

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos fakultetas

Biochemijos studijų programos IV kurso studentas

Martynas GRIGALIŪNAS

Bakalaurinis darbas

**Žmogaus prioninio baltymo toksiškumo vėžinėms ląstelėms
įvertinimas**

Darbo vadovė

Dr. V. Petrikaitė

Konsultantas

Dr. V. Smirnovas

Vilnius, 2014

Žmogaus prioninio baltymo toksiškumo vėžinėms ląstelėms įvertinimas

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute Biotermodinamikos ir vaistų
tyrimų skyriuje

Martynas Grigaliūnas

Darbo vadovas:

dr. Vilma Petrikaitė

Konsultantas:

dr. Vytautas Smirnovas

Turinys

Santrumpos	5
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Priono baltymo struktūra	8
1.1.1. Oktapeptidiniai pasikartojimai	9
1.1.2. C galo domenai	9
1.2. Prionizacijos mechanizmai	10
1.3. PrP ^{Sc} struktūros modeliai	11
1.4. Prionų kamienai	11
1.5. Prioninės ligos	12
1.5.1. Spontaninė Creutzfeldt-Jakob liga	12
1.5.2. Genetinė Creutzfeldt-Jakob liga	13
1.5.3. Gerstmann-Strausser-Scheinker sindromas	13
1.5.4. Mirtina nemiga	14
1.5.5. Kuru	14
1.5.6. Jatrogeninė Creutzfeldt-Jakob liga	14
1.5.7. Naujo varianto Creutzfeldt-Jakob liga	15
1.6. Amiloidinio PrP toksiškumo tyrimai <i>in vivo</i>	15
1.7. Amiloidinio PrP toksiškumo tyrimai <i>in vitro</i>	16
1.8. Įžvalgos apie toksiškumo mechanizmus	17
1.9. Rekombinantinio prioninio baltymo gryninimas	17
1.9.1. Giminingumo chromatografija	18
1.9.2. Histidinių sekos nukirpimas trombinu	18
1.9.3. Jonų mainų chromatografija	18
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	20
2.1. Naudotos medžiagos, terpės, tirpalai ir įranga	20
2.1.1. Naudotos medžiagos	20
2.1.2. Fermentai	20
2.1.3. Sorbentai	20
2.1.4. Mitybinės terpės	20
2.1.5. Buferiniai tirpalai naudoti baltymų gryninime	21
2.1.6. Dažai ląstelių gyvybingumui nustatyti	22
2.1.7. Ląstelės	22
2.1.8. Naudota laboratorinė įranga	22

2.2.	Metodai.....	23
2.2.1.	Kompetentinių ląstelių transformacija.....	23
2.2.2.	Biomasės auginimas ir indukcija.....	24
2.2.3.	Baltymų elektroforezė.....	24
2.2.4.	Baltymo gryninimas.....	25
2.2.5.	Mėginio elektroniniam mikroskopui paruošimas.....	26
2.2.6.	<i>De novo</i> fibrilių susidarymas žemoje temperatūroje.....	26
2.2.7.	<i>De novo</i> fibrilių susidarymas aukštoje temperatūroje.....	26
2.2.8.	Fibrilių paruošimas toksiškumo tyrimams.....	26
2.2.9.	Fibrilių toksiškumo tyrimas MTT metodu.....	27
2.2.10.	Fibrilių toksiškumo tyrimas fluorescencinės mikroskopijos metodu.....	27
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	29
3.1.	huPrP23-231 baltymo gryninimas.....	29
3.1.1.	<i>E. coli</i> transformacija ir huPrP23-231 raiška.....	29
3.1.2.	Giminingumo chromatografija.....	30
3.1.3.	Jonų mainų chromatografija.....	31
3.2.	huPrP23-231 ir huPrP90-231 amiloidinių fibrilių <i>de novo</i> gaminimas.....	32
3.3.	Toksiškumo vėžinėms ląstelėms tyrimas MTT metodu.....	32
3.4.	Toksiškumo vėžinėms ląstelėms tyrimas fluorescencinės mikroskopijos metodu.....	35
	IŠVADOS.....	38
	SUMMARY.....	39
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	40

Santrumpos

BMR	branduolių magnetinis rezonansas
CJL	Creutzfeldt-Jakob liga
EPR	elektronų paramagnetinis rezonansas
FBS	fetalinis veršiukų serumas
FTIR	Furje transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija
gCJL	genetinė Creutzfeldt-Jakob liga
GSE	galvijų spongiforminė encefalopatija
GSS	Gerstmann-Strausser-Scheinker sindromas
huPrP23-231	rekombinantinis žmogaus priono baltymas be signalinių sekų
huPrP90-231	rekombinantinis žmogaus priono baltymas be signalinių sekų ir N galinio domeno
IMAC	imobilizuotų metalo jonų afininė chromatografija
jCJL	įatrogeninė Creutzfeldt-Jakob liga
MAPK	mitogenų aktyvuojama baltymų kinazė
MN	mirtina nemiga
moPrP89-231	rekombinantinis pelės priono baltymas be signalinių sekų ir N galinio domeno
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas
N-CAM	neuroninių ląstelių adhezijos molekulė (angl. <i>neuronal-cell adhesion molecule</i>)
NDS-PAGE	natrio dodecilsulfato poliakrilamidinė gelelektroforezė
p59Fyn	tirozino kinazė, siejama su T ląstelių receptoriais
PK	proteinazė K
PMCA	neteisingai susilanksčiusio baltymo ciklinis padauginimas (angl. <i>Protein Misfolding Cyclic Amplification</i>)
PRNP	žmogaus priono baltymo genas (pelės – <i>Prnp</i>)
PrP ^C /PrP ^{Sc}	natūrali ir užkrečiama prioninio baltymo formos
PrP ^{sen} /PrP ^{res}	proteinazei K jautri ir nejautri prioninio baltymo formos
rPrP	rekombinantinis priono baltymas
sCJL	spontaninė Creutzfeldt-Jakob liga

SE	spongiforminė encefalopatija
SK-N-BE2	žmogaus neuroblastomos ląstelių linija
Sti1	streso indukuojamas baltymas 1 (angl. <i>stress-inducible protein 1</i>)
ThT	tioflavinas T
U87	žmogaus glioblastomos ląstelių linija
vCJL	naujo varianto Creutzfeldt-Jakob liga

ĮVADAS

Pavadinimas prionas (angl. *prion*) yra kilęs iš angliško termino *proteinaceous infectious particle* (liet. užkrečiama baltyminė dalelė). Šis baltymas egzistuoja keliose formose, kurios viena nuo kitos skiriasi tretine struktūra. Visos formos yra suskirstytos į proteinazės K skaidomas – PrP^{sen} (nuo angl. *sensitive*), arba PrP^C (nuo angl. *cellular*), ir į proteinazei K atsparias – PrP^{res} (nuo angl. *resistant*), arba PrP^{Sc} (nuo angl. *scrapie*). PrP^C randamas įvairių audinių ląstelių plazminės membranos išorinėje pusėje, prie kurios yra prijungtas per glikofosfatidilinozitolio inkarą. Nors jo funkcija nėra galutinai suprasta, maža tarprūšinė geno divergencija (van Rheede *et al.*, 2003) bei griežtai reguliuojama geno raiška imuninių ląstelių diferenciacijos ir aktyvacijos laikotarpiais parodo šio baltymo fiziologinę svarbą. Baltymas taip pat geba prisijungti vario jonus, todėl gali dalyvauti vario jonų homeostazės palaikyme. PrP^{Sc} turi pakitusią tretinę struktūrą ir yra įvairių ligų sukėlėjas, kurių bendras pavadinimas – spongiforminės encefalopatijos (SE). Tarp SE patenka Creutzfeldt-Jakob liga (CJL), Gerstmann-Strausser-Scheinker sindromas (GSS), Kuru ir mirtina nemiga (MN). PrP^{Sc} pasižymi išskirtiniu gebėjimu pakeisti normalios konformacijos baltymą į proteinazei K atsparią formą. Šiuos konformacinius pokyčius seka amiloidinių agregatų susidarymas bei neuronų žūtis. Amiloidinių fibrilių, panašių į PrP^{Sc}, galima pasigaminti iš rekombinantinio baltymo, panaudojant denatūrantus (urėją arba guanidiną). *De novo* pagamintos fibrilės taip pat gali vykdyti savireplikaciją ir yra atsparios proteinazei K, tačiau dažniausiai yra neinfektyvios (Weissmann, 2005).

Šio bakalaurnio darbo tikslas buvo ištirti rekombinantinio žmogaus priono baltymo (huPrP23-231) fibrilių toksiškumą žmogaus vėžinėms ląstelėms.

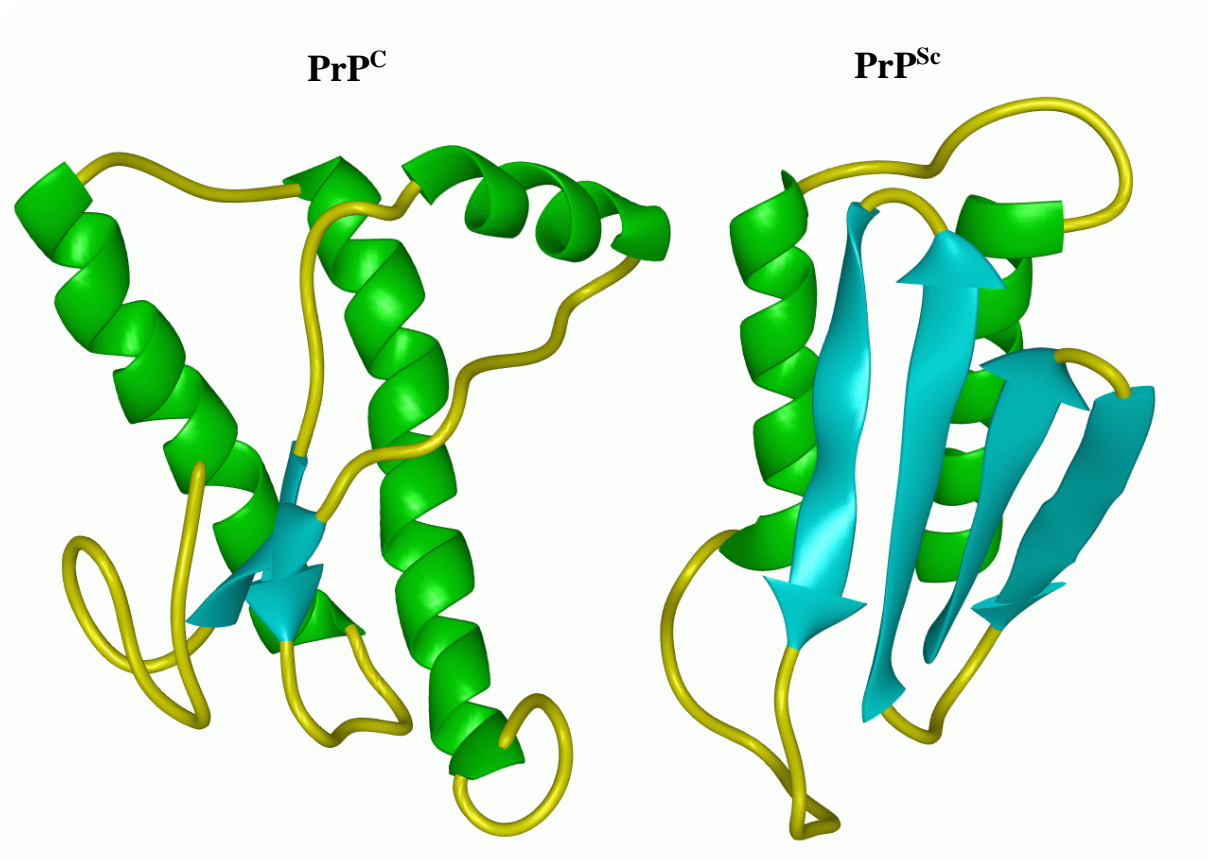
Darbo uždaviniai:

1. Patobulinti huPrP23-231 baltymo gryninimo metodiką ir gauti didesnę jo išėigą.
2. Pasigaminti huPrP23-231 fibrilių įvairiomis sąlygomis.
3. Ištirti fibrilių poveikį vėžinėms ląstelėms.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Priono baltymo struktūra

Priono baltymo genas (PRNP – žmogaus, *Prnp* – pelės) žmoguje randamas 20-oje chromosomoje, pelėje – 2-oje chromosomoje. Genas sudarytas iš dviejų egzonų (pelėje iš trijų), tačiau visa 253-jų aminorūgščių baltymo seka koduojama 2-ajame egzone (Lloyd *et al.*, 2011). Posttransliacinių modifikacijų metu, pirma nukerpamas signalinis peptidas nuo N galo (23 aminorūgštys), o vėliau, kai prikabinamas glikofosfatidilinozitolio inkaras, nukerpamas ir nuo C galo (23 aminorūgštys). Priono baltymas turi vieną disulfidinį tiltelį tarp Cys179 ir Cys214. Subrendęs ląstelės paviršiaus baltymas turi nestruktūrizuotą domeną N gale, kuriame yra 5 oktapeptidiniai pasikartojimai, ir α -spiralizuotą C galinį domeną su dviem glikozilinimo taikiniais (Asn181 ir Asn197) (1.1 pav.). Glikozilinimas skiriasi tarp skirtingų ląstelių rūšių (Lloyd *et al.*, 2011).



1.1 pav. Dvi žmogaus prioninio baltymo formos. PrP^C yra normalios konformacijos baltymas, o PrP^{Sc} yra infektyvi baltymo forma, turinti žymiai daugiau β klosčių (pagal bio.davidson.edu, 2003)

1.1.1. Oktapeptidiniai pasikartojimai

Didžiąją dalį N galo domeno sudaro oktapeptidiniai pasikartojimai, turtingi prolinu ir glicinu. Šis regionas evoliucijos metu išliko konservatyvus, tačiau pasikartojimų skaičius gali skirtis tarp rūšių. Žmogaus PrP turi keturias idealiai sutampančias sekas PHGGGWGQ (60-91 aminorūgštis) ir penktąją, kurioje histidinas pakeistas glutaminu. Specifinėse sąlygose (pvz. kai yra susirišę su ligandais) šie pasikartojimai įgauna dalinai tvarkingą struktūrą. Tai leidžia nustatyti jų tretinę struktūrą (Surewicz ir Apostol, 2011).

Tyrimuose buvo nustatyta, kad histidinas ir triptofanas, esantys pasikartojimuose, yra būtini Cu^{2+} jonų prisijungimui. Ištyrus peptido HGGGW kristalinę struktūrą rentgeno spinduliais, nustatyta, kad susidaro β linkis, apsupantis ir koordinuojantis Cu^{2+} joną per glicino pagrindinės grandinės azoto ir deguonies atomus bei histidino ir triptofano šonines grandines. Spektroskopinė analizė parodė, kad tokia HGGGW peptido struktūra gali būti pritaikyta visiems keturiems histidiną turintiems pasikartojimams.

