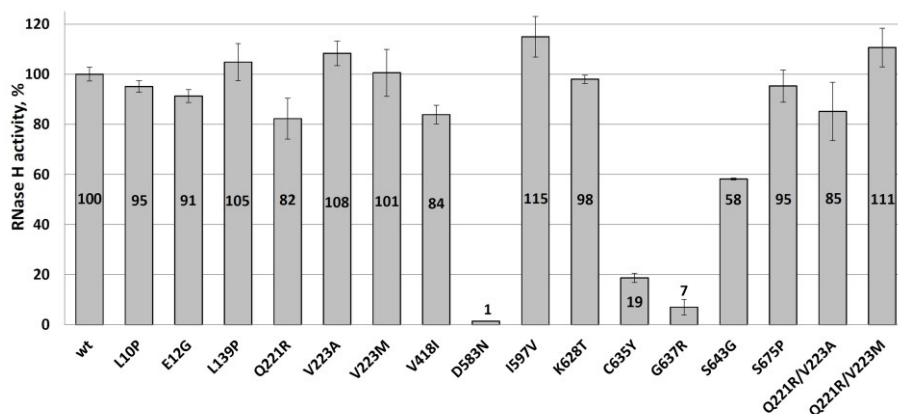


Fig. 12 RNase H activity of the M-MuLV RT variants carrying the most frequent point mutations and two double mutants. The average values of three independent measurements ± 1 SD are given.

Steady-state kinetic analysis of the mutant enzymes

Mutant RT's, containing amino acid substitutions V223A and V223M in the conserved motif of the active center and neighboring replacement Q221R, along with the double mutants Q221R/V223A and Q221R/V223M have been subjected to detailed biochemical characterization in order to estimate the K_m , k_{cat} and V_{max} values of those enzymes. The synthesis of cDNA was performed using different concentrations of dNTPs. A 4–5-fold decrease in the K_m to dNTPs was observed for all three single and two double mutants (Table 3). Furthermore, the double mutant Q221R/V223A had ~2.5-fold lower values of k_{cat} and V_{max} , meanwhile, all other analyzed mutant enzymes performed like the wild-type enzyme (Table 3).

Table 3. Kinetic properties, processivity, and dissociation constant of the wild-type M-MuLV RT and the active site mutants. The average values of three independent measurements ± 1 SD are given.

Enzyme	K_m (dNTP), μM	k_{cat} , s^{-1}	V_{max} , nM/s	Processivity, nt	K_d , pM
WT	703 ± 259	$8,2 \pm 2,8$	327 ± 114	22 ± 5	772 ± 172
Q221R	146 ± 55	$5,1 \pm 1,1$	204 ± 46	10 ± 2	407 ± 205
V223A	167 ± 26	$5,0 \pm 0,2$	201 ± 7	39 ± 5	1051 ± 166
V223M	134 ± 14	$6,4 \pm 0,5$	257 ± 20	20 ± 6	785 ± 361
Q221R/V223A	191 ± 50	$2,9 \pm 0,8$	115 ± 33	15 ± 3	466 ± 89
Q221R/V223M	178 ± 5	$7,6 \pm 0,1$	303 ± 5	15 ± 5	555 ± 103

Substrate binding affinity and processivity of the active site mutants

The equilibrium dissociation constant K_d for the active site mutants, along with the wild-type enzyme, was measured using the RNA–DNA substrate and applying the electrophoretic mobility shift assay. The estimated K_d value of the Q221R mutant enzyme was twofold lower in comparison to the wild-type enzyme (0.77 nM for the wild-type enzyme and 0.4 nM for Q221R, Table 3). Both double mutants, containing the above-mentioned amino acid replacement, showed K_d values similar to those of the Q221R. Single amino acid replacements V223A and V223M do not affect the enzyme's affinity to the substrate and have dissociation constants similar to the wild-type enzyme (Table 3).

As a next step in the biochemical characterization of mutant polymerases, we tested the processivity of the wild-type enzyme and single and double

mutants. The determined processivity value for the wild-type enzyme was 22 (± 5) nucleotides. Surprisingly, the Q221R mutant displayed the processivity of only 10 nucleotides (Table 3). The longest cDNA fragments synthesized in a single polymerase binding event were obtained for the V223A mutant (~39 nucleotides), whereas the processivity of the V223M mutant was similar to that of the wild-type (~20 nucleotides). Interestingly, the double mutants combining Q221R and V223A or V223M mutations had decreased processivity (~15 nucleotides) compared to the wild-type or the corresponding single amino acid mutants, V223A and V223M (Table 3). It is very likely that the low processivity of the Q221R mutation has a dominating effect and decreases the processivity of double mutants as well.

Synthesis of the full-length 7.5 kb cDNA

The wild-type and active center mutant M-MuLV variants were tested by performing reverse transcription of the synthetic 7.5 kb RNA for 10–60 min. Synthesized cDNA was analyzed using alkaline agarose electrophoresis. A very faint zone indicating the full-length product was detected after 30 min of synthesis using the wild-type enzyme (Fig. 13). A 60 min incubation was required to obtain a clearly visible cDNA band of 7.5 kb. Mutants V223A and Q221R performed similarly to the wild-type, meanwhile the V223M variant generated a substantial accumulation of the specific reaction product already after 20 min, with the yield increasing significantly during the 60 min of incubation, as judged from the cDNA band intensity (Fig. 13).

