



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS FAKULTETAS  
GAMTOS MOKSLŲ KATEDRA

Biochemijos studijų programos IV kurso studentas

Darius ŠULSKIS

---

TARPRŪŠINIO BARJERO TARP ŽMOGAUS IR  
ŽIURKĖNO PRIONINIO BALTYMO TYRIMAS

---

BAIGIAMASIS DARBAS

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

VILNIUS, 2015

## BAIGIAMASIS DARBAS

---

# TARPRŪŠINIO BARJERO TARP ŽMOGAUS IR ŽIURKĖNO PRIONINIO BALTYMO TYRIMAS

---

Darbas paruoštas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto  
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Studentas:

Darius ŠULSKIS

\_\_\_\_\_

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

\_\_\_\_\_

VILNIUS, 2015

# Turinys

<b>Santrumpos</b>	<b>3</b>
<b>Įvadas</b>	<b>4</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b>	<b>5</b>
1.1. Prioninės ligos . . . . .	5
1.1.1. sCJD . . . . .	5
1.1.2. Kuru . . . . .	6
1.1.3. Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) sindromas . . . . .	6
1.1.4. Fatalinė nemiga . . . . .	6
1.1.5. Jatrogeninė CJD . . . . .	6
1.1.6. vCJD . . . . .	7
1.2. Prionų kamienai . . . . .	7
1.3. Tarprūšinis barjeras . . . . .	7
1.4. Mutacijos ir polimorfizmai . . . . .	9
1.4.1. N-galas . . . . .	10
1.4.2. C-galas . . . . .	10
1.5. Prioniniai baltymai . . . . .	11
1.6. <i>De novo</i> ir PMCA prionai . . . . .	11
1.7. Prioninių baltymų agregacijos mechanizmai . . . . .	12
1.8. Prioninių baltymų struktūra . . . . .	13
1.8.1. PrP <sup>C</sup> struktūra . . . . .	13
1.8.2. PrP <sup>Sc</sup> struktūra . . . . .	14
1.8.3. Amiloidinės fibrilės . . . . .	15
1.9. Tioflavinas T . . . . .	15
1.9.1. Amiloidinių fibrilių agregacijos kinetika . . . . .	16
<b>2. Medžiagos ir metodai</b>	<b>17</b>
2.1. Medžiagos . . . . .	17
2.1.1. Rinkiniai . . . . .	17
2.1.2. Konstruktai . . . . .	17
2.1.3. Laboratorinė įranga . . . . .	17
2.1.4. Mitybinės terpės . . . . .	19
2.1.5. Tirpalai . . . . .	19
2.2. Metodai . . . . .	20
2.2.1. Sekų palyginimas ir pradmenų konstravimas . . . . .	20
2.2.2. Kryptinga mutagenezė . . . . .	20
2.2.3. Kompetentinių ląstelių ruošimas . . . . .	21

2.2.4.	Kompetentinių ląstelių transformacija . . . . .	21
2.2.5.	Kultūros auginimas ir tikslinio baltymo raiškos indukcija . . . . .	22
2.2.6.	Baltymų elektroforezė . . . . .	22
2.2.7.	Baltymo renatūracija ir gryninimas . . . . .	23
2.2.8.	<i>De novo</i> fibrilių susidarymas . . . . .	23
2.2.9.	Mėginių paruošimas elektronei mikroskopijai . . . . .	23
2.2.10.	Agregacijos kinetika . . . . .	23
<b>3.</b>	<b>Rezultatai ir jų aptarimas</b>	<b>24</b>
3.1.	Maišymo pobūdžio įtaka agregacijai . . . . .	24
3.2.	Žmogaus ir žiurkėno fibrilių „sėklos“ įtaka . . . . .	25
3.3.	Sekų palyginimas . . . . .	25
3.4.	Kryptinga mutagenezė . . . . .	26
3.5.	Auginimas . . . . .	27
3.6.	Renatūracija ir giminingumo chromatografija . . . . .	27
3.7.	Mutacijų įtaka baltymų agregacijai . . . . .	28
3.7.1.	ShaPrP fibrilių „sėklos“ įtaka baltymams su mutacijomis . . . . .	28
3.7.2.	Mutantų fibrilių „sėklos“ įtaka HuPrP baltymui . . . . .	29
<b>4.</b>	<b>Išvados</b>	<b>32</b>
	<b>Santrauka</b>	<b>33</b>
	<b>Summary</b>	<b>34</b>
	<b>Priedai</b>	<b>35</b>
	<b>Literatūros sąrašas</b>	<b>36</b>