Oktapeptidinis pasikartojimas be Cu^{2+} taip pat gali prisijungti polianijonus, tokius kaip glikozamino glikanai, heminas, oligonukleotidai ir nukleorūgštys (Linden *et al.*, 2008). Peptido be ligando branduolių magnetinio rezonanso (BMR) tyrimas parodė, kad fiziologinėmis sąlygomis nusistovi pusiausvyra tarp β linkio ir išsivyniojusios struktūros.

Oktapeptidinis pasikartojimas nėra būtinas priono infektyvumui. Tačiau yra duomenų apie jo svarbą spontaninei agregacijai, nors jis ir nepatenka į infektyvaus PrP^{Sc} β klosčių regioną. Papildomo oktapeptido įterpimas baigiasi paveldimomis prioninėmis ligomis. Tai buvo patvirtinta žmogaus priono baltymą ekspresuojančiai pelei į geną įterpus papildomą pasikartojimą koduojančią seką. Pelė susirgo spontanine neurodegeneracine liga. Taigi, nors oktapeptidai nėra būtini PrP^{Sc} patogeniškumui, jie atlieka svarbų vaidmenį spontanineje normalios baltymo konformacijos virsme į infektyvią (Surewicz ir Apostol, 2011).

1.1.2. C galo domenai

Jau išspręsta daugiau nei dvylika laukinio tipo ir įvairių sutrumpinto PrP^{C} baltymo BMR bei rentgeno spindulių difrakcinių vaizdų. Taip pat nustatyta bent 14-os kitų stuburinių PrP^{C} struktūros naudojant BMR. Šios struktūros parodo tris konservatyvias α spirales ir dvi β juostas, kurios sudaro antiparalelę β klostę. Antra ir trečia spirālės sudaro struktūros pagrindą ir yra sujungtos disulfidiniu tilteliu tarp Cys179 ir Cys214. PrP turi neįprastai mažą hidrofobinį

centrą. Paviršiuje yra daug hidrofiliųjų ir krūvį turinčių aminorūgščių (Surewicz ir Apostol, 2011).

Nepaisant to, kad skirtumai tarp įvairių gyvūnų rūšių priono baltymo yra labai nedideli, kilpa, esanti tarp antrosios β juostos ir antrosios α spiralės (žmoguje 165-175 aminorūgštys), yra ganėtinai variabili. Daugumos ši kilpa yra lanksti, tačiau elninių šeimos atstovų baltyme ji yra stabilios konformacijos. Tarprūšiniai tyrimai parodė, kad ligą perduoti gali tik tie individai, kurių kilpos yra panašios (Gossert *et al.*, 2005).

1.2. Prionizacijos mechanizmai

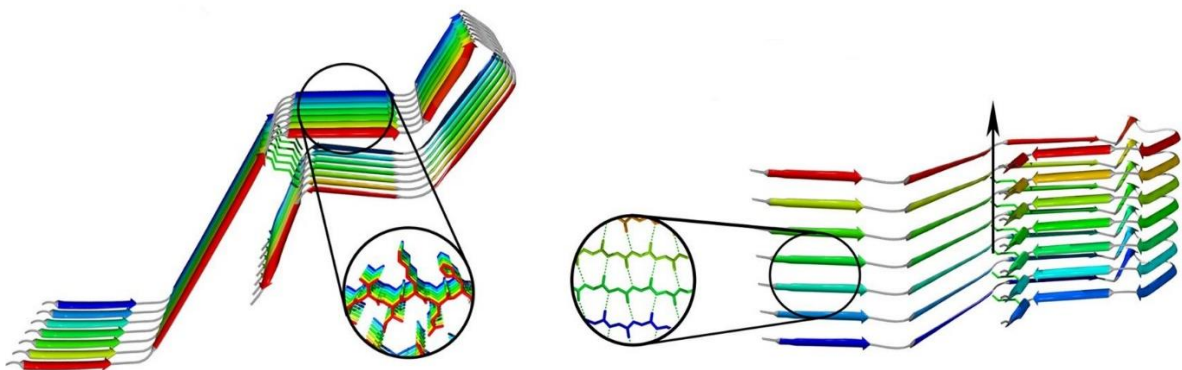
Šiuo metu egzistuoja du pasiūlyti mechanizmai, kaip galėtų vykti natyvaus PrP baltymo prionizacija (PrP^C virtimas PrP^{Sc}). Pagal heterodimerinį modelį (*heterodimer refolding model*), dar žinomą kaip paremtą šablonu, PrP^{Sc} egzistuoja kaip monomeras, termodinamiškai stabilesnis už PrP^C. Šis termodinamiškai stabilesnis konformeris yra kinetiškai nepasiekiamas. Tokio mechanizmo kritinis etapas yra PrP^{Sc} ir PrP^C (arba dalinai destabilizuoto PrP^C) heterodimero susidarymas (Prusiner, 1991). Tokiu atveju PrP^{Sc} būtų kaip šablonas, katalizuojantis PrP^C virtimą į termodinamiškai stabilesnį PrP^{Sc}. Nors toks mechanizmas yra įmanomas, nėra jokių duomenų apie stabilaus PrP^{Sc} monomero egzistavimą. Priešingai, visi duomenys rodo, kad prionizaciją inicijuojanti dalelė yra oligomerinės kilmės.

Modelis, suderinamas su PrP^{Sc} oligomerine prigimtimi, yra vadinamas nukleacinės polimerizacijos mechanizmu (*nucleated polymerization mechanism*). Pagal jį, konformaciniai pokyčiai tarp PrP^C ir PrP^{Sc} yra grįžtami, tačiau PrP^{Sc} monomeras yra daug mažiau stabilus už PrP^C. PrP^{Sc} stabilizuojasi tik susidarius oligomeriniam branduoliui, nors pati nukleacija yra termodinamiškai nepalanki. Nepaisant to, susiformavus branduoliui prie jo gali jungtis monomerinis PrP^C, keisdamas konformaciją į PrP^{Sc}. Tokio mechanizmo greitį ribojanti stadija yra ne konformaciniai pokyčiai, bet nukleacijos procesai. Šios stadijos, atsakingos už lag fazę, svarbą galima panaikinti pridėdant PrP^{Sc} sėklos (kitame eksperimente susidariusių PrP^{Sc} oligomerų) (Surewicz ir Apostol, 2011). Prionizacija *in vivo* ir *in vitro* gali būti pagreitinta, didelius PrP^{Sc} agregatus suardant į mažesnius. *In vitro* atveju, tam galima panaudoti ultragarso aparatą, o ląstelėje tokią funkciją atlieka šaperonai (Shorter ir Lindquist, 2006, Knowles *et al.*, 2009).

1.3. PrP^{Sc} struktūros modeliai

Furje transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos (FTIR) ir apskritimino dichroizmo tyrimais nustatyta, kad didelę dalį PrP^{Sc} sudaro β klostės. Anksčiau FTIR duomenų interpretacijos rodė, kad PrP^{Sc} išlaiko didžiąją dalį α spiralinės struktūros, tačiau naujausi tyrimai, atlikti Smirnovo *et al.* parodė, kad FTIR spektro juosta ties $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ priskirta α spiralėms yra ir rekombinantinio (rPrP) baltymo fibrilių spektre. Pastarosios fibrilės neturi α spiralių, todėl nuspręsta, kad ir PrP^C virsmo į PrP^{Sc} metu jų nebelieka (Requena ir Wille, 2014).

Tiesioginių duomenų apie pačios fibrilės ketvirtinę struktūrą nėra daug. Kryptingo vietos žymėjimo sukiniu (*site-directed spin labeling*) kartu su elektronų paramagnetinio rezonanso (EPR) spektroskopija buvo parodyta, kad fibrilėje, susidariusioje iš rekombinantinio baltymo, monomerų β klostės išsidėsto lygiagrečiai ir paraleliai viena kitai (1.3 pav.) (Cobb *et al.*, 2007). EPR tyrimas parodė, kad β klostyta struktūra rPrP^{Sc} prasideda tik nuo ~ 160 aminorūgšties ir tęsiasi iki C galo, tuo tarpu iš smegenų išskirto PrP^{Sc} β klostyta struktūra prasideda nuo ~ 90 aminorūgšties (Lloyd *et al.*, 2011, Surewicz ir Apostol, 2011). Šie duomenys patvirtino vandenilio pakeitimo deuteriu greičio tyrimų atliktų masių spektrometru rezultatus (Smirnovas *et al.*, 2009). Tokie skirtumai gali būti krūvių persiskirstymo pasekmė, nes rPrP nėra glikozilintas, o taip pat neturi ir glikozilfosfatidilinozitolio inkaro. Arba tokiai struktūrai susidaryti neleidžia *in vitro* fibrilių gamyboje naudojami denatūrantai (urėja arba guanidino hidrochloridas).



1.3 pav. Žmogaus prioninio baltymo fibrilės struktūra, sumodeliuota pasinaudojus EPR spektroskopijos duomenimis (pagal Cobb *et al.*, 2007).

1.4. Prionų kamienai

Prionai pasižymi savybe sudaryti kamienus. Kamienai – tai skirtingos amiloidinės fibrilės, turinčios tą pačią pirminę struktūrą. Kiekvienas kamienas sukelia kitokias SE ligas,

pasizyminčias savo inkubaciniu periodu, simptomais bei neurodegeneraciniu pobūdžiu (Gambetti *et al.*, 2011, Safar *et al.*, 1998). Atliekant tyrimus su Sirijos žiurkėnais, buvo parodyta, kad egzistuoja 8 kamienai, kuriais užkrėtus gyvūną išsivysto skirtingos SE formos (Safar *et al.*, 1998). Atliekant kamienų tyrimus tarprūšiniuose eksperimentuose, pastebėtas inkubacinio periodo pailgėjimas. Iš A rūšies išskirtu PrP^{Sc} užkrėtus B rūšies gyvūną, jam simptomai pasireikšdavo vėliau, nei užkrėtus tos pačios rūšies gyvūną. Tačiau iš taip užkrėsto B gyvūno išskyrus PrP^{Sc} ir juo užkrėtus jo rūšies atstovą, inkubacinis periodas sutrumpėdavo. Taip parodyta, kad tarprūšinio užkrėtimo metu kamienas mutuoja ir tik tada gali efektyviai vykti prionizacijos (fibrilių augimo) procesas (Afanasieva *et al.*, 2011). Įdomu tai, kad dažnai informacija apie pirminę kamieno struktūrą išlieka. Iš B rūšies gyvūno išskyrus PrP^{Sc} ir juo užkrėtus A rūšies atstovą, jo organizme pradeda augti fibrilės, savo struktūra identiškos pirminiam užkratui (Collinge ir Clarke, 2007).

1.5. Prioninės ligos

Priono baltymas, sudarydamas amiloidines fibriles, gali tapti toksiškas. Šiuo metu jau žinoma ne viena liga, kurią sukelia neteisingai susilankstęs priono baltymas. Jos vadinamos spongiforminėmis encefalopatijomis arba kitaip – kempinlige. Kempinligės pavadinimas kilo iš atsirandančių morfologinių pakitimų, kurie padaro smegenis panašias į kempinę. Ligos skirstomos į spontanine (85-90 %), paveldimas arba genetines (10-15 %) ir užkrečiamąsias (1-3 %). Spontaninė forma dar vadinama spontanine CJL (sCJL). Genetinės formos skaidomos į gCJL, GSS sindromą bei MN. Užkrečiamosioms ligoms priskiriama Kuru, jatrogeninė (jCJL) ir naujo varianto CJL (vCJL) (Takada ir Geschwind, 2013). Visoms ligoms būdingi spongiforminiai pokyčiai, neuronų žūtis, astrocitozė ir amiloidinės dėmės. Dėl morfologinių pakitimų išsivysto įvairūs psichikos sutrikimai. Paskutinėje stadijoje išsivysto silpnaprotystė ir mioklonijos (trumpi kūno ar jo dalių trūkčiojimai) (Collinge, 2001).

1.5.1. Spontaninė Creutzfeldt-Jakob liga

Spontaninė Creutzfeldt-Jakob liga susergama ne dėl genetinių mutacijų ar užkrato iš išorės. Ji išsivysto dėl atsitiktinių baltymo konformacijų kitimo ir organizmo nesugebėjimo laiku suardyti besiformuojančių prionizacijos centrų (Takada ir Geschwind, 2013). Žmonių jautrumą šiai ligai lemia PRNP geno, koduojančio priono baltymą, 129 kodono polimorfizmas. Heterozigotai, turintys 129 kodone valiną (V) arba metioniną (M), ir valino homozigotai yra atsparesni už metionino homozigotus (Lloyd *et al.*, 2011, Tahiri-Alaoui *et al.*, 2004). sCJL skirstoma į du tipus pagal proteinazei K (PK) atsparaus PrP^{Sc} dydį. Pirmo tipo PrP^{Sc} PK atsparus

regionas prasideda nuo 82 aminorūgšties ir turi masę lygią ~21 kDa. Antro tipo prasideda nuo 97 aminorūgšties ir yra ~2 kDa lengvesnis (Cali *et al.*, 2006).

Vidutiniškai liga trunka 7 mėnesius. 90 % pacientų miršta per pirmuosius metus. Ilgiau išgyvena jauni, moteriškos lyties ir heterozigotiniai (M/V 129-ame kodone) pacientai. Dažniausiai susergera 50-70 metų asmenys.

1.5.2. Genetinė Creutzfeldt-Jakob liga

Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 40 PRPN geno mutacijų, sukeliančių prionines ligas. Viena iš jų yra genetinė Creutzfeldt-Jakob liga, kurios simptomai labai panašūs į sCJL, tačiau ja susergama anksčiau ir ligos trukmė yra didesnė. Šią ligą dažniausiai sukelia E200 K mutacija (Brendel *et al.*, 2013). D178N mutacija priklausomai nuo 129-o kodono polimorfizmo gali sukelti tiek gCJL tiek mirtiną nemigą. D178N kartu su V129 sukelia gCJL, o esant M129 sukelia mirtiną nemigą. Kitos rečiau pasitaikančios mutacijos: V180I M129, T183A M129, R208H M/V129, V210I, M232R (Brown ir Mastrianni, 2010). Oktapeptidų skaičiaus padidėjimas baltyme taip pat tiesiogiai siejamas su gCJL. Natūraliai baltymas turi 5 pasikartojimus, tačiau pacientuose, sergančiuose gentine Creutzfeldt-Jakob liga, buvo aptikta nuo 2 iki 9 papildomų sekų (Colby ir Prusiner, 2011). Smegenų skysčio tyrimai parodė apie tris kartus sumažėjusią PrP^C koncentraciją, palyginus su kontrole, bei apie du kartus mažesnę, palyginus su sCJL pacientais (Schmitz *et al.*, 2014).