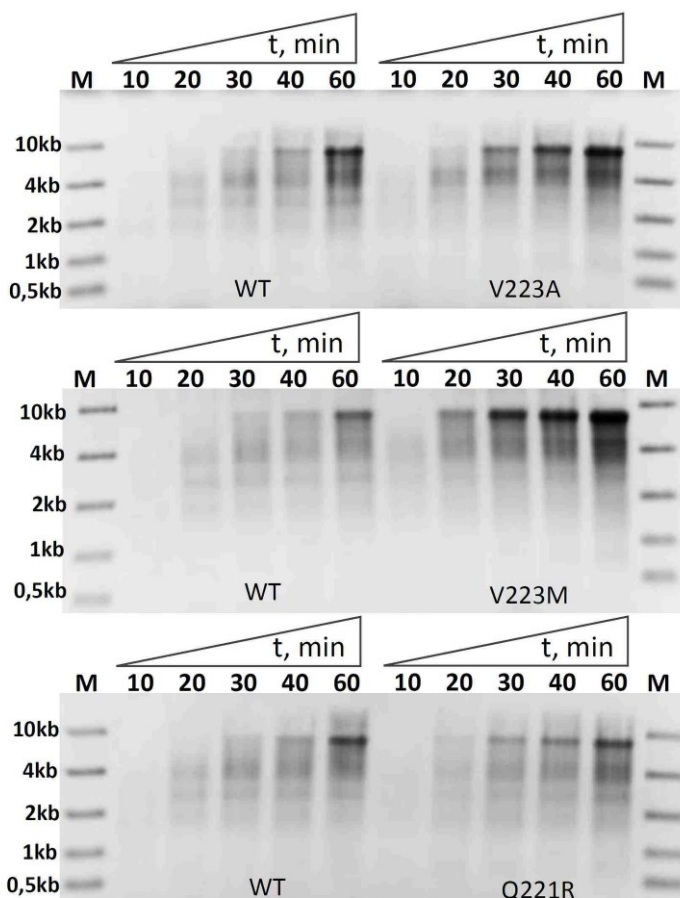


Fig. 13. 7.5 kb cDNA synthesis performed in 1x Taq buffer at 42°C by the wt M-MuLV RT enzyme and the active site mutants at various time points.

Fidelity of cDNA synthesis

The fidelity of cDNA synthesis was measured for the wild-type and five mutants of M-MuLV RT with the amino acid changes in the active center of the polymerase (Fig. 14). The experimental data indicates mutants V223A and V223M having the same accuracy of cDNA synthesis as the wild-type RT (~1 error per 40 000 nucleotides). M-MuLV RT mutant Q221R had ~5-fold lower fidelity (1 error per 8600 nucleotides) compared to the wild-type enzyme. Interestingly, the fidelity of the double mutants Q221R/V223A and Q221R/V223M was also compromised (2–3-fold decrease), though not as much as in the case of the individual Q221R mutant (Fig. 14)

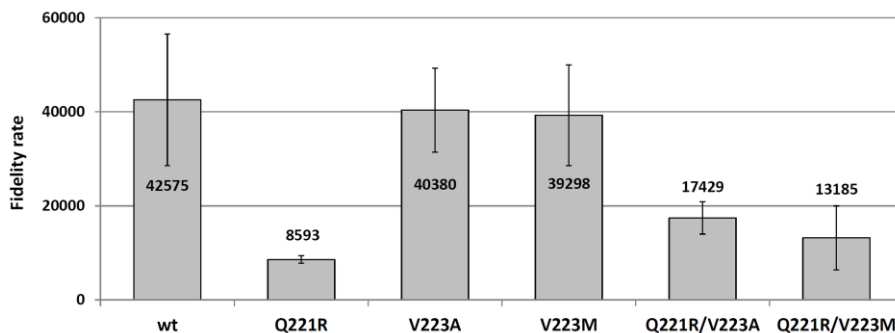


Fig. 14 Fidelity rate values (correct bases/1 error) with the confidence intervals are given for the wild-type and mutant enzymes. Confidence intervals are based on the Agresti–Coull confidence intervals for the binomial proportion (48).

DISCUSSION

The CRD represents a valuable addition to the repertoire of completely *in vitro* directed evolution methods, which provides the opportunity for the selection of the enzymes under conditions when an enzyme and its substrate can interact freely in solution. Another key advantage of this technique is the possibility to remove the components from the transcription - translation mixture and to perform the selection in desired buffer conditions.

In the first stage of this research, the viability and efficiency of the CRD were illustrated by a proof-of-principle experiment using the M-MuLV RT as a model, which resulted in the selection of numerous RT mutants capable of synthesizing cDNA at increased temperatures. By employing CRD-based selection, a significant number of mutations, already described in previous publications and patents, contributing to the thermostability of the enzyme and/or improving enzyme performance at elevated temperatures were identified. In addition, many new previously unknown mutations at positions 200, 603, 330, 139, 221, 287, 49, 479, 594, 625, 65, 126, 333, 502, 607, 658, etc. were found (Table 1).

The enzyme variants obtained from CRD-based selection contained multiple mutations. Many of these variants carried more than one beneficial mutation, accompanied by diverse and random amino acid substitutions representing a valuable pool of unique genotypes. Some variants contain up to 5-6 beneficial mutations that could cumulatively contribute to the thermostability of the enzyme.

The selection of clones carrying multiple beneficial mutations could be partly explained by their presence in the initial library. Furthermore, it is likely that some mutations are generated during the cDNA synthesis, as well as PCR amplification and transcription of genes by T7 RNA polymerase, which is performed after every round of selection. Given that three separate multi-cycle PCR amplifications were carried out after each round of selection, the highest input to diversification of the individual genes is likely coming from PCR artifacts, such as reshuffling of mutations located in different genes due to chimera formation from incompletely extended primers (49,50). Recombination could contribute to the generation of rare clones with multiple beneficial mutations.

Obviously, the effect of some new mutations is inevitably deleterious and may inactivate the enzyme or decrease thermostability even if the clone possesses beneficial mutations. This is illustrated, for example, by the observation that beneficial mutations abolishing ribonuclease H activity were found among the variants that show no increased thermostability or were inactive (Fig. S2 in (9)). Such errors are likely to arise during post-selection manipulations: cDNA synthesis and PCR after the last selection step, as well as the mismatch repair stage (system) occurring in *E. coli* cells, in which various heteroduplexes generated during PCR are converted to homoduplexes (51). This could result that some clones, isolated and sequenced after the final round of selection, will not represent the exact genotypes encoding the selected phenotypes. However, all mentioned artifacts do not represent a significant drawback to the CRD technique since the ‘hot-spot’ mutations of selected genotypes can be easily tackled by DNA sequencing. Indeed, the most frequent point mutations enriched during the selection procedure were successfully identified after sequencing 103 clones.