## Santrumpos

aps./min – Apsisukimai per minutę

ar. – aminorūgštys

CJD – Creutzfeldt-Jakob liga

jCJD – Jatrogeninė CJD

vCJD – Naujo varianto CJD

sCJD – Spontaninė CJD

BSE – Galvijų spongiforminė encefalopatija (angl. bovine spongiform encephalopathy)

EDTA – Etilendiamino-tetraacetatas

FI – Fatalinė nemiga (angl. familial fatal insomnia)

IPTG – Izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozidas

IR – Infraraudonieji spinduliai

IMAC — Imobilizuotų metalo jonų afininė chromatografija

HuPrP23-232 – Rekombinantinis žmogaus prioninis baltymas be signalinių sekų

GSS – Gerstmann-Strausser-Scheinker sindromas

MoPrP223-230 – Rekombinantinis pelės prioninis baltymas be signalinių sekų

NDS – Natrio dodecilsulfatas

NDS-PAGE – Natrio dodecilsulfato poliakrilamidinė gelelektroforezė

PIPES – Piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis)

PK – Proteinazė K

PGR – Polimerazės grandininė reakcija

PRNP – Žmogaus prioninio baltymo genas

PMCA – Netinkamai sulankstomų baltymų amplifikacija

rPrP – Rekombinantinis prioninis baltymas

PrP<sup>C</sup> – Natyvios struktūros prioninis baltymas

PrP<sup>Sc</sup> – Infektyvi prioninio baltymo forma

OT – Optinis tankis

ShaPrP23-232 – Nekombinantinis žiurkėno prioninis baltymas be signalinių sekų

TEMED — N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas

ThT – Tioflavinas T

TME – Transmisinė audinių encefalopatija (angl. Transmissible mink encephalopathy)

VPSPr – Ligos, susijusios su proteazėm jautriais prionais (angl. variably protease-sensitive prionopathy)

TRIS — 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

TSE – Transmisinės spongiforminės encefalopatijos

wt – Laukinis tipas (angl. wild type)

## Įvadas

1982 m. buvo pasiūlytas terminas prionas (angl. prion), kuris apibūdina mažą, baltyminės kilmės, infektyvią dalelę, sukeliančią transmissines spongiformines encefalopatijas (TSE) arba kitaip kempinliges. Tai sukėlė didelę bangą įvairių tyrimų, nes iki tol buvo žinoma, kad bakterijos, virusai ir nukleorūgštys gali būti infektyvios, bet niekur nebuvo aprašyta, kad ligą gali perduoti baltymas.

Prioniniai baltymai gali būti dviejų formų: natyvios konformacijos  $\text{PrP}^C$  ir ligas sukeliančios, nenatyvios formos  $\text{PrP}^{Sc}$ , kurie tiesiog dar vadinami prionais.  $\text{PrP}^{Sc}$  sugeba natyvaus prioninio baltymo struktūrą pakeisti į tokią pačią kaip savo ir taip replikuotis.  $\text{PrP}^C$  turi daugiausia  $\alpha$ -spiralių struktūroje, bet pas  $\text{PrP}^{Sc}$  priešingai – dominuoja  $\beta$ -klostės. Pagal mikroskopijos rezultatus,  $\text{PrP}^{Sc}$  struktūra yra labai panaši į amiloidines fibriles, kurias gali formuoti daugelis baltymų, susijusių su neurodegeneratyvinėmis ligomis ( $\beta$ -amiloidas ir tau – Alzheimerio liga, alfa-sinukleinas – Parkinsono liga, huntingtininas – Huntingtono chorėja).

Tarp rūšių gali egzistuoti barjerai, kurie slopina arba net stabdo prionų infektyvumą. Barjerus lemia minimalūs skirtumai tarp prioninių baltymų aminorūgščių sekų. Dėl atrandamų naujų prionų kamienų, tarprūšinio barjero tyrimai svarbūs norint užkirsti kelią ligų plitimui tarp gyvūnų bei žmonių. Mano baigiamasis darbas tyrinėja barjerą tarp žmogaus ir žiurkėno prioninių baltymų.