1.5.3. Gerstmann-Strausser-Scheinker sindromas

1989 metais buvo nustatyta, kad PRNP geno 102-os bazių poros mutacija, dėl kurios prolinas pakeičiamas į leuciną, sukelia GSS sindromą. Tai buvo pirmas svarus įrodymas, kad prioninės ligos gali būti ne vien infekcinės, bet ir genetinės kilmės (Colby ir Prusiner, 2011, Riudavets *et al.*, 2013). Vėliau nustatyta ir daugiau mutacijų, siejamų su GSS sindromu. Keletas iš jų būtų šios taškinės mutacijos: P105L(T/S), A117V, F198S, Q217R. Visais atvejais 129 *cis* kodonas turi koduoti valiną (Brown ir Mastrianni, 2010). Kita įdomi mutacija yra 144 bazių porų įsiterpimas į atvirojo skaitymo rėmelio koduojamą oktapeptidų regioną (Poulter *et al.*, 1992, Xiao *et al.*, 2013). GSS sindromas yra autosominis dominantinis sutrikimas (Collinge 2001). Pacientams dažniausiai padidėja 14-3-3 baltymo koncentracija smegenų skystyje, o taip pat susidaro didelės netirpaus PrP^{Sc} baltymo sankaupos. Pirminiai simptomai yra ataksija ir parkinsonizmas, o ligos trukmė yra apie 5 metai (Takada ir Geschwind, 2013).

1.5.4. Mirtina nemiga

Mirtina nemiga yra reta liga, dažniausiai prasidedanti progresyvia nemiga ir disautonomija, vėliau pasireiškia motoriniais ir kognityviniais sutrikimais. Galiausiai nemiga sukelia haliucinacijas. MN neuropatologija pasireiškia glioze ir neuronų žūtimi. Spongiforminiai pokyčiai neryškūs, o PrP^{Sc} sankaupos nedidelės (Jansen *et al.*, 2011). Mirtiną nemigą sukelia vienintelė priono baltymo geno D178N mutacija, kai 129-as kodonas koduoja metioniną (*cis*; pacientai turintys D178N-V129 dažniausiai susergera gCJL) (Takada ir Geschwind, 2013). Vidutinis pacientų amžius ~50 metų, o liga trunka nuo 1 iki 2 metų (Brown ir Mastrianni, 2010).

1.5.5. Kuru

Kuru tai prioninė liga, kurią sukelia patogenas, patekęs iš sergančio žmogaus. Praėjusio šimtmečio pradžioje Papua Naujosios Gvinėjos Rytų aukštumose gyvenančioje forų gentyje ši liga buvo pasiekusi epideminį lygį. Nors paprastai prioninėmis ligomis užsikrečiama labai retai (rečiau nei vienas iš milijono), toks didelis susirgimų skaičius gentyje gali būti paaiškintas labai paprastai. Forų gentis turėjo paprotį mirus gentainiui surengti puotą, kurios metu buvo suvalgomas kūnas. Vyrai suvalgydavo raumenis ir beveik nesirgdavo kuru liga, o moterys ir vaikai sirgo daug dažniau, nes valgydavo smegenis, kuriose daugiausia PrP^{Sc} sankaupų, ir kitus vidaus organus. Manoma, kad iš pradžių spontanine CJL sirgo vienas gentainis, o jam mirus, šia liga užsikrėtė ir kiti, taip liga išplito. Vėlyvajame 5-ajame dešimtmetyje uždraudus kanibalizmą susirgimų skaičius žymiai sumažėjo (Collinge, 2001).

Kuru dar vadinama juoko liga, nes paskutinėse stadijose ligoniams pasireiškia nevaldomi juoko priepuoliai. Inkubacinis ligos periodas gali būti nuo 4,5 iki daugiau nei 40 metų. Trumpas inkubacinis periodas siejamas su patogeno patekimu per žaizdas ar akis. Užsikrėtus oraliu būdu, ligos simptomai pasirodo maždaug po 40 metų. Pasireiškus pirmiesiems simptomams žmogus vidutiniškai išgyvena vienerius metus (Collinge, 2001).

1.5.6. Jatrogeninė Creutzfeldt-Jakob liga

Jatrogeninė Creutzfeldt-Jakob liga užsikrečiama per netinkamai sterilizuotus neurochirurginių operacijų instrumentus, elektroencefalografo elektrodus, vartojant hormonus (augimo hormonus arba gonadotropiną), išskirtus iš žmogaus hipofizio, per ragenos transplantus bei kietojo smegenų dangalo persodinimo metu. Svarbu paminėti, kad užkratui patekus per akis ar tiesiai į smegenis, ligos progresas ir simptomai primena klasikinę CJL, o

patekus iš periferijos būna panašūs į kuru ligą. Inkubaciniai periodai trunka nuo 19 iki 46 mėn. pirmuoju atveju bei vidutiniškai 15 metų antruoju atveju (Collinge, 2001).

1.5.7. Naujo varianto Creutzfeldt-Jakob liga

Naujo varianto Creutzfeldt-Jakob liga pirmą kartą nustatyta 1995 m. ir tai vienintelė iki šiol žinoma prioninė liga, kuria užsikrečiama ne nuo žmogaus, bet tiesiogiai nuo kito gyvūno. Šia liga užsikrečiama valgant maisto produktus, pagamintus iš karvių, sirgusių galvijų spongiformine encefalopatija (GSE). Jungtinėje Karalystėje GSE buvo smarkiai išplitusi dėl skrepi liga sirgusių avių naudojimo galvijų pašarams. Visai neseniai buvo nustatyta, kad vCJL galima užsikrėsti ir perpilant kraują (Takada ir Geschwind, 2013).

Beveik visų pacientų, sirgusių vCJL, PRP genas buvo homozigotinis pagal 129 kodoną koduojantį metioniną (Colby ir Prusiner, 2011). Klinikiniai požymiai skiriasi nuo sCJL. vCJL suserga jaunesni, vidutiniškai 27 metų žmonės, o liga trunka ilgiau, apie 14,5 mėnesio. Smegenyse randamos fibrilinio PrP^{Sc} dėmės, apsuptos spongiforminėmis vakuolėmis (Takada ir Geschwind, 2013).

1.6. Amiloidinio PrP toksiškumo tyrimai *in vivo*

Norint patvirtinti „tik baltymo“ teoriją, teigiančią, kad prionines ligas sukelia amiloidinė priono baltymo forma ir šiam procesui nereikalingos jokios kitos pagalbinės medžiagos, buvo atliekama *de novo* baltymo agregacija ir toksiškumo tyrimai su pelėmis. Vienas pirmųjų toks eksperimentas buvo atliktas su pelėmis ir sutrumpintu rekombinantiniu pelės priono baltymu (moPrP89-231). Šis baltymas atitinka proteinazei K atsparią PrP^{Sc} baltymo dalį. Amiloidinės fibrilės buvo paruoštos naudojant protokolus su sėkla ir be jos. Šiuo atveju sėkla – iš SE sergančios pelės išskirtas PrP^{Sc}. Fibrilės paruoštos naudojant buferį su urėja. Eksperimento metu jos buvo suleistos transgeninėms (Tg) pelėms su 16 kartų padidinta moPrP89-231 raiška (palyginus su normalia moPrP raiška). Abiejų tipų fibrilės sukėlė neurologinius defektus, tačiau jų pobūdis ir laikas iki jiems atsirandant buvo skirtingas. Taip atsitiko, nes susidarė skirtingų kamienų fibrilės. Šis tyrimas parodė, kad prioninio baltymo užtenka ligai sukelti (Legname *et al.*, 2004). Vėlesni tyrimai parodė, kad priklausomai nuo sąlygų susidaro skirtingomis patogeninėmis savybėmis pasižyminčios fibrilės. Keičiant denatūrantų koncentraciją ir temperatūrą, susidaro skirtingo stabilumo fibrilės. Stabilumas tiesiogiai koreliavo su inkubaciniu periodu, tai reiškia, kad didėjant stabilumui ilgėja inkubacinis laikas (Colby *et al.*, 2009).

Kiti *in vivo* tyrimai buvo atlikti su fibrilėmis, susidariusiomis naudojant *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA) metodą. Su šiuo metodu mokslininkams pavyko PrP^C paversti proteinazei K atsparia forma, į reakcijos mišinį pridėjus lipidų bei sintetinių arba natūralių polianijonų. Iš Sirijos žiurkėno smegenų išgrynintas PrP^C ir lipidų mišinys buvo papildytas poli(A) RNR. Susidaręs PrP^{res} buvo suleistas laukinio tipo žiurkėnams. Išsivystę neurodegeneraciniai smegenų pažeidimai parodė, kad smegenyse esantys polianijonai gali daryti įtaką baltymų agregacijai (Deleault *et al.*, 2007).

1.7. Amiloidinio PrP toksiškumo tyrimai *in vitro*

Tyrimuose buvo pastebėta, kad skrepi liga užkrėstų pelių ir Creutzfeldt-Jakob liga sergančių žmonių smegenų audiniuose yra padidėjusios Fe²⁺ ir Fe³⁺ jonų koncentracijos. Atlikus *in vitro* eksperimentus su PrP^C baltymą ekspresuojančiomis žmogaus neuroblastomos ląstelėmis, pastebėta, kad padidinus geležies jonų koncentraciją, sukeliama PrP^C konversija į PK atsparią formą. Geležies jonų koncentracijos sumažinimas turi priešingą efektą. ScN2a ląsteles, kurios kaupia PrP^{Sc}, paveikus deferoksaminiu, surišančiu geležies jonus, PK atsparios baltymo formos ženkliai sumažėjo (Basu *et al.*, 2007).

Naujausi tyrimai parodė, kad didelių fibrilių formavimasis gali turėti apsauginių funkcijų. Oligomerai, sudaryti iš 14 – 28 PrP molekulių ir dar nesudarantys fibrilinės struktūros, yra patys toksiškiausi. Jiems augant susidaro didelės fibrilės, kurios yra beveik nekenksmingos. Šiam tyrimui iš žiurkėno smegenų buvo išskirtas PrP^{Sc} ir susmulkintas naudojant ultragarso aparatą bei detergentus. Frakcija, sudaryta iš 14 – 28 molekulių ilgio oligomerų, pasižymėjo didžiausiu toksiškumu. Tokio pat dydžio oligomerai sudaryti iš rPrP buvo beveik vienodai kenksmingi. Rezultatai patvirtinti *in vivo* (Huang *et al.*, 2013).

Ieškant prionų replikaciją stabdančių ir toksiškumą mažinančių medžiagų, kurios būtų naudojamos prioninėms ligoms gydyti, atlikta jau keliasdešimties junginių analizė. Skrepi ligos prionų kamienu užkrėstos ScN2a ląstelės buvo veikiamos įvairiais junginiais ir ELISA metodu nustatoma PK atsparaus baltymo kiekis (Bertsch *et al.*, 2005, Kocisko *et al.*, 2003, Ghaemmaghami *et al.*, 2010). Jau atrasta junginių, sumažinančių toksiško baltymo formos koncentraciją arba stabdančių baltymo formos konversiją. *In vitro* atrinkti junginiai buvo išbandyti *in vivo* tyrimuose su pelėmis. Gyvenimo laikas po užkrėtimo buvo pratęstas dvigubai, tačiau galiausiai smegenyse vis tiek susiformuodavo PrP^{Sc} dėmės ir gyvūnai žūdavo dėl smegenų pažeidimų. Taip pat pastebėta, kad ilgai veikiant šiais junginiais prionų kamienas

mutuodavo. Naujasis kamienas įgaudavo atsparumą tiriamai medžiagai. Tai paaiškina, kodėl vis dar nepavyksta ligos išgydyti, o tik pristabdyti progresiją (Ghaemmaghami *et al.*, 2014).

1.8. Įžvalgos apie toksiškumo mechanizmus

Nesenai buvo parodyta, kad endosominis perdirbimo skyrius (angl. *endosomal recycling compartment*) yra viena iš tikėtinių vietų, kurioje vyksta PrP^C konversija į PrP^{Sc}. Posinapsiniame neurone, signalo perdavimo metu, išleidžiami vario jonai, kurie stimuliuoja PrP^C endocitozę bei skatina PK atsparios prioninio baltymo formos susidarymą (Pauly ir Harris, 1998). Vario jonų metabolizmo sutrikimai galėtų sutrikdyti sinapsės veikimą bei paskatinti prioninio baltymo konversiją endosominiame perdirbimo skyriuje. Toks mechanizmas tinka paaiškinti spontaninių SE atsiradimą, kurių metu sunyksta sinapsės, o jų vietose randamos patogeninio baltymo sankaupos (Marijanovic *et al.*, 2009).

PrP^C sąveikauja su baltymais N-CAM (angl. *neuronal-cell adhesion molecule*) ir lamininu, dalyvaujančiais singnaliniuose keliuose, taip pat su ląstelių sąveikos baltymais vitronektinu, laminino receptoriaus prekursoriumi ir glikozaminoglikanais, bei su sinapsiniu Ib, dalyvaujančiu formuojantis sinapsinėms pūslelėms ir išskiriant neuromediatorius. PrP^C kartu su N-CAM ir lamininu, per p59Fyn kinazės aktyvaciją ir MAPK signalinį kelią, dalyvauja neuritogenezėje. Streso indukuojamo baltymo 1 (Sti1, angl. *stress-inducible protein 1*) ir PrP^C sąveika pagerina trumpalaikės atminties formavimąsi ir ilgalaikės atminties įtvirtinimą. Taip pat ji sužadina priešapoptozinius signalus. Patologinio PrP^{Sc} formavimasis gali sukelti signalo perdavimo, ląstelinių ryšių bei sinapsių pakitimus. Sergant prioninėmis ligomis, MAPK signalinio kelio reguliacija yra sutrikusi. Tai parodo jo aktyvų veikimą patogenezėje (Benetti ir Legname, 2009). Sirijos žiurkėno, užkrėsto 263K skrepi kamieniu, smegenyse nustatyti padidėję c-Jun N galo kinazės, p38 MAPK ir užląstelinių signalų reguliuojamų kinazių aktyvumai (Lee *et al.*, 2005).