To investigate the impact of individual mutations on the ability of M-MuLV RT to synthesize cDNA at elevated temperatures, RT point mutants that carried substitutions at a number of previously uncharacterized amino acid positions were constructed and characterized.

In the first set of experiments, 28 M-MuLV RT point mutants were constructed and their activity ratio at 50°C/37°C as well as the ability to synthesize full-length cDNA at elevated temperatures was measured (Fig. 6). After that, 12 amino acid positions were selected for partial site-saturation mutagenesis (Fig.7). Twelve best-performing point mutants were subjected to a more detailed biochemical characterization. Heat inactivation experiments in the presence of a substrate-primer revealed that the life time of the point mutants D200N, L603W, T330P and L139P at 50°C increased 2.5- to 4-fold

in comparison with the wt enzyme (Fig. 8). The higher thermostability in all cases was accompanied by the 1.5- to 5-fold improved substrate binding and increased processivity (Fig. 8). However, the thermal inactivation rates in the absence of template–primer remained largely unchanged. This suggests that all newly identified mutations increase enzyme thermostability primarily through tighter substrate binding; a similar mechanism for the RT stabilization was reported previously (36,39,52,53).

The full-length homology model of the M-MuLV RT was created to understand the structural mechanism behind the improved performance of the D200N, L603W, L139P, and T330P point mutants (14). The model suggests that the D200 residue is in close vicinity to the catalytic aspartates D224 and D225 (Fig. 15). Therefore, mutations at the 200th position may cause structural rearrangements of the catalytic and neighboring residues that, in turn, may alter the substrate-binding affinity and the rate of catalysis.

The L139 amino acid is located at the core of the palm domain. It forms a hydrophobic cluster with the residues of aliphatic amino acids I218, L220, and L273. Because of this, large and polar substitutions of the L139 drastically diminished the 50°C/37°C activity ratio of mutant enzymes (Fig. 7). On the contrary, the L139P mutation had a positive effect on the thermostability, substrate-binding affinity and processivity of the enzyme, suggesting that a proline residue at the 139 position stabilizes the hydrophobic cluster through increased backbone rigidity (54,55).

Similarly, the structure of M-MuLV RT is stabilized by the insertion of proline in position 330. According to the model, the T330 residue is located at the terminus of a small helical fragment of the thumb domain (Fig. 15). This M-MuLV RT helix presumably is near the substrate, and the neighboring residue of T330, the lysine K329, may form direct contact with the phosphodiester backbone. The backbone rigidity provided by the T330P substitution should stabilize the DNA

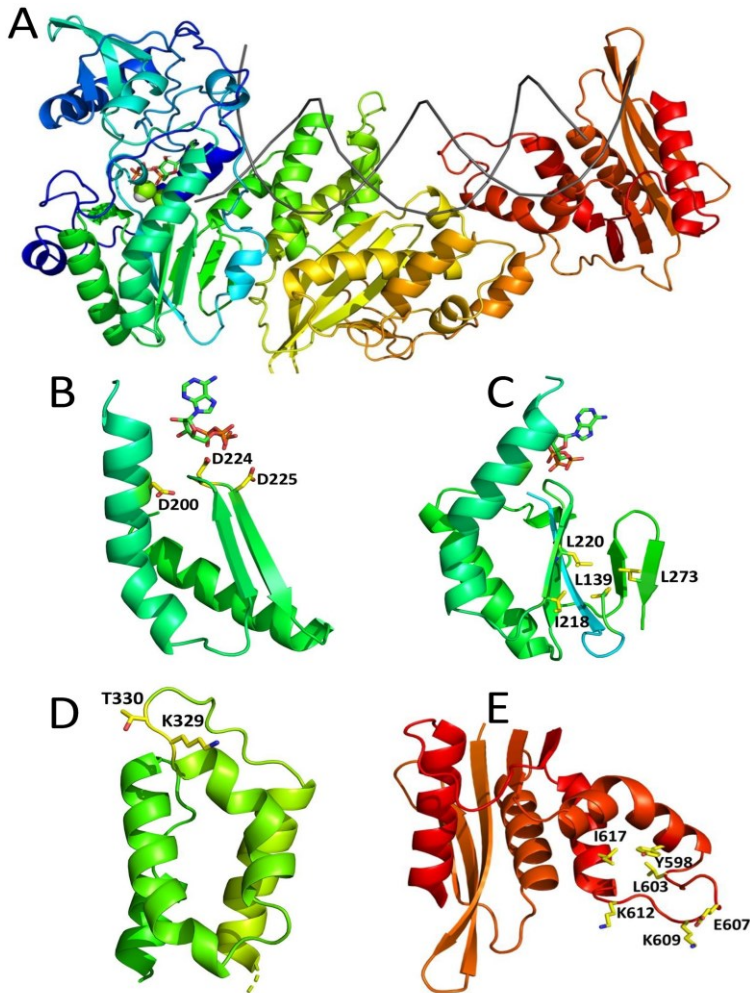


Fig. 15. Structural context of the identified thermostable mutations. (A) The model of the full-length M-MuLV RT (see 2.3.17) is colored in a rainbow mode, ranging from blue (N-terminus) to red (C-terminus). (B) The D200 amino acid (sticks) is located on the H-helix in the vicinity of the polymerase active site; the active site residues D224 and D225 are shown as sticks. The L139 residue (sticks) forms a hydrophobic cluster with the aliphatic amino acids I218, L220, and L273 shown as spheres. (C) The T330 residue (sticks) is located at the terminus of a small helical fragment of the thumb subdomain. The neighboring residue K329 (sticks) may form direct contact with the phosphodiester backbone of the substrate. (D) The RNase H domain residue L603 (sticks) forms a hydrophobic cluster with the I617 and Y598 residues (spheres) and together with K609, K612, and E607 residues (sticks) is located on the putative substrate-binding loop.