**Darbo tikslas** – ištirti, ar tarp žiurkėno ir žmogaus prioninių baltymų yra tarprūšinis barjeras, ir jei yra, nustatyti, kuri aminorūgštis už tai atsakinga.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Patikrinti žiurkėno prioninio baltymo „sėklos“ veikimą žmogaus prioniniam baltymui.
2. Atlikti kryptingą mutagenezę ShaPrP23-232 genui.
3. Išgryninti modifikuotus baltymus.
4. Patikrinti mutacijų įtaką žmogaus ir žiurkėno prioninių baltymų agregacijai.

# 1. Literatūros apžvalga

## 1.1. Prioninės ligos

Prioninės ligos arba kitaip TSE yra neišgydomos, neurodegeneratyvinės ligos, kurios fiziologiniu požiūriu yra panašios į Alzheimerio arba Parkinsono ligas (Aguzzi ir Calella, 2009). Dažniausiai TSE ligas sukelia prioninio baltymo agregacija, priklausanti nuo geno mutacijų, polimorfizmų ar įvairių, sunkiai nustatomų aplinkos veiksnių (1 lentelė). TSE metu randami prioninių baltymų agregatai sutrumpintai vadinami PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> *in vivo* agregatai labai panašūs į amiloidines fibriles, kurias dažnai sudaro baltymai susiję su neurodegeneratyvinėmis ligomis (Moore et al., 2009). TSE metu baltymų agregatai kaupiasi centrinėje nervų sistemoje ir sukelia ląstelių žūtį bei audinių degeneraciją. Žinomiausios TSE ligos yra: kuru, spontaninė Creutzfeldt-Jakob liga (sCJD), paveldima CJD (fCJD), jatrogeninė CJD (jCJD), Gerstmann-Straussler-Scheinker sindromas (GSS), fatalinė nemiga (FI) ir naujo varianto CJD (vCJD) (Brown ir Mastrianni, 2010).

1 lentelė. Prioninės ligos Kretzschmar ir Tatzelt (2013)

Ligos	Priežastys
<b>Idiopatinės</b>	
sCJD	Tiksliai neištirta
sFI	Tiksliai neištirta
VPSPr	Tiksliai neištirta
<b>Genetinės</b>	
fCJD	20 ir daugiau PrP geno mutacijų
GSS	Tam tikros PrP geno mutacijos
FI	PrP D178N mutacija su M129
<b>Užkrečiamos</b>	
jCJD	Smegenų, ragenos ir kitų audinių gydymo metu
vCJD	Infekcija su BSA prionais
kuru	Ritualinis kanibalizmas

### 1.1.1. sCJD

Spontaninė CJD sudaro 90 % visų diagnozuojamų prioninių ligų (Kim et al., 2012). Pagal 129 kodone esančias aminorūgštis, sCJD skirstoma į kelis tipus: įprastinė (MM1/MV1), anksti pasireiškianti (VV1) ir ilgo inkubacijos laiko (MM2) (Gambetti et al., 2003). Visi tipai pasižymi skirtinga ligos vystymosi trukme, nevienodais proteinazės K karpomais fragmentais ir kitokiomis neuropatologinėmis savybėmis (Notari et al., 2008).

### 1.1.2. Kuru

Kuru – epideminė liga, kuria sirgo Naujosios Gvinėjos aborigenai, kurie užsiiminėjo ritualiniu kanibalizmu, taip išreiškdami savo gedulą mirusiems. Vietinėje kalboje „kuru“ reiškia drebėti, nes susirgusiems pasireiškė ataksija (Aguzzi et al., 2008). Palyginus kuru ir kitų prioninių ligų simptomus, nustatyta, jog sergančiųjų spontanine CJD ir PrP gene turinčių 129VV ar 129MV kodonus simptomai yra panašiausi į sergančiųjų kuru liga. Be to, pacientuose su 129MM ar 129MV genotipu nebuvo rasta MM1 tipo prionų (Kretzschmar ir Tatzelt, 2013).

### 1.1.3. Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) sindromas

Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) sindromas siejamas su PrP baltymo N-galo mutacijomis ir oktapeptidinių pasikartojimų įterpimais. GSS sindromas pripažįstamas kaip perduodama liga, tačiau tik prionai su P102L mutacija ir tik trečdalis išskirtų iš smegenų homogenizatų buvo infektyvūs (Aguzzi et al., 2008). Pacientams pasireiškia ataksijos, silpnaprotystės ligos požymiai, spazmine parapareze, sutrikusi elgsena, atmintis ir ankstyva Alzheimerio liga (Brown ir Mastrianni, 2010).