1.9. Rekombinantinio prioninio baltymo gryninimas

Gryninant rekombinantinį prioninį baltymą iš *Escherichia coli* bakterijų, susiduriama su dviem pagrindinėmis problemomis. Pirma, bendra visų baltymų gryninimo problema yra ta, kad baltymas gali kauptis intarpiniuose kūneliuose ir būti netirpus. Antroji kyla iš patogeninės prioninio baltymo formos gebėjimo vykdyti PrP^{sen} virtimą į PrP^{res}. Jei auginimo ar gryninimo metu susidarytų PrP^{res} ir jis nebūtų pašalintas, eksperimentai atlikti su tokiu baltymu būtų netikslūs, nes nebūtų galima norimomis sąlygomis pasigaminti fibrilių *de novo*. Šioms

problemos spręsti gryninimo pradžioje baltymas yra denatūruojamas naudojant ureją arba guanidino hidrokloridą. Taip pat pridedama glutationo, stipraus antioksidanto, kuris redukuoja disulfidinius tiltelius, taip palengvindamas baltymo išsilankstymą. Toliau gryninimas vyksta dviem etapais. Pirmiausia vykdoma giminingumo (afininė) chromatografija, kurios metu baltymas renatūruojamas (Middelberg, 2002), o vėliau jonų mainų chromatografija.

1.9.1. Giminingumo chromatografija

Giminingumo chromatografija yra paremta atrankiu sorbento ir baltymo jungimusi. Prie sorbento gali būti prijungti substratai, inhibitoriai, kofaktoriai ar kiti junginiai, kurie jungiasi tik su specifiniu baltymu arba oligopeptidine seka. Šis metodas labai tinka baltymų gryninimui iš grubių, neišgrynintų biologinių mišinių (Cuatrecasas, 1970). Imobilizuotų metalo jonų afininė chromatografija (IMAC) yra vienas iš giminingumo chromatografijos metodų, kurios metu sorbento funkcinės grupės chelatuoja pereinamųjų metalų jonus (Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). Tokia jonais pakrauta funkcinė grupė atrankiai jungiasi su histidinu ir cisteinu. Metalų chelatavimui dažniausiai naudojama iminodiacto rūgštis, nitrilotriacto rūgštis arba trikarboksimetiltilendiaminas. Gaminant rPrP konstrukta dažnai prie baltymo prijungiama 6 histidinių arba ilgesnė seka, dėl kurios gaunamos didelės išėigos ir aukštas grynumo laipsnis. IMAC gerai tinka prioninių baltymų gryninimui, nes histidininės sekos giminingumas mažai kinta, esant net labai didelėms denatūrantų koncentracijoms. Tai leidžia atlikti baltymo renatūraciją ant sorbento ir gauti gryną, bei teisingai susilanksčiusį baltymą (Block *et al.*, 2009).

1.9.2. Histidinių sekos nukirpimas trombinu

Giminingumo chromatografijai naudota histidinių seka turi būti pašalinta. Tam tikslui pasiekti tarp histidinių sekos ir baltymo yra įterpiama Leu–Val–Pro–Arg–Gly–Ser aminorūgščių seka. Šią seką atpažįsta trombinas ir kerpa tarp Arg ir Gly. Dažniausiai naudojama nuo 1 iki 10 vnt. trombino vienam mg baltymo. Kirpimo greitis labiausiai priklauso nuo temperatūros, kuri gali varijuoti nuo 4 °C iki 37 °C. Norint patikrinti, ar pilnai pašalinta histidinių seka, reikia imti mėginius ir atlikti analizę NDS-PAGE arba masių spektrometru. Reakcijai pilnai įvykus, baltymo molekulinė masė turėtų sumažėti apytiksliai 2 kDa (Vanderbilt.edu, 2005).

1.9.3. Jonų mainų chromatografija

Jonų mainų chromatografija grindžiama skirtingą krūvį turinčių dalelių sąveika. Baltymai turi funkcinės grupės, kurios vandeniniuose tirpaluose gali jonizuotis. Įgaunamas krūvis priklauso nuo baltymo pK_a ir buferio pH. Jonų mainų chromatografijoje naudojami nešikliai,

turintys funkcines grupes, galinčias įgauti teigiamą arba neigiamą krūvį. Pagal krūvį nešikliai skirstomi į katijonų mainų nešiklius, kurie turi neigiamą krūvį ir gali prisijungti teigiamai įkrautus baltymus, ir į anijonų mainų nešiklius, turinčius teigiamą krūvį ir galinčius prisijungti neigiamai įkrautus baltymus. Neigiamą krūvį turintys nešikliai dar vadinami rūgštiniais, nes krūvį suteikia disocijavusi rūgštinė grupė, o teigiamą krūvį turintys nešikliai vadinami baziniais, nes krūvį suteikia prie bazinės grupės prisijungęs protonas (Sasnauskienė, 2008).

Chromatografijos nešiklis parenkamas pagal baltymo stabilumą, santykinę molekulinę masę bei savituosius atskyrimo poreikius. Svarbu parinkti tokį nešiklį, kurio atrankaus veikimo pH intervalas sutampa su baltymo stabilumo intervalu. Priešingu atveju galima prarasti baltymo aktyvumą arba gauti agregavusį baltymą. Eliucijai naudojami buferiniai tirpalai, kurių pH yra artimas tikslinio baltymo izoelektriniam taškui. Baltymus atskirti nuo sorbento galima keičiant buferinio tirpalo pH arba palaikant pastovų pH, bet didinant joninę jėgą (Sasnauskienė, 2008).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudotos medžiagos, terpės, tirpalai ir įranga

2.1.1. Naudotos medžiagos

Darbe naudotos medžiagos pateiktos pagal gamintoją:

AB Vilniaus degtinė: 96 % etanolis.

Fisher Scientific: TRIS, glicinas, SDS, imidazolas, dekstrozė, laktozė, MgSO₄, triptonas, acto rūgštis, TEMED, EZ-Run baltymų dažymo tirpalas, EZ-Run baltymų molekulinės masės markeris, glutationas, amonio persulfatas, akrilamido/bis-akrilamido 30 % tirpalas.

Acros organics (Fisher scientific padalinys): nikelio (II) chlorido heksahidratas (NiCl₂ × 6H₂O), NaH₂PO₄ × H₂O, NaCl, NaOH, (NH₄)₂SO₄, guanidino hidrochloridas (su 0,4 % SiO₂), glicerolis, Na₂SO₄, NH₄Cl, Na₂HPO₄.

Carl Roth: KH₂PO₄, K₂HPO₄, natrio acetato trihidratas (C₂H₃NaO₂ × 3H₂O), ampicilino natrio druska, akrilamidas.

Oxoid: mielių ekstraktas, kazeino hidrolizatas.

2.1.2. Fermentai

Fisher scientific: trombinas.

Gibco: tripsinas („TrypLE Express“).

2.1.3. Sorbentai

GE Healthcare: „Ni Sepharose 6 Fast Flow“, „CM Sepharose Fast Flow“.

2.1.4. Mitybinės terpės

Dulbecc'o modifikuota Eagle ląstelių mitybinė terpė (DMEM) su 10% fetaliniu veršiukų serumu (FBS) ir 1% antibiotikų („Gibco“).

Agarizuota LB terpė: 10 g NaCl, 10 g peptono, 5 g mielių ekstrakto ir 15 g agaro ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Terpė autoklavuojama 30 min. 121 °C temperatūroje.

LB (Luria/Miller) terpė: 10 g NaCl, 10 g peptono ir 5 g mielių ekstrakto ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Terpė autoklavuojama 30 min. 121 °C temperatūroje.

Autoinduktyvi mitybinė terpė (ZYM-5052): 1 % kazeino hidrolizato arba triptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,5 % glicerolio, 0,05 % dekstrozės, 0,2 % laktozės, 100 mg/ml ampicilino. Visos medžiagos tirpinamos atskirai ir prieš autoklavavimą supilamos į dvi talpas, atskiriant glicerolio, dekstrozės ir laktozės tirpalą nuo kitų. Autoklavuojama 30 min. 121 °C temperatūroje. Tirpalai sumaišomi ir pridedama antibiotikų.

S.O.C. mitybinė terpė: 2 g peptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 3,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ ir 20 mM gliukozės. Peptonas, mielių ekstaktas, KCl ir NaCl tirpinami 97 ml dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min. 121 °C temperatūroje. Atvėsus iki kambario temperatūros pridedama magnio druskų ir gliukozės, sterilizuojama filtruojant.

2.1.5. Buferiniai tirpalai naudoti baltymų gryninime

A1. 100 mM K₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8. pH koreguojamas HCl tirpalu ir filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

A2. 50 mM imidazolo, 100 mM K₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8. pH koreguojamas HCl tirpalu ir filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

A3. 700 mM imidazolo, 100 mM KH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 5,8. pH koreguojamas HCl tirpalu ir filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

A4. 100 mM fosfatinis buferis, pH 5,8. Santykiu 23:2 sumaišomi 1 M KH₂PO₄ ir 1 M K₂HPO₄ tirpalai ir praskiedžiami dejonizuotu vandeniu. Jei reikia, pH koreguojamas NaOH arba HCl tirpalais.

A5. 10 mM fosfatinis buferis, pH 5,8. Santykiu 23:2 sumaišomi 1 M KH₂PO₄ ir 1 M K₂HPO₄ tirpalai ir praskiedžiami dejonizuotu vandeniu. Jei reikia, pH koreguojamas NaOH arba HCl tirpalais.

B1. 6 M guanidino hidroklorido, 10 mM glutationo, 100 mM KH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8. Guanidino hidrokloridas užpilamas 1 M KH₂PO₄ ir 1 M Tris-HCl tirpalais ir minimaliu dejonizuoto vandens kiekiu. Tirpinama šildant. Ištirpus guanidino hidrokloridui tirpalas centrifuguojamas 4700 g 10 min. Supernatantas nupilamas ir refraktometru pamatuojama guanidino koncentracija. Prieš pat naudojant į buferį pridedama glutationo ir NaOH tirpalu pH koreguojamas iki 8. Praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki reikiamo tūrio ir filtruojama per 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

B2. 1-2 M NaCl, 100 mM PO₄³⁻, pH 5,8. Santykiu 23:2 sumaišomi 1 M KH₂PO₄ ir 1 M K₂HPO₄ tirpalai, pridedama NaCl ir pripilama dejonizuoto vandens. pH koreguojamas NaOH arba HCl tirpalais. Pripilama dejonizuoto vandens iki reikiamo tūrio ir filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

B3. 1-2 M NaCl, 10 mM PO₄³⁻, pH 5,8. Santykiu 23:2 sumaišomi 1 M KH₂PO₄ ir 1 M K₂HPO₄ tirpalai, pridedama NaCl ir pripilama dejonizuoto vandens. pH koreguojamas NaOH arba HCl tirpalais. Pripilama dejonizuoto vandens iki reikiamo tūrio ir filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

C. 10 mM CH₃COO⁻, pH 4. Santykiu 3:1 sumaišomi 1 M CH₃COOH ir 1 M CH₃COONa tirpalai ir skiedžiami dejonizuotu vandeniu. pH koreguojamas NaOH arba HCl tirpalais. Praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki reikiamo tūrio ir filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

2.1.6. Dažai ląstelių gyvybingumui nustatyti

MTT. 50 mg 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido (MTT) ištirpinama 10 ml dejonizuoto vandens ir filtruojama per sterilų 0,22 μm filtrą.

Hoechst 33342. *Fisher Scientific*.

Propidžio jodidas. *Carl Roth*.

2.1.7. Ląstelių linijos

SK-N-BE2 ir U87 ląstelės padovanotos Bellvitge biomedicinos tyrimų instituto (IDIBELL), Ispanija.

2.1.8. Naudota laboratorinė įranga

Autoklavas: „Raypa AHS-75 N“.

Centrifūgos: „Technico Maxi“, „HiCen SR“ (rotoriai: AF 6.500, AF 8.50.2 ir AS 4.500), „Hettich Zentrifugen ROTOFIX 32 A“.

Chromatografinė kolonėlė: „GE Healthcare XK 26/20“.

Chromatografinė sistema: „Äkta purifier“.

Dializės žarna: 38,1 mm diametro „ZelluTrans/Roth“, kurios pralaidumas 6-8 kDa.

Elektroforezės apratai: „Biometra Minigel-Twin“ su „Biometra PS300T“ srovės šaltiniu.

Filtrai: 0,22 μm porų skersmens, 47 mm diametro „Fisher Scientific“.

Filtravimo indai: „Millipore Durapore™“ 0,22 µm porų dydžio, 73 mm diametro ir 150 ml tūrio.

Homogenizatorius: „Carl Roth TT62.1“.

Koncentratoriai: „Amicon® Ultra – 15“, kurių pralaidumas 10 kDa.

Magnetinės maišyklės: „VARIOMAG Maxi Direct“, „VELP Scientifica® ARE“, „Fisher Scientific Mini“.

Mikroskopai: „OLYMPUS IX71S1F-3“, „OLYMPUS CKX31“.

pH metras: „Thermo Scientific Orion DUAL STAR meter“.

Spektrofotometrai: „Shimadzu Scientific Instruments UV-1800“ ir „Varian Cary Eclipse“.

Sūkurinė maišyklė: „VELP Scientifica CLASSIC“.

Svarstyklės: „Kern & Soth PCB“, „Denver Instrument TP-214“, „KERN ABJ“.

Termostatai: „Fisher Scientific IB-15G“, „Fisher Scientific Mini“, „NUAIRE NU-5510/E/G“.

Termostatuojamos purtyklės: „IKA Works KS 4000i“, „DITABIS MHR 23“.

Ultragarsinis homogenizatorius: „Bandelin Sonopuls“.

Ultragarso vonelė: „Elma Hans Schmidbauer Elmasonic One“.

Vakuminė filtravimo sistema: „Sigma-Aldrich“.

Laminarinė spinta: „NUAIRE 437-400E“.

Vario grotelės: „Agar Scientific“ S162-3, vario grotelės dengtos polivinilacetato derva ir anglimi su 53 µm dydžio skylėmis.

2.2. Metodai

2.2.1. Kompetentinių ląstelių transformacija

Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, turinčia 100 µg/ml ampicilino, šildomos 1 val. 37 °C temperatūroje.

Į 100 µl kompetentinių *E. coli* BL(21) Star™ (DE3) ląstelių įdedama 1 µl plazmidinės DNR ir inkubuojama lede 30 min.

Vykdomas karščio šokas, 90 s laikoma 42 °C temperatūroje, tada mišinys perkeliamas į ledo vonią ir joje inkubuojamas dar 2 min.

Įpilama 400 µl S.O.C. terpės ir 45 min. inkubuojama purtyklėje (37 °C temperatūroje 220 aps./min.).

Centrifuguojama 2 min. 20 °C 3000 × g. Dalis supernatanto nupilama, ląstelės suspenduojamos likusiame supernatanto kiekyje ir išsėjamos pašildytoje Petri lėkštelėje ant agarizuotos LB terpės. Termostate inkubuojama ~ 16 val. 37 °C.

2.2.2. Biomassės auginimas ir indukcija

Viena transformuota *E. coli* BL(21) Star™ (DE3) kolonija užsėjama į 50 ml LB terpės su ampicilinu. Auginama per naktį 37 °C 220 aps./min. termostate.