Contacting helical motif, again resulting in a stabilized protein and enhanced primer–template binding.

A similar stabilization mechanism can be proposed for the L603W mutant. According to the model of the full-length RNase H domain, L603 forms a hydrophobic cluster together with the I617 and Y598 residues and is located on the same loop as the putative substrate phosphate backbone-interacting lysines K609 and K612 (17,45). All large hydrophobic and aromatic substitutions of L603 improved the 50°C/37°C activity ratio (Fig. 7). Presumably, large side chains stabilize the hydrophobic cluster. This, in turn, may stabilize the neighboring C-helix and the loop with the DNA/RNA contacting residues.

Regarding the E607K substitution, the model shows that introduction of the extra positive charge into the putative DNA-interacting loop (Fig. 15) should facilitate binding of the negatively charged RNA–DNA heteroduplex. Indeed, the substrate binding of the said mutant increases 5-fold (Fig. 8B).

By combining the best-performing point mutations, multiple M-MuLV RT mutant variants were generated. As expected, a stepwise addition of beneficial mutations had an incremental effect on the thermostability, substrate-binding affinity, and processivity of the multiple mutants (Fig.9). The best-performing RT variant was mutant mut5, having all five beneficial mutations. In comparison with the wt enzyme, it showed a 12-fold higher thermostability (half-time at 50°C), 50-fold higher substrate-binding affinity, and 65-fold higher processivity (Fig. 9). As a result, the best-performing multiple mutant mut5 was able to synthesize full-length 7.5 kb cDNA even at 62°C, that is 17°C higher temperature than the wt enzyme.

Along with the rationally designed mutants mut2-mut5, the RT variant mut4-S, selected in the original evolution experiment, was analyzed. Mutant mut4-S carried three of five mutations selected for the rational design (L139P, D200N, and E607K), and only a single additional mutation, W388R. The thermostability of the mut4-S is close to the rational design mutant mut4, and the dissociation constant is close to mut5. However, the highest 7.5 kb cDNA synthesis temperature and processivity of the mut4-S is equal to mut3 (Figures 9 and 11). This means that the combination of the best-performing individual mutations may yield a better end-product than screening of multiple mutants isolated directly in the *in vitro* evolution experiment.

Another successful example of the CRD evolution experiment is the selection of M-MuLV RT mutants having altered kinetic properties (16). During the experiment, evolutionary pressure was applied to select M-MuLV RTs that can synthesize cDNA faster than the wild-type enzyme.

Seven rounds of selection were performed, starting with a 1 h incubation time and ending up with 5 min incubation. Finally, 29 randomly picked genes of selected RTs have been sequenced to identify which mutations have been enriched during CRD selection.

Data analysis showed that 90% (26/29) of the mutant variants carried mutations in the RNase H domain. In addition to well-known RNase H inactivating mutations at positions D524 and D583, several novel replacements (C635Y, G637R, and S643G) significantly reducing the RNase H activity were found.

Amino acid residues C635 and G637 belong to the His-loop of the RNase H domain. His-loop encompasses the sequence CPGHQK, and residues from P636 to K640 of this functionally important loop are conserved in all RNases H (56). Since this loop is located in one of the three unresolved regions of the M-MuLV structure (17), the structural properties of this region were proposed using the full-length homology model (2.3.17). This model supports the presumption that C635 is in proximity to the putative position of highly conserved active site residue H638 (Fig. 16), thus affecting the interaction of the RNase H domain and DNA/RNA substrate (44). This explains the reduced RNase H activity of the C635Y mutant. Moreover, significantly decreased RNase H activity of G637R also suggests that this residue, located in the His-loop, might be involved in contacts like those mentioned above.

The highest number of M-MuLV RT modifications was found to be concentrated in the active site of the polymerase (Table 2). The most frequently mutated position appeared to be valine 223 in the YVDD motif (Fig. 16). Valine was replaced by methionine (6 out of 10 replacements) and alanine (4 out of 10, Table 2). Methionine is a prevalent amino acid in the YXDD motif found in the RTs of human immunodeficiency virus (HIV), feline immunodeficiency virus (FIV), simian immunodeficiency virus (SIV), and avian myeloblastosis virus (AMV), whereas the M-MuLV and feline leukemia virus (FLV) RTs have the sequence YVDD (57,58).

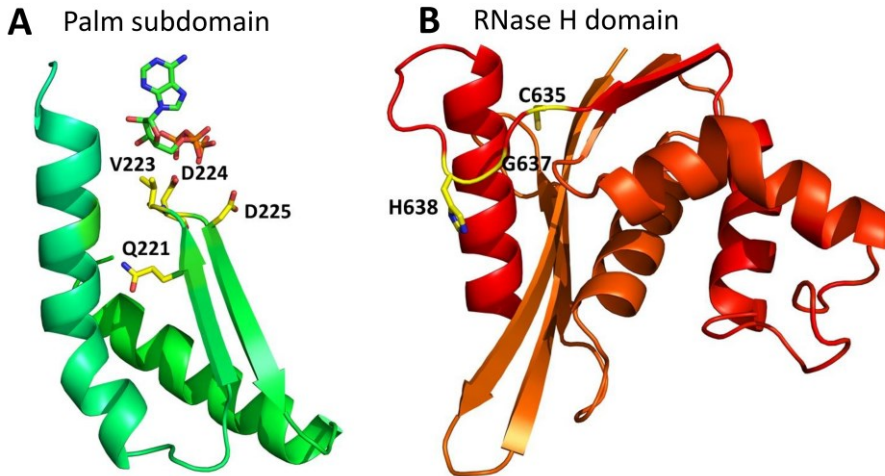


Fig. 16. Structural context of mutations, identified after selection of M-MuLV RT variants with altered kinetic properties. The palm subdomain (A) is colored in green and the RNase H domain (B) is in red.