### 1.1.4. Fatalinė nemiga

Fatalinė nemiga (angl. familial fatal insomnia) yra paveldima prioninė liga. Ši liga pasireiškia žmonėms, turintiems D178N mutaciją ir 129 metionino polimorfizmą PrP gene. Fatalinės nemigos požymiai: miego sutrikimai, autonominė hiperaktyvacija, ataksija ir demencija (Montagna et al., 2003). Neuropatologiški požymiai pasireiškia neuronų žūtimi, astroglioze gumbure, pailgosiose smegenyse ir smegenėlėse. PrP<sup>Sc</sup> randami pacientų smegenyse, bet mažais kiekiais ir tik gumbure arba smilkinio skiltyje (Brown ir Mastrianni, 2010).

### 1.1.5. Jatrogeninė CJD

Jatrogeninė CJD yra reta liga, kuria galima užsikrėsti vartojant prionais užkrėstus augimo hormonus, kraujo perpylimo metu ar per užterštus chirurginius instrumentus. Šia liga gali užsikrėsti įvairios žmonių populiacijos, nepriklausomai, kokį turi polimorfizmą 129 kodone (PrP gene), bet parodyta, kad pacientai su 129MM genotipu jautresni ligai (Kretzschmar ir Tatzelt, 2013). Inkubacijos periodas varijuoja nuo 5 iki 15 metų, priklausomai nuo to, kokių būdu buvo užsikrėsta. Dėl didelio PrP<sup>Sc</sup> atsparumo šilumai, proteazėms ir įvairiems cheminiams reagentams, chirurginiai įrankiai po operacijų turi būti sterilizuoti pagal pasaulio sveikatos organizacijos nurodytas rekomendacijas (Fry, 2010).



### 1.1.6. vCJD

XX a. pabaigoje Didžiojoje Britanijoje kilo galvijų kempinligės (BSE) epidemija, kurios metu galvijų prionais užsikrėtę žmonės susirgo naujo varianto kempinlige (vCJD), nors buvo manoma, kad BSE prionai nepavojingi žmonėms. Sergantys vCJD pasižymi psichikos sutrikimais, depresijos, parestezijos, ataksijos ir choleros simptomais. Žmonėms užsikrėtusiems BSE prionais, tik po 5-15 metų pasireiškia ligos požymiai, todėl sunku šią ligą prognozuoti ir aptikti anksčiau (Abid ir Soto, 2006). 2004 metais senyvo amžiaus žmogui buvo nustatyta BSE infekcija, tačiau vCJD liga nepasireiškė, nes pacientas PrP gene turėjo homozigotinį 129VV kodoną (Ironsides, 2010). Tolimesnių tyrimų metu nustatyta, kad vCJD požymiai pasireiškia turintiems homozigotinį 129MM kodoną PrP gene (Kretzschmar ir Tatzelt, 2013). Be to, yra labai svarbu, kokia yra infektyvaus priono konformacija (kamienas), nes tam tikrais atvejais ligos požymiai gali nepasireikšti žmogui (Weissmann, 2004).

## 1.2. Prionų kamienai

Daugiausia mįslių kelia tai, kad vienodos sekos PrP<sup>Sc</sup> tame pačiame organizme gali sukelti skirtingus TSE simptomus. Buvo padaryta išvada, kad egzistuoja individualūs prionų kamienai – PrP<sup>Sc</sup> agregatai, kurie pasižymi skirtinga konformacija. Jau seniai žinoma, kad baltymas gali turėti kelias skirtingas konformacijas, kaip pvz. hemoglobinas organizme egzistuoja kelių konformacijų, bet tarp jų yra mažas energetinis barjeras. Tarp PrP<sup>Sc</sup> kamienų egzistuoja didelis energetinis barjeras, todėl agregacijos metu turi susidaryti stiprūs, nekovalentiniai ryšiai, kad išlaikytų naują baltymo konformaciją (Wiltzius et al., 2009). Skirtingi kamienai susidaro dėl įvairių mutacijų, skirtingų aplinkos sąlygų. Nevienodų prionų kamienų infraraudonųjų spindulių spektrai bei atsparumas denatūrantams skiriasi. Taip pat juos paveikus proteinaze K, gaunami skirtingo dydžio fragmentai (Cobb ir Surewicz, 2009). Nauji prionų kamienai gali atsirasti, kai užsikrečiama kitos rūšies prionais. 2002 m. parodyta, kad žiurkėno prionais užkrėsta pelė, pasižymėjo ilgu ligos inkubacijos laiku, o po mirties ištyrus smegenis pastebėta, kad rastų prionų struktūra skiriasi nuo naudotų užkrėtimui bei nuo randamų laukinėse pelėse (Peretz et al., 2002). Skirtingi prionų kamienai gali skirtingai veikti tą pačią rūšį, vienam kamienui gali egzistuoti tarprūšinis barjeras, o kitam ne (Apostol et al., 2011).