10 ml naktinės kultūros užsėjama į 400 ml autoinduktyvios terpės ir auginama 37 °C 220 aps./min. termostate.

Po 2, 4 ir 5 val. imami kultūros mėginiai. Atliekamas NDS-PAGE tikslinio baltymo raiškai nustatyti.

Nustačius raiškos padidėjimą 5 val. kultūroje, biomasė surenkama ląstelių suspensiją centrifuguojant 30 min. 4700 × g.

2.2.3. Baltymų elektroforezė

2.2.3 lentelė. Baltymų elektroforezės gelių sudėtis

Apatinis skiriamasis 12 % gelis		Viršutinis koncentruojamasis 4 % gelis	
dH ₂ O	2,55 ml	dH ₂ O	1,27 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,53 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8	500 μl
40 % AA/BAA	1,83 ml	40 % AA/BAA	201 μl
10 % SDS	61 μl	10 % SDS	20 μl
10 % APS	30,5 μl	10 % APS	10 μl
TEMED	3,65 μl	TEMED	2 μl

Elektroforezės geliai ruošiami sumaišant medžiagas pateiktas 2.2.3 lentelėje tokia tvarka, kaip surašytos. Pirmiausia ruošiamas skiriamasis 12 % gelis. Įpylus APS ir TEMED mišinys iškart pilamas tarp elektroforezės plokštelių, ant viršaus užpilama dejonizuoto vandens. Po 40 min., geliui pilnai polimerizavus, paruošiamas koncentruojamojo gelio mišinys. Nuo skiriamojo gelio paviršiaus nusiurbiamas vanduo ir užpilamas koncentruojamasis gelis. Istatomos „šukos“ ir paliekama stingti 30 min. Geliui sustingus elektroforezės plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą. Aparato rezervuarai pripildomi elektroforezės buferiu.

Išimamos šukos ir į susidariusius „šulinėlius“ supilami mėginiai ir molekulinis markeris. Elektroforezės metu palaikoma pastovi 30 mA srovė, o įtampa neviršija 300 V. Dažui „išėjus“ iš gelio išjungiami srovė. Gelis praplaunamas dejonizuotu vandeniu, dažomas *EZ-Run* baltymų dažu 20 min., purtant 80 aps./min. ir ryškinamas vandenyje.

2.2.4. Baltymo gryninimas

Biomasė homogenizuojama baltymus denatūruojančiame B1 buferyje (6 M guanidino hidroklorido, 10 mM glutationo) ir 20 min. ardoma ultragarsu (70 % amplitudė, 60 s veikimo/60 s poilsio režimu). Ardymas ultragarsu atliekamas ledų vonioje. Biomasė centrifuguojama 4 °C temperatūroje 40 min. 31000 × g. Supernatantas 30 min. 4 °C temperatūroje lėtai maišomas su B1 buferiniu tirpalu nupusiausvyrintu Ni(II) sefarozės sorbentu (15 ml). Kolonėlė užkraunama sorbentu ir prijungiama prie chromatografinės sistemos. Chromatografijos kolonėlė praplaunama 100 ml B1 buferio. Baltymas renatūruojamas per 200 ml B1/A1 buferių gradientą. Per kolonėlę papildomai praleidžiama 40 ml A1 buferio. Toliau gryninama per kolonėlę praleidžiant 60 ml A2 buferio, kuriuo pašalinami silpnai prisijungę baltymai. Tikslinis baltymas nuo sorbento atskiriamas A3 buferiu.

Surinktos frakcijos dializuojamos 4 l A4 arba A5 buferinio tirpalo. Buferinis tirpalas keičiamas 2 kartus kas 3 val. Dializuotas baltymas filtruojamas naudojant 150 ml, 73 mm diametro, 0,22 μm porų dydžio „Millipore Stericup“ filtravimo indus. Baltymo tirpalo optinis tankis nustatomas spektrofotometru ($\lambda = 280$ nm), o koncentracija apskaičiuojama taikant Bero ir Lamberto dėsnį.

Baltymo histidininė uodega nukerpiama pridėjant 3 vnt. trombino vienam miligramui baltymo ir inkubuojant 16 val. 4 °C temperatūroje. NDS-PAGE patikrinama, ar kirpimas buvo sėkmingas.

Baltymas toliau gryninamas atliekant jonų mainų chromatografiją. „CM sepharose“ sorbentas (15 ml) nupusiausvyrinamas A4 arba A5 buferiniu tirpalu ir po to lėtai maišomas su baltymo tirpalu 30 min. 4 °C temperatūroje. Kolonėlė užkraunama sorbentu ir prijungiama prie chromatografinės sistemos. Chromatografijos pradžioje kolonėlė praplaunama 75 ml A4 arba A5 buferinio tirpalo. Baltymas atskiriamas nuo sorbento sudarant 150 ml gradientą, kurio metu A4 arba A5 keičiamas B2 arba B3 buferiniu tirpalu.

Surinktos frakcijos dializuojamos 4 l C buferinio tirpalo, jį keičiant 2 kartus, kas 3 valandas. Po dializės baltymo tirpalas filtruojamas „Millipore Stericup“ filtravimo indais.

Tirpalo optinis tankis matuojamas spektrofotometru ($\lambda = 280 \text{ nm}$), o koncentracija nustatoma pagal Bero ir Lamberto dėsnį. Baltymo tirpalas koncentruojamas naudojant „Amicon® Ultra – 15“ koncentratorius, kurių pralaidumas 10 kDa. Sukoncentravus iki $\sim 3 \text{ mg/ml}$ baltymas išpilstomas į mėgintuvėlius po 0,5 mg ir užšaldomas šaldytuve $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

2.2.5. Mėginio paruošimas elektroniniam mikroskopui

Fibrilių suspensija ($c = 0,5 \text{ mg/ml}$) dejonizuotu vandeniu praskiedžiama 10 kartų. 4 μl užlašinami ant varinės grotelių pusės ir po 1 min. filtriniu popieriumi prilietus grotelių kraštą nusausinama. Grotelėse susidariusi plėvelė, norint pašalinti guanidino hidrochloridą, praplaunama dejonizuotu vandeniu. 4 μl dejonizuoto vandens užlašinami ant grotelių. Po 1 min. nusausinama filtriniu popieriumi. Ši procedūra kartojama 4 kartus. Fibrilės dažomos 2 % uranilacetato tirpalu. 4 μl šio tirpalo užlašinami ant grotelių. Po 30 s nusausinama ir paliekama nudžiūti.

2.2.6. De novo fibrilių susidarymas žemoje temperatūroje

Į mėgintuvėlį, kuriame yra 0,5 mg baltymo, pilama 1/3 arba 2/3 ml denatūruojančio buferio (6 M guanidino hidrochlorido, 50 mM PO_4^{3-} , pH 6) ir fosfatinio buferio (50 mM PO_4^{3-} , pH 6), kad bendras tūris būtų 1 ml. Galutinė guanidino koncentracija atitinkamai 2 arba 4 M. Mėgintuvėliai gerai išmaišomi ir įstatomi į aplink horizontalią ašį besisukančią maišyklę. Priklausomai nuo guanidino koncentracijos, laikomi atitinkamai 4 arba 7 dienas $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubatoriuje. Ar amiloidinės fibrilės susidarė nustatoma į 100 μl tioflavino T (ThT) įpylus 20 μl reakcijos mišinio ir matuojant fluorescenciją 460-550 nm bangų ilgių diapazone. Sužadavimo bangos ilgis 450 nm.

2.2.7. De novo fibrilių susidarymas aukštoje temperatūroje

Į mėgintuvėlį, kuriame yra 0,5 mg baltymo, pilama 1/3 arba 2/3 ml denatūruojančio buferio (6 M guanidino hidrochlorido, 50 mM PO_4^{3-} , pH 6) ir fosfatinio buferio (50 mM PO_4^{3-} , pH 6), kad bendras tūris būtų 1 ml, galutinė guanidino koncentracija atitinkamai 2 arba 4 M. Mėgintuvėliai gerai išmaišomi ir patalpinami į $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 900 aps./min. termostatinę purtyklę. Mėgintuvėliai laikomi $\sim 15 \text{ val.}$ ir tada ThT dažų nustatoma, ar susidarė amiloidinės fibrilės.

2.2.8. Fibrilių paruošimas toksiškumo tyrimams

Susidariusios fibrilės centrifuguojamos *Fisher Scientific technico Maxi* centrifuga 30 min. $16000 \times g$. Fibrilės, pagamintos 4 M guanidino, praskiedžiamos 1 ml dejonizuoto

vandens, nes labai didelė guanidino koncentracija trukdo nusodinimui. Supernatantas nusiurbiamas, o fibrilės resuspenduojamos 1 ml DMEM mitybinėje terpėje su 10 % fetaliniu veršiukų serumu (FBS) ir 1 % antibiotikų, ir centrifuguojamos 15 min. $16000 \times g$. Ši procedūra atliekama du kartus. Mėgintuvėlyje esančios fibrilės susmulkinamos ultragarso aparatu. Suspensija sterilizuojama UV spinduliais 30 min.

2.2.9. Fibrilių toksiškumo tyrimas MTT metodu

Fibrilių toksiškumas tirtas dviems ląstelių linijoms: neuroblastomos SK-N-BE2 ir glioblastomos U87. Ląstelės auginamos DMEM mitybinėje terpėje su 10 % FBS ir 1 % antibiotikų. Eksperimentai atliekami 96 šulinėlių plokštelėse. Ląstelių suspensija ruošiama *Petri* lėkštelėje augančią kultūrą praplaunant 1-2 ml tripsino tirpalo (*TrypLE*) ir inkubuojant 1 ml šio tirpalo 5-10 min. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Ląstelės suspenduojamos pipete ir suskaičiuojamos hemocitometro kameroje per mikroskopą. Į kiekvieną šulinėlį pilama po 100 μl ląstelių suspensijos taip, kad šulinėliuose būtų po 3000 U87 arba 4000 SK-N-BE2 ląstelių. Po 24 val. inkubacijos $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje į šulinėlius su ląstelėmis pilama po 100 μl fibrilių suspensijos. Galutinė fibrilių koncentracija šulinėliuose buvo nuo 0,5 nM iki 10 μM .

Ląstelių gyvybingumui tirti buvo naudojamas MTT metodas, t.y. augančios ląstelės veikiamos MTT, kuris yra nuo NAD(P)H priklausomos oksidoreduktazės substratas. Susidaręs netirpūs metabolito (formazano) kristalų kiekis atitinka gyvų ląstelių skaičių. Formazano kiekis nustatomas spektrofotometru išmatavus 560 nm ilgio bangų sugertį, kristalus ištirpinus dimetilsulfokside.

Eksperimentiniai duomenys normalizuojami nuo 0 iki 1 (0 – absorbcija tuose šulinėliuose, kuriuose buvo tik terpė, be ląstelių; 1 – absorbcija šulinėliuose, kuriuose ląstelės buvo paveiktos tik terpe, be fibrilių). Duomenys apdoroti „MS Excel 2013“ paketu, įvertinant trijų matavimų vidurkį ir santykinį standartinį nuokrypį. „OriginPro 9“ programų paketu apskaičiuoti Pirsono koreliacijos koeficientai ir jų patikimumas.

2.2.10. Fibrilių toksiškumo tyrimas fluorescencinės mikroskopijos metodu

Tyrimas buvo atliktas su glioblastomos U87 ląstelėmis. Ląstelės užsėtos 24 šulinėlių plokštelėse, į vieną šulinėlį pilant po 500 μl 20000 ląst./ml suspensijos. Po 24 val. į šulinėlius su ląstelėmis pilama po 100 μl fibrilių suspensijos. Galutinė fibrilių koncentracija šulinėliuose buvo nuo 2,5 μM iki 5 μM .

Ląstelių žūtis vertinama fluorescencinės mikroskopijos metodu (mikroskopas OLYMPUS IX71S1F-3). Apoptozė buvo nustatoma pagal morfologinius glioblastomos ląstelių branduolių pokyčius, naudojant fluorescuojantį dažą Hoechst 33342, o nekrozė – dažant propidžio jodidu. Po inkubacijos su fibrilėmis į glioblastomos kultūrą buvo pridedama Hoechst 33342 bei propidžio jodido (galutinė dažų koncentracija 4 µg/ml) ir inkubuojama 15 min. kambario temperatūroje. Ląstelės, kurių branduoliai buvo tolygiai nudažyti mėlynai Hoechst 33342 dažu, buvo vertinamos kaip sveikos, gyvybingos, o ląstelės, kurių branduoliai buvo kondensuoti ir fragmentuoti, buvo laikomos apoptozinėmis. Ląstelės, kurių branduoliai buvo nudažyti propidžio jodidu ir švytėjo raudonai, buvo priskiriamos nekrozinėms.

Nuotraukų apdorojimui ir ląstelių skaičiavimui naudotas „ImageJ“ programų paketas. Pasinaudojant „Microsoft Excel 2013“ programų paketu, iš eksperimentinių duomenų apskaičiuota, kurią dalį populiacijos sudaro gyvos ląstelės.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. huPrP23-231 baltymo gryninimas

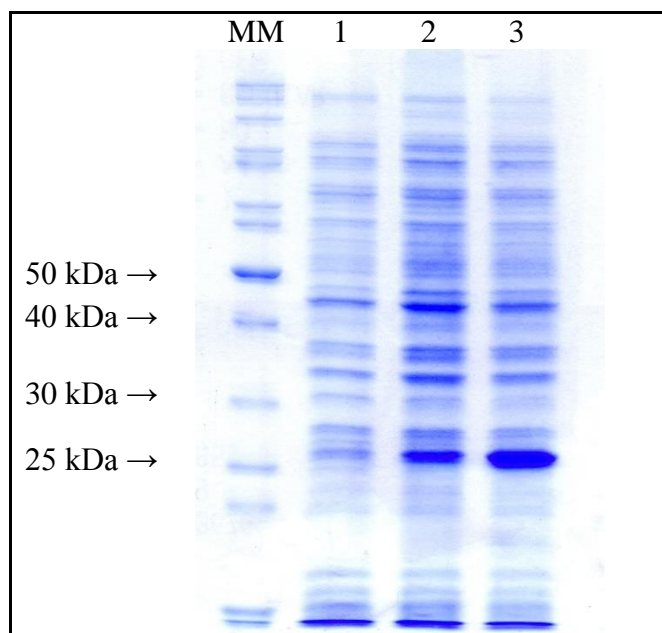
3.1.1. *E. coli* transformacija ir huPrP23-231 raiška

Kompetentinės *E. coli* BL(21) Star™ (DE3) ląstelės transformuotos pRSETB-6xHis-huPrP23-231 konstruktu, kurį sudaro pRSETB plazmidė su įterpta huPrP23-231 baltymo seka. Transformuotos bakterijos auginamos ant agarizuotos LB terpės. Pasirinkta kolonija padauginta LB terpėje ir atlikti trys auginimai. Auginama 6 val. autoinduktyvioje terpėje. Pasirinkta autoinduktyvi, o ne LB terpė, nes ją naudojant nereikia nuolatos stebėti kultūros optinio tankio ir iš laboratorijos praktikos žinoma, kad joje užauga didesnis biomasės kiekis.