The active center substitutions of valine to methionine and alanine, together with another mutation Q221R, found during the selection, along with double active center mutants, were analyzed in detail by determining processivity, fidelity, affinity to the DNA/RNA substrate, as well as kinetic properties (K_m , k_{cat} and V_{max}). It was shown that substrate affinity and processivity of the active center mutants Q221R, V223A, and V223M, as well as double mutants, were very similar to the corresponding characteristics of the wild-type enzyme and fall within the range of a 2-fold difference (Table 3). This could suggest that the aforesaid features do not explain how the enzyme has survived the evolutionary pressure during the selection experiment.

The error rate measurement experiment revealed that the effect of mutations V223A and V223M in the active site motif YXDD is negligible. On the contrary, another most frequently identified mutation Q221R results in ~5-fold decrease of enzyme fidelity (Fig. 14). Interestingly, double mutants Q221R/V223A and Q221R/V223M have up to two times better fidelity compared to the single point mutant Q221R. This observation suggests, that substitution of glutamine to arginine side chain at Q221 results in some steric hindrance at catalytic center of RT, which could be partially compensated by second replacement of neighboring branched side chain of V221 to the small side chain of alanine (V221A) or unbranched side chain of methionine (V223M) (Fig. 16).

However, the most intriguing changes were found during the analysis of the steady-state kinetics of the mutant enzymes. The experiment shows that the steady-state K_m value of the wildtype M-MuLV RT is 0.7 mM, whereas the mutant variants of RTs containing substitutions Q221R, V223A, and V223M, along with the double mutants, exhibit a 4–5-fold decrease in K_m for dNTPs (Table 3). The 0.2 mM dNTP concentration in the conventional Taq buffer used during the *in vitro* evolution experiment was significantly lower than the K_m value of the wild-type enzyme (0.7 mM) and presented a certain evolutionary force for mutants to be selected. Combined with a stepwise shortening of the reverse transcription time during the screening cycles, this has led to the selection of mutant enzymes that are able to synthesize cDNA faster and at a lower concentration of dNTP substrate. The K_m value of the selected mutant RTs was found to be < 0.2 mM (Table 3). The selection of RT mutants with a lower K_m value is an obvious adaptation of enzymes to specific screening conditions.

Taken together, this *in vitro* evolution experiment is in surprising agreement with the natural process of evolution. The lower dNTP concentrations and shortened reaction times acted as an evolutionary force. In order to survive under these new circumstances, the M-MuLV RT has modified its active centers. In the case of mutation V223M, the active center of oncoretroviral M-MuLV RT was rendered to resemble the active center of the lentiviral RTs. Lentiviruses, such as human, feline, or simian immunodeficiency viruses, are able to infect nondividing terminally differentiated cells (macrophages), whereas the oncoretroviruses, such as M-MuLV, replicate in dividing cells. It is known that the dividing cells have a relatively high dNTP concentration, contrary to the nondividing cells (59). For example, the cellular dNTP concentration in human macrophages is ~20 times lower than in activated T cells (60). Thus, the oncoretroviral M-MuLV RT changed its phenotype to lentiviral RT-type and became able to replicate in low dNTP concentration, as a result of selection during the *in vitro* evolution experiment.

CONCLUSIONS

1. The stability of the ternary complex used in the CRD method critically depends on the concentration of Mg^{2+} ions and temperature. The change in the optimal Mg^{2+} concentration and temperature leads to destabilization and disassembly of the TC. This indicates that during the selection experiment, reactions start in real time and without steric restrictions.
2. The control experiment, performed using a mixture of active and inactive enzyme variants, showed that the enrichment factor during one selection cycle is ~50-fold. This suggests that the library of mutants could be efficiently enriched with active members during the selection experiment.
3. The selection of thermostable M-MuLV AT mutants and subsequent analysis of their biochemical properties revealed that thermostability is achieved due to tighter binding between the protein and the DNA/RNA substrate. Some mutants also showed an increase in the intrinsic stability of the protein. Additionally, the elimination of RNase H activity was observed during the selection experiment.
4. The selection of M-MuLV AT mutants efficiently synthesizing cDNA in Taq polymerase buffer and subsequent analysis of their biochemical properties revealed that selected mutants exhibited significantly lower K_m values for the dNTP substrate. Furthermore, the elimination or reduction of the RNase H activity was predominant. Additionally, the internal stabilization of some of the proteins was observed.

REFERENCES

1. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning*. 4th ed. New York: Cold Spring Laboratory Press; 2012.
2. Mills D, Peterson RL, Spiegelman S. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967; 58(1): p. 217-224.
3. Suzuki M, Baskin D, Hood L, Loeb LA. Random mutagenesis of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: concordance of immutable sites in vivo with the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(18): p. 9670-9675.
4. Kim B. Genetic Selection in *Escherichia coli* for Active Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase Mutants. *Methods*. 1997; 12(4): p. 318-324.
5. Söte S, Kleine S, Schlicke M, Brakmann S. Directed evolution of an error-prone T7 DNA polymerase that attenuates viral replication. *Chembiochem*. 2011; 12(10): p. 1551-1558.
6. Ghadessy FJ, Holliger P. A novel emulsion mixture for in vitro compartmentalization of transcription and translation in the rabbit reticulocyte system. *Protein Eng Des Sel*. 2004; 17(3): p. 201-204.
7. Xia G, Chen L, Sera T, Fa M, Schultz PG, Romesberg FE. Directed evolution of novel polymerase activities: mutation of a DNA polymerase into an efficient RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(10): p. 6597-6602.
8. Ullman CG, Frigotto L, Cooley NR. In vitro methods for peptide display and their applications. *Brief Funct Genomics*. 2011; 10(3): p. 125-134.
9. Skirgaila R, Pudžaitis V, Palikša S, Vaitkevičius M, Janulaitis A. Compartmentalization of destabilized enzyme–mRNA–ribosome complexes generated by ribosome display: a novel tool for the directed evolution of enzymes. *Protein Eng Des Sel*. 2013; 26(7): p. 453-461.
10. Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(10): p. 4937-4942.
11. Anzalone AV, Peyton B, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019; 576: p. 149–157.