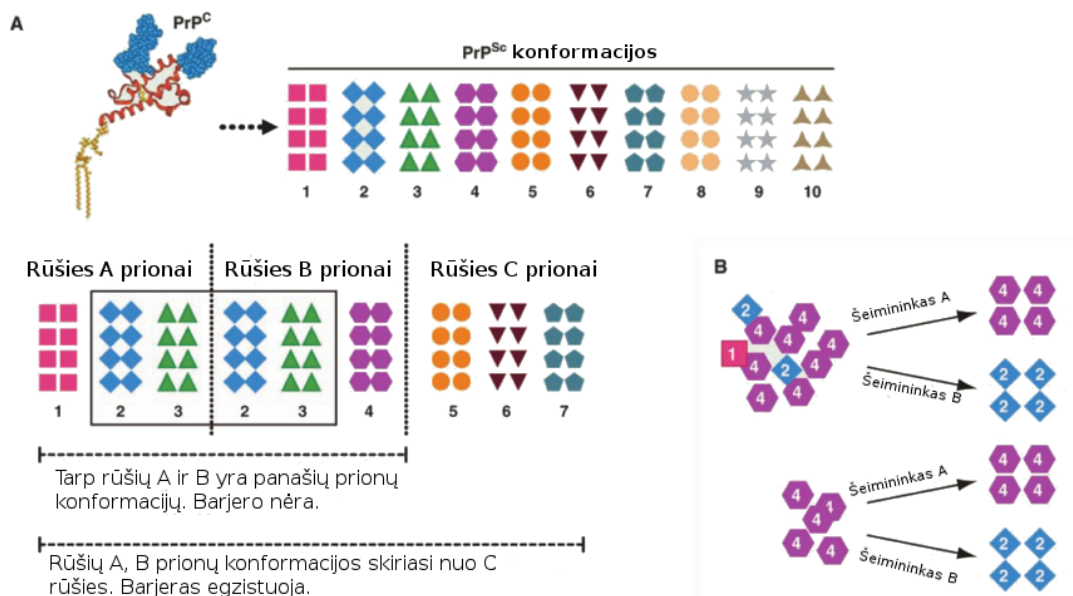
## 1.3. Tarprūšinis barjeras

Prionų infektyvumas tarp rūšių yra ribotas dėl egzistuojančio barjero. Barjerą lemia minimalūs aminorūgščių sekos skirtumai tarp žinduolių ar mielių prioninių baltymų (2 lentelė). Barjeras pasireiškia tuo, kad, jei žinduolių rūšies A prionais būtų užkrėsta rūšis B, dažniausiai nepasireikštų jokie ligos simptomai arba jie būtų labai silpni (1