3.1.1 lentelė. Ląstelių auginimo duomenys.

Laikas po užsėjimo, val.	Optinis tankis ($\lambda = 600$ nm)	Tūris, l	Biomasė, g
6	1,827	1,2	6,88
6	1,836	1,6	10,6
6	1,905	1,6	10,8

Ar indukavosi baltymo raiška ir ar indukuotas baltymas yra tikrai huPrP23-231-6His, patikrinta atliekant NDS-PAGE analizę.



3.1.1 pav. huPrP23-231 raiškos patikrinimas. MM – molekulinės masės markeris, 1, 2, 3 – *E. coli* kultūros mėginiai, paimti atitinkamai praėjus 2, 4 ir 5 val. po užsėjimo.

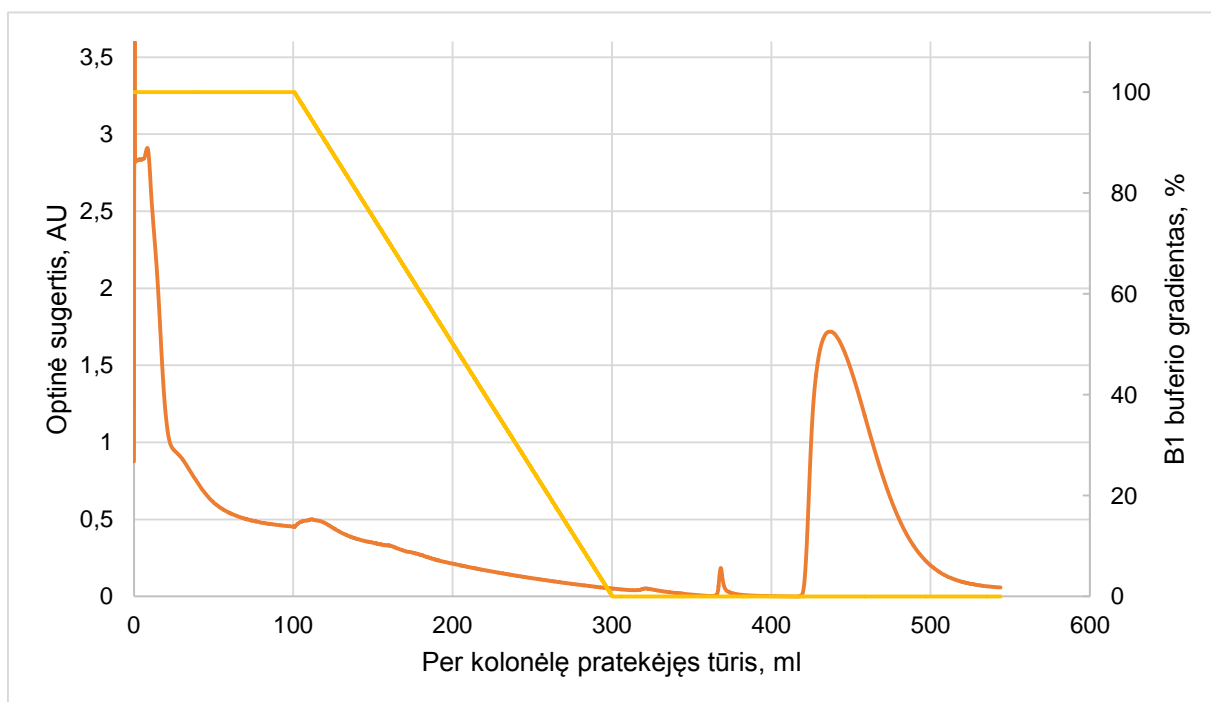
huPrP23-231-6His molekulinė masė, apskaičiuota pasinaudojant „ProtParam“ programa, yra 25044,6 Da. NDS-PAGE gelyje matome po 5 val. auginimo žymiai padidėjusią 25 kDa molekulinės masės baltymo raišką. Tai įrodo, kad baltymo huPrP23-231-6His indukcija buvo sėkminga.

3.1.2. Giminingumo chromatografija

Surinktos biomasės ardytos ultragarsu. Atlikta baltymo renatūracija ir gryninimas naudojant „Ni Sepharose 6 Fast Flow“ sorbentą. Frakcijos, turinčios didžiausią huPrP23-231-6His baltymo koncentraciją, surinktos ir dializuotos A4 arba A5 buferiniuose tirpaluose. Po dializės baltymo tirpalas filtruotas naudojant „Millipore Durapore™“ indus ir nustatyta baltymo koncentracija.

3.1.2 lentelė. Giminingumo chromatografijos duomenys

Biomasė, g	Dializės buferis	tūris, ml	Baltymo: konc., mg/ml	kiekis, mg
6,88	A4	98	0,592	58,0
10,6	A4	110	0,696	76,6
10,8	A5	99	0,741	73,4



3.1.2 pav. Giminingumo chromatografijos chromatograma. Chromatogramoje pavaizduotas sugerties kitimas (■) matuojamas ties 280 nm bangos ilgiu ir B1 buferio gradientas (■).

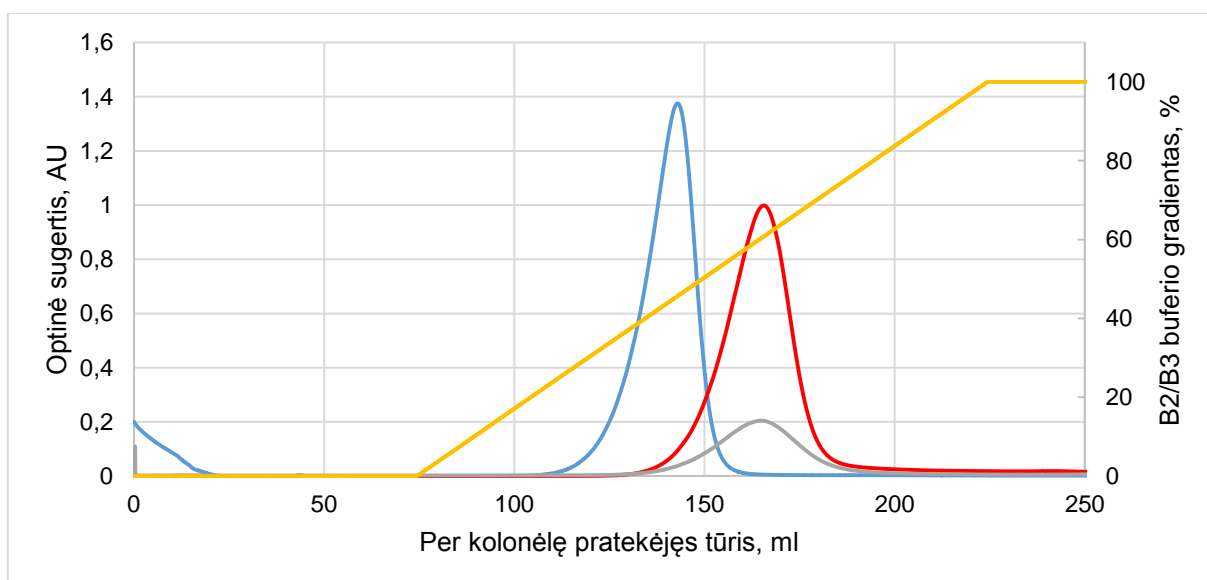
3.1.3. Jonų mainų chromatografija

Po giminingumo chromatografijos gautas baltymas padalinamas į dalis po ~ 30 mg. Kiekviena dalis atskirai kerpama trombinu ir gryninama jonų mainų chromatografija. Gauti baltymo kiekiai pateikti 3.1.3 lentelėje.

3.1.3 lentelė. Jonų mainų chromatografijos duomenys.

Užnešta baltymo, mg	PO ₄ ³⁻ konc., mM	Gauta baltymo, mg	Išeiga, %
31,3	10	8,1	28,1
29,0	10	16,4	61,5 ^a
29,0	10	2,4	8,9
24,5	100	17,6	78,3

^a Naudotas naujas sorbentas. Jį perpanaudojant išeiga vėl sumažėjo.



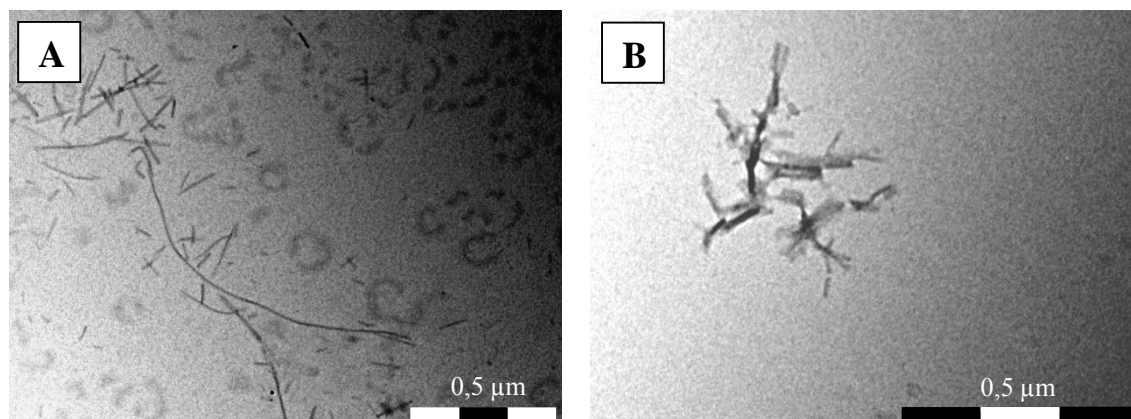
3.1.3 pav. Jonų mainų chromatografijos chromatograma. Chromatogramoje pavaizduotas sugerties kitimas naudojant pirminį gryninimo metodą (■), naudojant naują sorbentą (■) ir naudojant pakeistą gryninimo metodą (■). Taip pat pavaizduotas B2 (B3) buferinio tirpalo gradientas (■).

Pirmųjų gryninimų metu buvo gaunamos labai nedidelės išeigos, neviršijančios 30 % (išskyrus naudojant naują sorbentą). Baltymas agreguodavo kolonėlėje arba labai stipriai prisijungdavo prie sorbento ir dėl to jo elucija vykdavo tik dalinai. Vėliau pastebėta, kad per kolonėlę leidžiant B3 buferinį tirpalą pH staiga sumažėdavo iki 4. Šiai problemai pašalinti buvo nuspresta jonų mainų chromatografijai naudoti buferinius tirpalus, turinčius 10 kartų didesnę (t.y. 100 mM) PO₄³⁻ koncentraciją. Atlikus šiuos pakeitimus baltymo išeiga padidėjo daugiau nei dviem su puse karto, iki 78,3 %. Chromatogramoje (3.1.3 pav.) matyti, jog baltymas yra

grynas, o smailės atsiranda per kolonėlę pratekėjus skirtingam tūriui, nes naudoti B2 (B3) buferiniai tirpalai turėjo skirtingą NaCl koncentraciją.

3.2. huPrP23-231 ir huPrP90-231 amiloidinių fibrilių *de novo* gaminimas

Amiloidinės fibrilės gamintos iš bakalaurinio darbo metu išgryninto huPrP23-231 ir anksčiau laboratorijoje gryninto huPrP90-231 baltymo. Norint gauti skirtingų kamienų fibriles naudotos dvi guanidino hidroklorido koncentracijos. Naudojant 2 M guanidino hidroklorido koncentracijos buferinį tirpalą fibrilės susidarydavo per 4 dienas, o naudojant 4 M – per savaitę. Šiam procesui pagreitinti nuspręsta baltymą agreguoti aukštesnėje temperatūroje. Temperatūrą pakėlus nuo 37 °C iki 60 °C, fibrilės susidarydavo per ~ 15 val. Fibrilių susidarymas patvirtintas, pridėjus ThT dažo ir matuojant jo fluorescensiją. Kadangi literatūros šaltiniuose nepavyko rasti, ar huPrP23-231 ir huPrP90-231 60 °C ir 2 M arba 4 M guanidino chlorido tikrai sudaro fibriles, o ne kitokius amiloidinius agregatus, atlikta analizė elektroniniu mikroskopu. Padarytose nuotraukose matėsi fibrilinės struktūros (pav. 3.2), tačiau trumpesnis baltymas buvo labiau linkęs sudaryti didelius agregatus, nei ilgas baltymas.

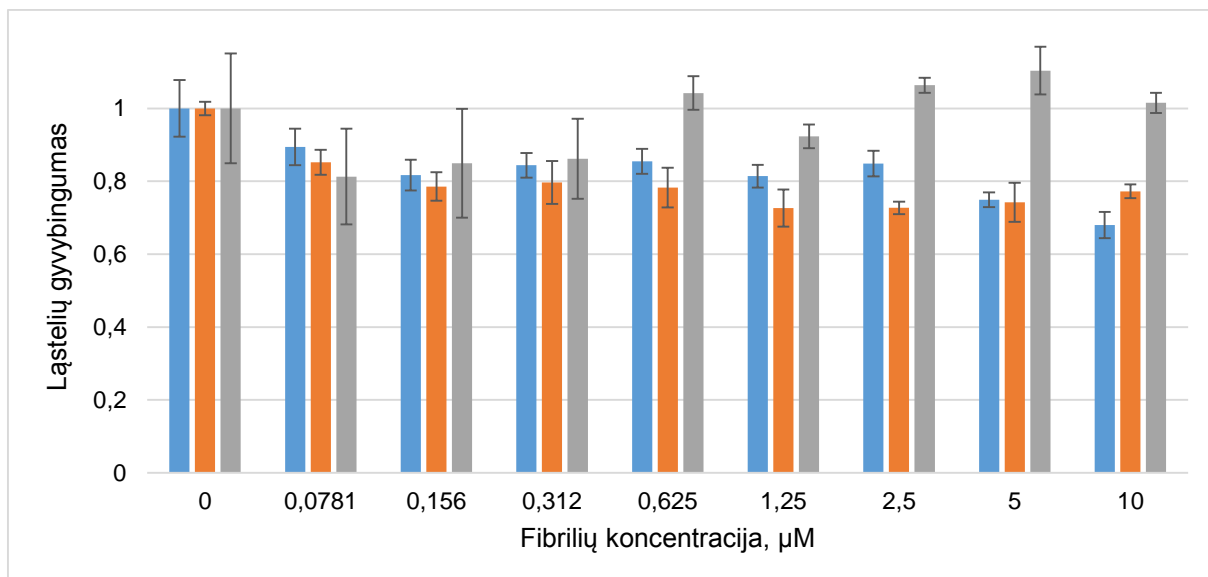


3.2 pav. Elektroninio mikroskopo nuotraukos. A – huPrP23-231, B – huPrP90-231 amiloidinės fibrilės.