12. Pengpeng L, Ponninselvam K, Nyalile T, Oikemus S, Joynt AT, Iyer S, et al. Increasing intracellular dNTP levels improves prime editing efficiency. *Nat Biotechnol.* 2024; 43: p. 539-544.
13. Sarkar G, Sommer SS. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques.* 1990; 8(4): p. 404-407.
14. Baranauskas A, Paliksa S, Alzbutas G, Vaitkevicius M, Lubiene J, Letukiene V, et al. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Eng Des Sel.* 2012; 25(10): p. 657-668.
15. Smolarsky M, Tal M. Novel method for measuring polyuridylic acid binding to ribosomes. *Biochim Biophys Acta.* 1970; 199(2): p. 447-452.
16. Palikša S, Alzbutas G, Skirgaila R. Decreased Km to dNTPs is an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption required to perform efficient cDNA synthesis in One-Step RT-PCR assay. *Protein Eng Des Sel.* 2018; 31(3): p. 79-89.
17. Lim D, Gregorio GG, Bingman C, Martinez-Hackert E, Hendrickson WA, Goff SP. Crystal structure of the Moloney murine leukemia virus RNase H domain. *J Virol.* 2006; 80(17): p. 8379-8389.
18. Nowotny M, Gaidamakov SA, Ghirlando R, Cerritelli SM, Crouch RJ, Yang W. Structure of Human RNase H1 complexed with an RNA/DNA hybrid: insight into HIV reverse transcription. *Mol Cell.* 2007; 28(2): p. 264-276.
19. Shatsky M, Nussinov R, Wolfson HJ. A method for simultaneous alignment of multiple protein structures. *Proteins.* 2004; 56(1): p. 143-156.
20. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993; 234(3): p. 779-815.
21. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010; 5(4): p. 725-738.
22. Goodwin KD, Lewis MA, Tanious FA, Tidwell RR, Wilson DW, Georgiadis MM, et al. A high-throughput, high-resolution strategy for the study of site-selective DNA binding agents: analysis of a "highly twisted" benzimidazole-diamidine. *J Am Chem Soc.* 2006; 128(24): p. 7846-7854.

23. Das D, Georgiadis MM. The Crystal Structure of the Monomeric Reverse Transcriptase from Moloney Murine Leukemia Virus. *Structure*. 2004; 12(5): p. 819-829.
24. Georgiadis MM, Jessen SM, Ogata CM, Telesnitsky A, Goff SP, Hendrickson WA. Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure*. 1995; 3(9): p. 879-892.
25. Ren J, Bird LE, Chamberlain PP, Stewart-Jones GB, Stuart DI, Stammers DK. Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(22): p. 14410-14415.
26. Ren J, Esnouf R, Garman E, Somers D, Ross C, Kirby I, et al. High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat Struct Biol*. 1995; 2(4): p. 293-302.
27. Das K, Bauman JD, Clark Jr AD, Frenkel YV, Lewi PJ, Shatkin AJ, et al. High-resolution structures of HIV-1 reverse transcriptase/TMC278 complexes: Strategic flexibility explains potency against resistance mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(5): p. 1466-1471.
28. Sellner LN, Coelen R, Mackenzie JS. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20(7): p. 1487-1490.
29. Chandler DP, Wagnon CA, Bolton HJ. Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(2): p. 669-677.
30. Suslov O, Steindler DA. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(20): p. e181.
31. Singh K, Kaushik N, Jin J, Madhusudanan M, Modak MJ. Role of Q190 of MuLV RT in ddNTP resistance and fidelity of DNA synthesis: a molecular model of interactions with substrates. *Protein Eng*. 2000; 13(9): p. 635-643.
32. Potter RJ, Lee JE, Smith MD, Dhariwal G, Gerard GF, Rosenthal K, inventors; Thermostable reverse transcriptases and uses thereof. US patent WO/2004/024749. 2004 Mar 25.
33. Chen L, Setterquist R, Latham G, inventors; Recombinant reverse transcriptases. US patent US20050232934. 2005 Oct 20.

34. Hogrefe H, Arezi B, Xing W, inventors; Mutant reverse transcriptase and methods of use. WO patent WO2007022045. 2007 Feb 22.
35. Liu S, Goff SP, Gao G. Gln84 of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase regulates the incorporation rates of ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *FEBS Lett.* 2006; 580(5): p. 1497-1501.
36. Arezi B, Hogrefe H. Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(2): p. 473-481.
37. Arezi B, McCarthy M, Hogrefe H. Mutant of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase exhibits higher resistance to common RT-qPCR inhibitors. *Anal Biochem.* 2010; 400(2): p. 301-303.
38. Yasukawa K, Mizuno M, Konishi A, Inouye K. Increase in Thermal Stability of Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase by Site-directed Mutagenesis. *J Biotechnol.* 2010; 150(3): p. 299-306.
39. Gerard GF, Potter JR, Smith MD, Rosenthal K, Dhariwal G, Lee J, et al. The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(14): p. 3118-3129.
40. Yasukawa K, Nemoto D, Inouye K. Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *J. Biochem.* 2008; 143(2): p. 261 - 268.
41. Kaushik N, Chowdhury K, Pandey VN, Modak MJ. Valine of the YVDD motif of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: role in the fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry.* 2000; 39(17): p. 5155-5165.
42. Halvas EK, Svarovskaia ES, Pathak VK. Development of an in vivo assay to identify structural determinants in murine leukemia virus reverse transcriptase important for fidelity. *J Virol.* 2000; 74(1): p. 312-319.
43. Halvas EK, Svarovskaia ES, Freed EO, Pathak VK. Wild-type and YMDD mutant murine leukemia virus reverse transcriptases are resistant to 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *J Virol.* 2000; 74(14): p. 6669-6674.
44. Radzvilavicius T, Lagunavicius A. Selective inactivation of M-MuLV RT RNase H activity by site-directed PEGylation: an improved ability to synthesize long cDNA molecules. *N Biotechnol.* 2012; 29(3): p. 285-292.
45. Lim D, Orlova M, Goff SP. Mutations of the RNase H C helix of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase reveal defects in polypurine tract recognition. *J Virol.* 2002; 76(16): p. 8360-8373.