pav.) (Moore et al., 2005). Tarprūšinio barjero tyrimai prasidėjo nuo galvijų kempinligės (BSE) prionų infektyvumo kitoms rūšims tyrimų, nes buvo bijoma, kad atsiradus naujiems prionų kamienams, galvijai galėtų užkrėsti miško gyvūnus prionais. Žmonėms BSE prionai sukelia vCJD ligą (Moore et al., 2005). Tyrimai su Creutzfeldto-Jakob (CJD) ligos prionais, parodė, kad klasikinės CJD ligos prionai neveikia laukinės pelės, tačiau veikia transgeninę pelę, kuri turi žmogaus prioninio baltymo geną. Tačiau vCJD ligos prionai, kurių natyvaus baltymo struktūra nesiskiria nuo CJD ligos prionų, geba užkrėsti laukinę pelę, bet neturi įtakos transgeninei pelei (Collinge ir Clarke, 2007). Taip pat daug tyrinėtas tarprūšinis barjeras tarp žiurkėno ir pelės prionų, tačiau labai daug rezultatų yra kontraversiški ir prieštaraujantys tarpusavyje. 1995 m. Buvo parodyta, kad pelių neuroblastomų ląstelės ekspresuojančios žiurkėno PrP, negali būti užkrėstos pelės PrP<sup>Sc</sup> (Race et al., 1995), tačiau tais pačiais metais buvo parodyta, kad žiurkėno PrP gali būti užkrėsti tiek su pelės ir žiurkėno PrP<sup>Sc</sup> (Kocisko et al., 1995). Tolimesni tyrimai atlikti su trumpais žinduolių prionais (23-144 ar.) parodė, kad tarprūšinį barjerą gali lemti dvi aminorūgštys. Žmogaus PrP23-144 fibrilės neveikia žiurkėno PrP23-144 baltymo, lygiai taip pat žiurkėno PrP23-144 fibrilės neveikia žmogaus PrP23-144 baltymo. Už šį barjerą atsakingos dvi aminorūgštys. Žmogaus PrP turi du izoleucinus 138 ir 139 kodonuose, o žiurkėno PrP vietoje jų yra du metioninai. Keičiant šias aminorūgštis žmogaus ar žiurkėno PrP23-144 baltymai gali prarasti turimą barjerą ir jų fibrilės gali veikti vienas kitą (Vanik et al., 2004).

**2 lentelė.** Lentelėje aprašytos žinomos įvairių gyvūnų PrP aminorūgštys, kurios lemia atsparumą kitų organizmų TSE (Priola, 2013).

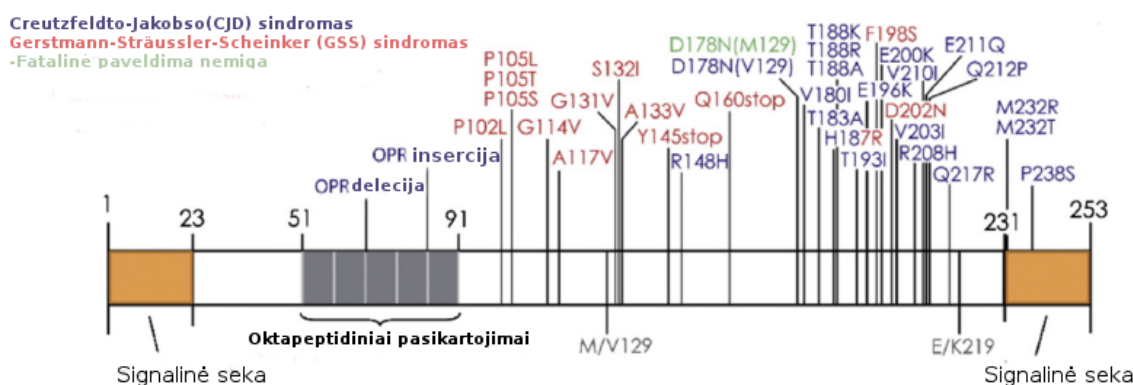
Šeimininko PrP <sup>c</sup>	Kodonas	Vieta	TSE atsparumas
Triušis	99	N-galas	Pelė
Pelė	101	N-galas	Žmogus(vCJD), avis, žiurkėnas
Triušis	108	N-galas	Pelė
Žmogus	129	$\beta 1$	Galvijai (BSE)
Avis	142	$\beta 1 - \alpha 1$ kilpa	Galvijai (BSE)
Pelė	138	$\beta 1 - \alpha 1$ kilpa	Žiurkėnas
Žiurkėnas	155	$\alpha 1 - \beta 2$ kilpa	Pelė
Pelėnas	154	$\alpha 1 - \beta 2$	Galvijai (BSE)
Pelėnas	169	$\beta 2 - \alpha 2$	Galvijai (BSE)
Avis	171	$\beta 2 - \alpha 2$	Galvijai (BSE)
Triušis	173	$\alpha 2$	Pelė
Šėškas	179	$\alpha 2$	Audinė(TME)
Triušis	214	$\alpha 2$	Pelė
Šėškas	224	C-galas	Audinė(TME)