3.3. Toksiškumo vėžinėms ląstelėms tyrimas MTT metodu

MTT metodu atliktuose žmogaus prioninio baltymo amiloidinių fibrilių toksiškumo tyrimuose naudotos dvi žmogaus vėžinių ląstelių linijos. Neuroblastomos ląstelės SK-N-BE2, išskirtos iš kaulų čiulpuose susiformavusių metastazių, bei glioblastomos ląstelės U87, išskirtos iš smegenų. Susidariusios fibrilės eksperimentams su ląstelėmis paruošiamos keičiant guanidino hidroklorido turintį buferinį tirpalą į ląstelių augimo terpę DMEM bei ultragarsu suardant fibriles pagal 2.2.8. skirsnyje aprašytą metodiką. Ląstelės užsėjamos 96 šulinėlių plokštelėse, kuriose inkubuojamos su amiloidinėmis fibrilėmis, kurių toksiškumas nustatomas

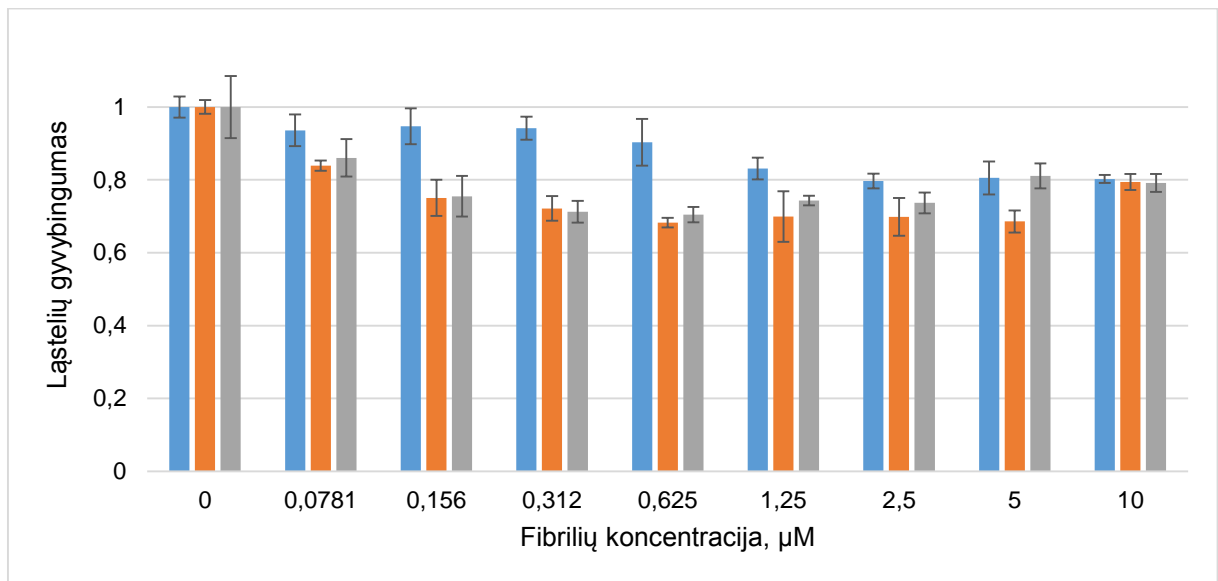
pagal 2.2.9. skirsnyje aprašytą metodiką. Atliekant skirtingų fibrilių tyrimus naudojant skirtingas ląstelių linijas buvo norima patikrinti, ar toksiškumas priklauso nuo fibrilių kamieno ir ląstelių rūšies.



3.3 A pav. SK-N-BE2 ląstelių gyvybingumas, jas paveikus huPrP23-231 baltymo amiloidinėmis fibrilėmis, susidariusiomis 2 M (■) ir 4 M (■) guanidino hidrochlorido, ir huPrP90-231 – susidariusiomis 2 M guanidino hidrochlorido (■). Ląstelės su fibrilėmis inkubuotos 3 paras.

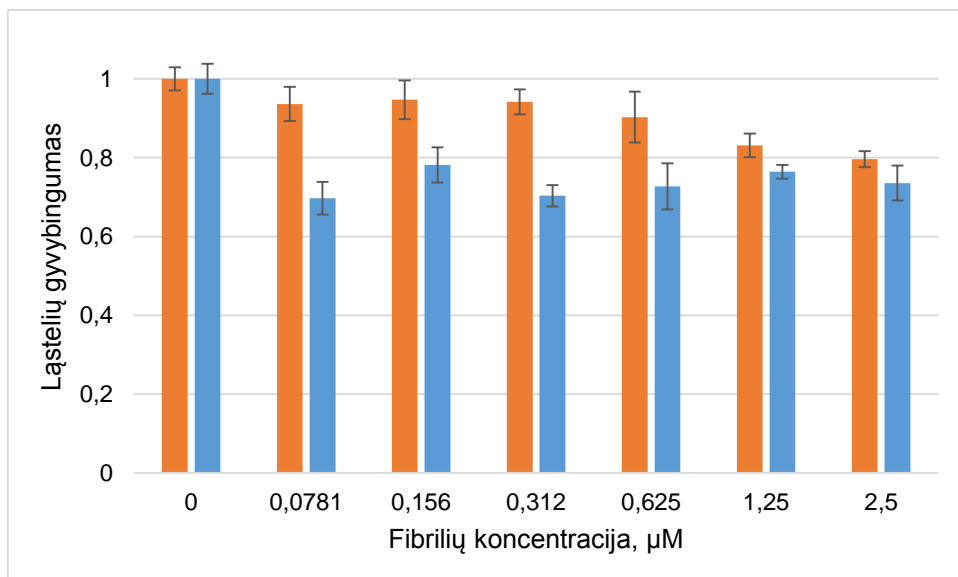
Atlikus fibrilių toksiškumo tyrimus SK-N-BE2 ląstelėms, nustatyta, kad huPrP23-231 amiloidinės fibrilės, nepriklausomai nuo jų susidarymo sąlygų, ląstelių gyvybingumą veikia beveik vienodai (paklaidų ribose) (3.3 A pav.). Poveikis yra nedidelis. Gyvybingumas nuo koncentracijos nepriklauso ir svyruoja nuo $68 \pm 3,6$ % iki 89 ± 5 %. Amiloidinės fibrilės, susidariusios iš huPrP90-231 baltymo, nebuvo toksiškos SK-N-BE2 ląstelėms.

Palyginimui buvo atlikti eksperimentai su glioblastomos ląstelėmis U87. Naudotos tos pačios fibrilės. Rezultatai nežymiai skiriasi nuo gautų su SK-N-BE2 (3.3 B pav.). Šiuo atveju huPrP23-231 fibrilės, susidariusios 2 M guanidino hidrochlorido, mažomis koncentracijomis (0,0781 – 0,625 µM) neveikė ląstelių gyvybingumą, tačiau didesnėmis koncentracijomis (2,5 – 10 µM) ląstelių gyvybingumą sumažino apie 20 %. To paties baltymo fibrilės, susidariusios 4 M guanidino hidrochlorido, ląstelių gyvybingumą sumažino nuo 16 ± 1 % iki 32 ± 3 %, tačiau poveikio dydis nekoreliavo ($r = 0$, $p = 0,7$) su fibrilių koncentracija. Toks skirtumas mažose koncentracijose tarp skirtingomis sąlygomis paruoštų fibrilių galėjo atsirasti todėl, kad 2 M guanidino hidrochlorido susidariusios fibrilės yra termodinamiškai mažiau stabilios ir jų suskaidymas ląstelėse turėtų vykti lengviau. Suskaidžius fibriles nebeliktų toksiškumo šaltinio ir ląstelių gyvybingumas nebūtų paveiktas arba paveiktas labai nežymiai.



3.3 B pav. U87 ląstelių gyvybingumas, jas paveikus huPrP23-231 baltymo amiloidinėmis fibrilėmis, susidariusiomis 2 M (■) ir 4 M (■) guanidino hidrochlorido, ir huPrP90-231 – susidariusiomis 2 M guanidino hidrochlorido (■). Ląstelės su fibrilėmis inkubuotos 3 paras.

huPrP90-231 fibrilės buvo silpnai toksiškos U87 ląstelėms, tačiau poveikio stiprumas nekoreliavo su fibrilių koncentracija ($r = 0$, $p = 0.15$). Ląstelių gyvybingumas sumažėjo nuo $14 \pm 5 \%$ iki $30 \pm 2 \%$. Tai skiriasi nuo rezultatų, gautų su SK-N-BE2 ląstelėmis, tačiau dėl didelių paklaidų kontroliniuose eksperimentuose sudėtinga įvertinti, ar skirtumas yra reikšmingas.

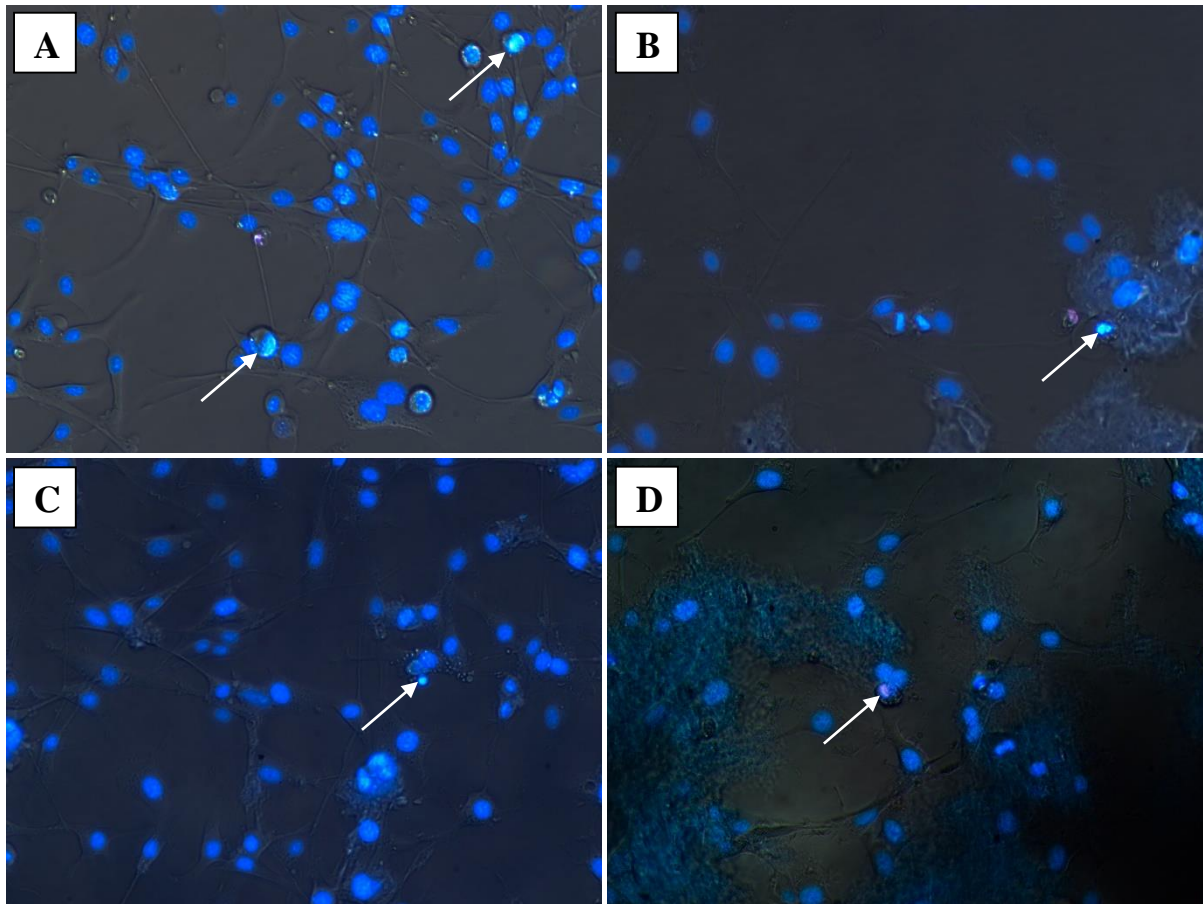


3.3 C pav. U87 ląstelių gyvybingumas, jas paveikus huPrP23-231 baltymo amiloidinėmis fibrilėmis, susidariusiomis 2 M guanidino hidrochlorido. Ląstelės veiktos 3 (■) arba 5 (■) dienas.

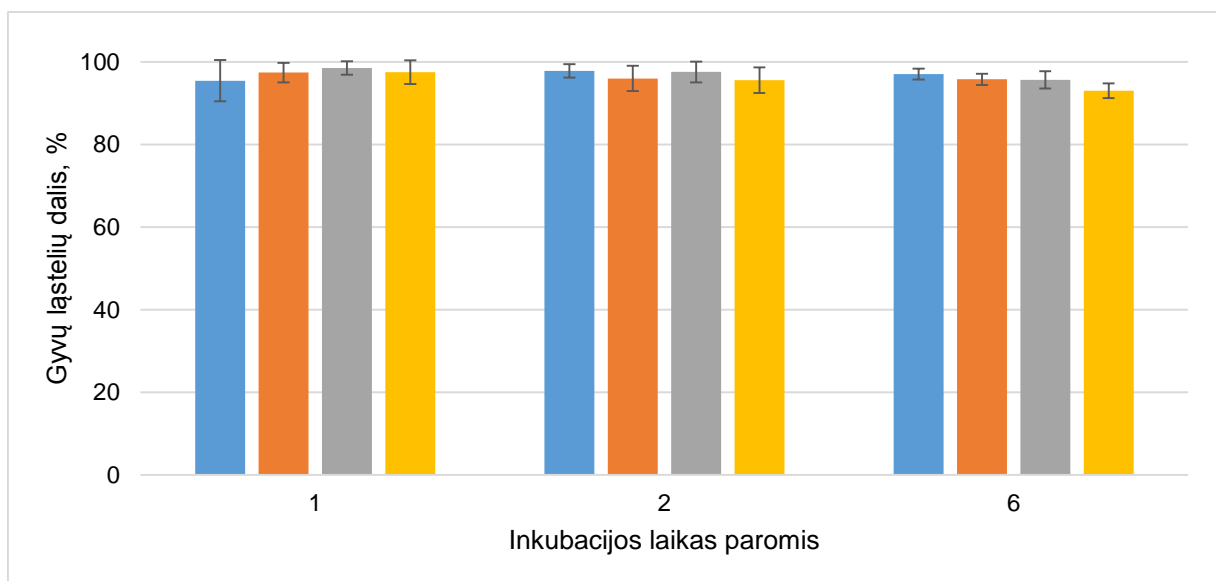
Siekiant nustatyti, ar fibrilių toksinis poveikis priklauso nuo inkubacijos trukmės, atlikti bandymai, kurių metu U87 ląstelės buvo veikiamos huPrP23-231 baltymo amiloidinėmis fibrilėmis, susidariusiomis 2 M guanidino hidroklorido. Gyvybingumas matuotas praėjus 3 ir 5 dienoms (3.3 C pav.). Po 5 dienų pamatavus U87 ląstelių gyvybingumą, jis buvo sumažėjęs nuo $22 \pm 4 \%$ iki $30 \pm 4 \%$. Gyvybingumo sumažėjimas nekoreliavo su fibrilių koncentracija ($r = 0$, $p = 0,5$). Tuo tarpu fibrilėmis ląsteles veikiant trumpesnę laiką – 3 dienas, stebima gyvybingumo priklausomybė nuo fibrilių koncentracijos ($r = -0,9$, $p < 0,005$). Tai prieštarauja prieš tai iškeltai hipotezei, kad mažos fibrilių koncentracijos yra nekenksmingos, nes gali būti suskaidytos. Mažesnių fibrilių koncentracijų toksiškumo pasireiškimą po ilgesnio inkubavimo laikotarpio galima paaiškinti, jei fibrilės yra ne vien tik toksiškos, bet ir infektyvios. Tokios fibrilės mažomis koncentracijomis negalėtų paveikti ląstelės gyvybingumo, tačiau galėtų ląstelės PrP^C baltymą paversti į PrP^{Sc} panašiomis fibrilėmis. Naujai susidariusių fibrilių koncentracija didėtų ir pasiektų toksišką lygį.