46. Konishi A, Hisayoshi T, Yokokawa K, Barrioluengo V, Menéndez-Arias L, Yasukawa K. Amino acid substitutions away from the RNase H catalytic site increase the thermal stability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase through RNase H inactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 454(2): p. 269-274.
47. Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol.* 1997; 8(1): p. 61-77.
48. Agresti A, Coull BA. Approximate Is Better than "Exact" for Interval Estimation of Binomial Proportions. *Am Stat.* 1998; 52(2): p. 119-126.
49. Lahr DJG, Katz LA. Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase: Research Reports. *BioTechniques.* 2009; 47(4): p. 857-866.
50. Omelina ES, Ivankin AV, Letiagina AE, Pindyurin AV. Optimized PCR conditions minimizing the formation of chimeric DNA molecules from MPRA plasmid libraries. *BMC Genomics.* 2019; 20(7): p. 536.
51. Kalle E, Kubista M, Rensing C. Multi-template polymerase chain reaction. *Biomol Detect Quantif.* 2014; 2: p. 11-29.
52. Baba M, Kakue R, Leucht C, Rasor P, Walch H, Ladiges D, et al. Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination. *Protein Eng Des Sel.* 2017; 30(8): p. 551-557.
53. Katano Y, Li T, Baba M, Nakamura M, Ito M, Kojima K, et al. Generation of thermostable Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase variants using site saturation mutagenesis library and cell-free protein expression system. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017; 81(12): p. 2339-2345.
54. Sakaguchi M, Matsuzaki M, Niimiya K, Seino J, Sugahara Y, Kawakita M. Role of Proline Residues in Conferring Thermostability on Aqualysin I. *J Biochem.* 2007; 141(2): p. 213-220.
55. Óskarsson KR, Sævarsson AF, Kristjánsson MM. Thermostabilization of VPR, a kinetically stable cold adapted subtilase, via multiple proline substitutions into surface loops. *Sci Rep.* 2020; 10(1): p. 1045.
56. Cote ML, Roth MJ. Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase: Structural Comparison with HIV-1 Reverse Transcriptase. *Virus Research.* 2008; 134(1-2): p. 186-202.

57. Sharma PL, Nurpeisov V, Schinazi FR. Retrovirus reverse transcriptases containing a modified YXDD motif. *Antivir Chem Chemother.* 2005; 16(3): p. 169-182.
58. Baluda MA, Reddy EP. Anatomy of an integrated avian myeloblastosis provirus: structure and function. *Oncogene.* 1994; 9(10): p. 2761-2774.
59. Skasko M, Weiss KK, Reynolds HM, Jamburuthugoda V, Lee K, Kim B. Mechanistic differences in RNA-dependent DNA polymerization and fidelity between murine leukemia virus and HIV-1 reverse transcriptases. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(13): p. 12190-12200.
60. Diamond TL, Roshal M, Jamburuthugoda VK, Reynolds HM, Merriam AR, Lee KY, et al. Macrophage tropism of HIV-1 depends upon efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase. *J Biol Chem.* 2004; 279(49): p. 51545–51553.

DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ DARBŲ SĄRAŠAS

1. A. Baranauskas*, **S. Palikša***, G. Alzbutas, M. Vaitkevičius, J. Lubienė, V. Letukienė, S. Burinskas, G. Sasnauskas ir R. Skirgaila, „Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants,“ *Protein Eng Des Sel*, t. 25, nr. 10, pp. 657-668, 2012.

S. Palikša atliko dalies taškinių ir daugybinių mutantų konstravimą, baltymų gryninimą ir ištyrė šias baltymų savybes – sąveikos su substratu stiprumą, procesyvumą, aktyvumą bei kDNR sintezę įvairiose temperatūrose ir tikslumą. S. Palikša ir A. Baranauskas yra šios publikacijos pirmieji bendraautoriai.

2. R. Skirgaila, V. Pudžaitis, **S. Palikša**, M. Vaitkevičius ir A. Janulaitis, „Compartmentalization of destabilized enzyme–mRNA–ribosome complexes generated by ribosome display: a novel tool for the directed evolution of enzymes,“ *Protein Eng Des Sel*, t. 26, nr. 7, pp. 453-461, 2013.

S. Palikša pritaikė baltymų sąveikos su nitroceliuliozės membrana metodą ribosominio komplekso stabilumo tyrimams ir atliko stabilumo tyrimus.

3. **S. Palikša**, G. Alzbutas ir R. Skirgaila, „Decreased K_m to dNTPs is an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption required to perform efficient cDNA synthesis in One-Step RT-PCR assay,“ *Protein Eng Des Sel*, t. 31, nr. 3, pp. 79-89, 2018.

S. Palikša įvykdė *in vitro* evoliucijos eksperimentą, sukonstravo visus taškinius ir daugybinius mutantus, atliko baltymų gryninimą ir ištyrė visas publikacijoje aprašytas baltymų savybes.

* - pirmieji bendraautoriai

Disertacijoje aprašyti darbai pristatyti šiose mokslinėse konferencijose:

S. Palikša. Decreased K_m to dNTP's is an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption required to perform efficient cDNA synthesis in one-step RT-PCR assay. The COINS, 2018 vasario 28 – kovo 2, Vilnius. Stendinis pranešimas.

S. Palikša ir A. Baranauskas. Generation of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. Day of Science, Thermo Fisher Scientific, 2013 spalio 7-8, Vilnius. Stendinis pranešimas.

GYVENIMO IR MOKSLINĖS VEIKLOS APRAŠYMAS

Sigitas Palikša

Asmeninė informacija

Kontaktinė informacija El. paštas: sigitas.paliksa@diagnolita.lt
sigitas.paliksa@gmail.com
Tel. nr: +37065189663
UAB Diagnolita, Saulėtekio al. 7C, 10257, Vilnius

Išsilavinimas

2008-2012 Doktorantūros studijos VU Biotechnologijos institute
2005-2007 Biochemija (Magistras) VU Chemijos fakultetas
2001-2005 Biochemija (Bakalauras) VU Chemijos fakultetas
1989-2001 Ignalinos raj. Linkmenų vidurinė mokykla

Darbo patirtis

2013 12 – iki dabar UAB Diagnolita, vyresnysis mokslo darbuotojas
2010 – 2013 12, Thermo Fisher Scientific, mokslo darbuotojas
2007 06 – 2010, UAB Fermentas, jaunesnysis mokslo darbuotojas
2005 07 – 2007 06, UAB Fermentas, stažuotojas

Kursai ir seminarai

Neatitikčių valdymas medicinos laboratorijose taikant LST EN ISO 15189:2013 ir V-1327 reikalavimus, 2022 balandžio 13, Vilnius.
Medicinos laboratorijų licencijavimui keliami reikalavimai. Teisės aktų V-1327, V-2572 reikalavimų praktinis taikymas, 2021 spalio 20, Vilnius.
SynGen Series UK, 2019 lapkričio 7-8, Londonas, Jungtinė Karalystė.
Biomedicininė diagnostika: mokslas ir praktika, 2019 gegužės 9, Vilnius.
Exosomes and Liquid Biopsies Europe, 2018 spalio 24-26, Roterdamas, Nyderlandai.
Kokybės vadybos sveikatos sistemoje pagrindai ir vidaus medicininis auditas, 2018 balandžio 16-18, Vilnius.
4BIO summit, 2017 gruodžio 4-5, Londonas, Jungtinė Karalystė.
9th Annual Next Generation Sequencing Congress & Clinical Diagnostics Congress, 2017 lapkričio 9-10, Londonas, Jungtinė Karalystė.

8th Annual Next Generation Sequencing Congress, 4th Annual Single Cell Analysis Congress, 2016 lapkričio 10-11, Londonas, Jungtinė Karalystė.
Novel Technologies for In Vitro Diagnostics, 2014 spalio 6-8, Levenas, Belgija.

Pranešimai mokslinėse konferencijose

Urine RNA sequencing to find biomarkers for high-risk prostate cancer prediction. The 28th Meeting of the EAU Section of Urological Research. 2022 spalio 13-15, Insbrukas, Austrija. Stendinis pranešimas su bendraautoriais.

Evaluation of urine biomarkers for high risk prostate cancer diagnostics. 7th Baltic meeting in conjunction with the EAU. 2022 gegužės 27-28, Vilnius, Lietuva. Stendinis pranešimas su bendraautoriais.

Decreased Km to dNTP's is an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption required to perform efficient cDNA synthesis in one-step RT-PCR assay. The COINS, 2018 vasario 28 – kovo 2, Vilnius. Stendinis pranešimas.

Generation of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. Day of Science, Thermo Fisher Scientific, 2013 spalio 7-8, Vilnius. Stendinis pranešimas.

Mokslinės publikacijos

Lopeta M, Paliksa S, Belevicius J, Ukanis M, Kasiliauskiene L, Dziuge L, Zutautaitė-Varela I, Barisiene M, Bakavicius A, Mickevicius R, Zyklus A, Ulys A, Juodele L, Jankevicius F, Jievaltas M, Gagilas J. Comparison of prostate cancer diagnostic models based on PCA3 and TMPRSS2:ERG RNA biomarkers from post-DRE and non-DRE urine specimens. *World J Urol.* 2026 Apr 13;44(1):303.

Palikša S, Lopeta M, Belevičius J, Kurmauskaitė V, Ašmenavičiūtė I, Perečkaitė L, Vitkauskienė A, Baliūtytė I, Valentaitė M, Mickienė A, Gagilas J. Saliva Testing is a Robust Non-Invasive Method for SARS-CoV-2 RNA Detection. *Infect Drug Resist.* 2021 Jul 27;14:2943-2951.

Palikša S, Alzbutas G, Skirgaila R. Decreased Km to dNTPs is an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption required to perform efficient cDNA synthesis in One-Step RT-PCR assay. *Protein Eng Des Sel.* 2018 Mar 1;31(3):79-89.

Skirgaila R, Pudzaitis V, Paliksa S, Vaitkevicius M, Janulaitis A. Compartmentalization of destabilized enzyme-mRNA-ribosome complexes generated by ribosome display: a novel tool for the directed evolution of enzymes. *Protein Eng Des Sel.* 2013 Jul;26(7):453-61.

Baranauskas A, Paliksa S, Alzbutas G, Vaitkevicius M, Lubiene J, Letukiene V, Burinskas S, Sasnauskas G, Skirgaila R. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Eng Des Sel.* 2012 Oct;25(10):657-68.

Kita mokslinė veikla

Biomedicininis tyrimas „SARS-CoV-2 viruso nustatymo seilių mėginiuose tyrimas“, CoV-2020-1, leidimo Nr. BE-2-72, tyrimas vykdytas 2020-10 – 2021-03, tyrėjo pareigos.

Biomedicininis tyrimas „Prostatos vėžio diagnostika“, 2015-PVD, leidimo Nr. L-15-06/1, tyrimas vykdytas 2015-07 – 2018-12, tyrėjo pareigos.

Biomedicininis tyrimas „Epigenetiniai kraujyje laisvai cirkuliuojančios DNR žymenys ankstyvajai vėžio atkryčio diagnostikai“, *EpiCancer2023*, leidimo Nr. 2023/5-1519-975, tyrimas vykdomas nuo 2023 05 09, pagrindinio tyrėjo pareigos.

Pedagoginė veikla

Vadovavimas 2 bakalauro baigiamiesiems darbams ir 2 magistro baigiamiesiems darbams.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 25 egz.