3.4. Toksiškumo vėžinėms ląstelėms tyrimas fluorescencinės mikroskopijos metodu

Fluorescencinės mikroskopijos metodu nustatant žmogaus prioninio baltymo amiloidinių fibrilių toksiškumą naudotos U87 ląstelės. Ląstelės užsėjamos 24 šulinėlių plokštelėse. Fibrilės eksperimentams paruošiamos taip pat, kaip ir MTT metodui (žiūrėti 2.2.8. skirsnyje aprašytą metodiką). Ląstelės inkubuojamos su 2,5 μ M arba 5 μ M amiloidinių fibrilių ir po 1, 2 ir 6 parų nustatomas gyvų, apoptozinių ir nekrozinų ląstelių skaičius. Tai nustatoma ląsteles dažant Hoechst 33342 ir propidžio jodidu (plačiau 2.2.10. skirsnyje).



3.4 A pav. Propidžio jodidu ir Hoechst 33342 dažytų U87 ląstelių fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos. A nuotraukoje ląstelės augusios be fibrilių, B ir C nuotraukose ląstelės paveiktos 2,5 μM atitinkamai huPrP23-231 ir huPrP90-231 fibrilėmis, o D nuotraukoje paveiktos 5 μM huPrP90-231. Rodyklėmis pažymėtos apoptozinės ląstelės.



3.4 B pav. Gyvų U87 ląstelių procentinė dalis, jas paveikus huPrP23-231 arba huPrP90-231 amiloidinėmis fibrilėmis susidariusiomis 2 M guanidino hidrochlorido. Stulpeliai atitinka kontrolinę grupę (■), ląsteles paveiktas 2,5 μM huPrP23-231 (■) arba huPrP90-231 (■) fibrilių ir 5 μM huPrP90-231 fibrilių (■).

Išanalizavus fluorescenciniu mikroskopu padarytas nuotraukas (3.4 A pav.), nustatyta, kad žmogaus prioninio baltymo amiloidinės fibrilės neveikia apoptozės ir nekrozės procesų. Ląsteles paveikus huPrP23-231 ir huPrP90-231 baltymų fibrilėmis ir po 1, 2 ir 6 dienų nustatčius procentinę gyvų ląstelių dalį paaiškėjo, kad šis rodiklis, visomis sąlygomis, paklaidų ribose sutampa su kontroliniais mėginiais (3.4 B pav.). Tokie rezultatai sutampa su literatūroje randamais teiginiais, jog subrendusios fibrilės yra žymiai mažiau toksiškos už tirpius oligomerus susidarančius fibrilių formavimosi pradžioje (Huang *et al.*, 2013). Amiloidinių baltymų toksiškumo tyrimuose pastebima bendra tendencija, kad toksiškumas didėja agregatams trumpėjant. Šiuo tikslu fibrilės ardytos ultragarsu, tačiau tai nesukėlė apoptozės ir nekrozės.

IŠVADOS

1. Parinktos tinkamos jonų mainų chromatografijos sąlygos ir huPrP23-231 baltymo gryninimo išeiga padidinta 50 – 70 %.
2. Naudojant 2 M ir 4 M guanidino hidroklorido turinčius buferinius tirpalus *de novo* pagamintos huPrP23-231 ir huPrP90-231 baltymų amiloidinės fibrilės.
3. Prioninių baltymų amiloidinės fibrilės U87 ląstelėms yra mažai toksiškos ir sumažina gyvybingumą ne daugiau nei 30 ± 4 %, tačiau apoptozės dažnio nepadidina.
4. Prioninio baltymo huPrP23-231 fibrilės SK-N-BE2 ląstelėms yra mažai toksiškos ir sumažina gyvybingumą nuo 11 ± 5 % iki $32 \pm 3,6$ %. Prioninio baltymo huPrP90-231 fibrilės SK-N-BE2 ląstelėms yra netoksiškos.
5. Visais atvejais fibrilių koncentracija nekoreliavo su gyvybingumu, išskyrus U87 ląsteles veikiant huPrP23-231 fibrilėmis, susidariusiomis 2 M guanidino hidroklorido.

Assessment of Human Prion Protein Toxicity to Cancer Cells

SUMMARY

Prion protein (PrP) has an intrinsic ability to exist in two distinct conformations. Normal protein conformation (PrP^C) plays a significant role in neuron proliferation and synapse formation, whereas fibrillar infective conformation (PrP^{Sc}) is responsible for various transmissible spongiform encephalopathies. PrP^{Sc} possesses an ability to convert PrP^C to PrP^{Sc}, however PrP^{Sc}-like fibrils formed from recombinant PrP in most cases does not retain this capability.

In this work, the purification protocol of recombinant PrP was altered to achieve a threefold increased yield. Purified protein was aggregated to form fibrils in various conditions. The toxicity of fibrils assessed using MTT assay was low and reduced vitality of cells by up to 30 %. Fluorescence microscopy did not reveal any increase in apoptosis or necrosis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Afanasieva EG, Kushnirov VV, Ter-Avanesyan MD. Interspecies transmission of prions. *Biochem Biokhimiia*. 2011;76(13):1375–84.
- Basu S, Mohan ML, Luo X, Kundu B, Kong Q, Singh N. Modulation of Proteinase K-resistant Prion Protein in Cells and Infectious Brain Homogenate by Redox Iron : Implications for Prion Replication and Disease Pathogenesis. *Mol Biol Cell*. 2007;18:3302–12.
- Benetti F, Legname G. De novo mammalian prion synthesis. *Prion*. 2009;3(4):213–9.
- Bertsch U, Winklhofer KF, Hirschberger T, Bieschke J, Weber P, Hartl FU, Tavan P, Kretschmar HA, Giese A. Systematic Identification of Antiprion Drugs by High-Throughput Screening Based on Scanning for Intensely Fluorescent Targets. *J Virol*. 2005;79(12):7785–91.
- bio.davidson.edu [internetinė svetainė]. Davidson: Davidson College, Department of Biology; sukurta 2003 01 [atnaujinta 2003 03 13; cituota 2014 06 05]. Adresas: <http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/wilsone/home.prions.html>.
- Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Jörg L, Frank S. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol*. 2009;463(09):439–73.
- Brandel JP, Peckeu L, Haïk S. The French surveillance network of Creutzfeldt-Jakob disease. Epidemiological data in France and worldwide. *Transfus Clin Biol*. 2013;20(4):395–7.
- Brown K, Mastrianni J. The prion diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010;23(4):277–98.
- Cali I, Castellani R, Yuan J, Al-Shekhlee A, Cohen ML, Xiao X, Molerés FJ, Parchi P, Zou WQ, Gambetti P. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain*. 2006;129(Pt 9):2266–77.
- Cobb NJ, Sönnichsen FD, McHaourab H, Surewicz WK. Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(48):18946–51.

Colby DW, Giles K, Legname G, Wille H, Baskakov IV, DeArmond SJ, Prusiner SB. Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(48):20417–22.

Colby DW, Prusiner SB. *Prions*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(1):a006833.

Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*. 2007;318(5852):930–6.

Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:519–50.

Cuatrecasas P. Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J Biol Chem*. 1970;245:3059–65.

Deleault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(23):9741–6.

Gambetti P, Cali I, Notari S, Kong Q, Zou W, Surewicz WK. Molecular biology and pathology of prion strains in sporadic human prion diseases. *Acta Neuropathol*. 2011;121(1):79–90.

Ghaemmaghami S, May BCH, Renslo AR, Prusiner SB. Discovery of 2-aminothiazoles as potent antiprion compounds. *J Virol*. 2010;84(7):3408–12.

Ghaemmaghami S, Russo M, Renslo AR. Successes and Challenges in Phenotype-Based Lead Discovery for Prion Diseases. *J Med Chem*. Priimtas spaudai 2014.

Gossert AD, Bonjour S, Lysek D, Fiorito F, Wüthrich K. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):646–50.

Huang P, Lian F, Wen Y, Guo C, Lin D. Prion protein oligomer and its neurotoxicity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(6):442–51.

Jansen C, Parchi P, Jelles B, Gouw AA, Beunders G, van Spaendonk RML, van de Kamp JM, Lemstra AW, Capellari S, Rozemuller AJ. The first case of fatal familial insomnia (FFI) in the Netherlands: a patient from Egyptian descent with concurrent four repeat tau deposits. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011;37(5):549–53.

Knowles TPJ, Waudby C, Devlin GL, Cohen SI, Aguzzi A, Vendruscolo M, Terentjev EM, Welland ME, Dobson CM. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science*. 2009;326(5959):1533–7.

- Kocisko DA, Baron GS, Rubenstein R, Chen J, Kuizon S, Caughey B. New Inhibitors of Scrapie-Associated Prion Protein Formation in a Library of 2,000 Drugs and Natural Products. *J Virol* 2003;77(19):10288–94.
- Lee HP, Jun YC, Choi JK, Kim JI, Carp RI, Kim YS. Activation of mitogen-activated protein kinases in hamster brains infected with 263K scrapie agent. *J Neurochem*. 2005;95(2):584–93.
- Legname G, Baskakov IV, Nguyen HOB, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Synthetic mammalian prions. *Science*. 2004;305(5684):673–6.
- Linden R, Martins VR, Prado MAM, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev*. 2008;88(2):673–728.
- Lloyd S, Mead S, Collinge J. Genetics of Prion Disease. In: Tatzelt J, editor. *Prion Proteins*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2011. P.1-22.
- Marijanovic Z, Caputo A, Campana V, Zurzolo C. Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):e1000426.
- Middelberg APJ. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol*. 2002;20(10):437–43.
- Pauly PC, Harris DA. Copper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein. *J Biol Chem*. 1998 Dec 11 [cited 2014 May 15];273(50):33107–10.
- Poulter M, Baker HF, Frith CD, Leach M, Lofthouse R, Ridley RM, Shah T,F. Owen F, Collinge J, Brown J, Hardy J, Mullan MJ, Harding AE, Bennett C, Doshi R, Crow TJ. Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion: 1. Genealogical and molecular studies. *Brain*. 1992;115(3):675–85.
- Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science*. 1991;252(5012):1515–22.
- Requena JR, Wille H. The structure of the infectious prion protein: Experimental data and molecular models. *Prion*. 2014;8(1):60–6.
- Riudavets MA, Sraka MA, Schultz M, Rojas E, Martinetto H, Begué C, de Halac IN, Poleggi A, Equestre M, Pocchiari M, Sevlever G, Taratuto AL. Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome with Variable Phenotype in a New Kindred with PRNP-P102L Mutation. *Brain Pathol*. 2013;24:142–7.
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*. 1998;4(10):1157–65.
- Sasnauskienė S. *Chromatografijos metodai*. Kaunas: Technologija; 2008.

Schmitz M, Lüllmann K, Zafar S, Ebert E, Wohlhage M, Oikonomou P, Schlomm M, Mitrova E, Beekes M, Zerr I. Association of prion protein genotype and scrapie prion protein type with cellular prion protein charge isoform profiles in cerebrospinal fluid of humans with sporadic or familial prion diseases. *Neurobiol Aging*. Elsevier Ltd; 2014;35(5):1177–88.

Shorter J, Lindquist S. Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities. *Mol Cell*. 2006;23(3):425–38.

Smirnovas V, Baron GS, Offerdahl DK, Raymond GJ, Caughey B, Surewicz WK. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(4):504–6.

Smirnovas V, Kim JI, Lu X, Atarashi R, Caughey B, Surewicz WK. Distinct structures of scrapie prion protein (PrP^{Sc})-seeded versus spontaneous recombinant prion protein fibrils revealed by hydrogen/deuterium exchange. *J Biol Chem*. 2009;284(36):24233–41.

Surewicz WK, Apostol MI. Prion protein and its conformational conversion: a structural perspective. In: Tatzelt J, editor. *Prion Proteins*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2011. P. 135-168.

Tahiri-Alaoui A, Gill AC, Disterer P, James W. Methionine 129 variant of human prion protein oligomerizes more rapidly than the valine 129 variant: implications for disease susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem*. 2004;279(30):31390–7.

Takada LT, Geschwind MD. Prion diseases. *Semin Neurol*. 2013;33(4):348–56.

Van Rheede T, Smolenaars MMW, Madsen O, de Jong WW. Molecular Evolution of the Mammalian Prion Protein. *Mol Biol Evol*. 2003;20(1):111–21.

Vanderbilt.edu [internetinè svetainè]. Nashville (JAV): Vanderbilt University, Center for Structural Biology. Sukurta 2000 05 [atnaujinta 2005 08 26; cituota 2014 05 12]. Adresas: <http://structbio.vanderbilt.edu/chazin/wisdom/labpro/thrombin.html>.

Xiao X, Cali I, Dong Z, Puoti G, Yuan J, Qing L, Wang H, Kong Q, Gambetti P, Zou W-Q. Protease-sensitive prions with 144-bp insertion mutations. *Aging (Albany NY)*. 2013;5(3):155-73.