**1 pav.** Prionų kamienai ir tarprūšiniai barjerai. (A) Egzistuoja daug įvairių prionų konformacijų-kamienų, todėl prionų agregatai gali būti sudaryti iš kelių skirtingų kamienų. Kad tarp prionų nebūtų tarprūšinio barjero, dalis prionų konformacijų turi sutapti tarpusavyje. (B) Prionų kamienų mišiniu vekiant šeiminkus A ar B, juose susidarytų tik tokie kamienai, kurie pas juos dominuoja, nepriklausomai koks pradinis kiekis buvo kamienų. (Collinge ir Clarke, 2007)

### 1.4. Mutacijos ir polimorfizmai

Mutacijos ir polimorfizmai PrP gene, gali lemti įvairias ligas ar baltymo struktūrinius pokyčius. N-galo mutacijos siejamos su GSS sindromu, C-galo – su CDJ ligomis, o fatalinę nemigą išskirtinai lemia D178N mutacija su M129 polimorfizmu (2 pav.).



**2 pav.** Žmogaus PrP geno mutacijos. Mėlynos mutacijos siejamos su CJD, raudonos – GGS, žalios – FI liga. (Rossetti et al., 2011)

### 1.4.1. N-galas

Nestruktūrizuoto N-galo mutacijos yra retesnės, bet gali turėti įtakos visai baltymo struktūrai. Žmogaus prioniniame baltyme randamos trys mutacijos: P102L, P105L ir A117V siejamos su Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) sindromu, bet jų įtaka visai PrP struktūrai kol kas dar nežinoma. M129V polimorfizmas gali lemti galutinę PrP<sup>Sc</sup> fibrilių struktūrą ir veikia kaip apsauginis barjeras nuo PrP<sup>Sc</sup>. Atlikus tyrimus su trumpu PrP23-144 baltymu, parodyta, kad M129V polimorfizmo fibrilės neperduoda savo fibrilių struktūros natyviems baltymams, bet skatina *in vitro* fibrilių susidarymą (Jones et al., 2006). PrP<sup>Sc</sup> išskirti iš pacientų smegenų su 129 VV, MV ir MM genotipais, pasižymėjo skirtingomis savybėmis. 129VV baltymo prionai buvo daug labiau karpomi su proteinaze K negu 129MV ir 129MM, o imunologiniai tyrimai rodė, kad antikūnai mAb 3F4 stipriai jungiasi su PrP<sup>Sc</sup> esant 129MM polimorfizmui, silpnai su 129MV, ir visiškai nesijungia su 129VV (Zou et al., 2010). Retai pasitaikanti yra 24 bazių porų delecija, kurios metu baltymas netenka vieno oktapeptidinio pasikartojimo, bet tai yra nepatologinis polimorfizmas (Brown ir Mastrianni, 2010).

### 1.4.2. C-galas

Klasikinę avių kempinligę gali sukelti skirtingi prioninio baltymo polimorfizmai. Vienais iš svarbiausių avies PrP kodonais yra laikomi 136,154 ir 171, kuriuose gali pasireikšti kelios mutacijos: A136V/T, R154H/L ir Q171R/H/K. Nustatyta, kad 171 aminorūgšties mutacija gali lemti atsparumą kempinligei. Avys, turinčios ties 171 kodonu QQ, HQ ar HH aminorūgštis, gali laisvai užsikrėsti kempinlige, o turinčios QR, HQ ar RR aminorūgštis yra atsparesnės kempinligei. Tačiau egzistuoja ir kitos mutacijos, suteikiančios atsparumą kempinligei. Įvedus Q167R mutaciją į pelės prioninį baltymą pastebėta, kad ši mutacija destabilizuoja antrinę ir ketvirtinę baltymo struktūrą, dėl ko turbūt baltymas tampa atsparus PrP<sup>Sc</sup> infekcijai (Robinson ir Pinheiro, 2009). Glicinas, leucinas ar glutaminas įvesti į 169 padėtį vietoj tirozino pelės prioniniame baltyme, stabdė agregaciją iki 75 %, o įvestos aromatinės aminorūgštys kaip fenilalaninas ar triptofanas neturėjo įtakos (Kurt et al., 2014). Mutacijos S170N/S174N triušio prioniniame baltyme įtakojo koks kiekis  $\beta$ -juostų susilankstys natyviame baltyme esant pH 4.5-5. Atvirkštinės mutacijos N170S/S174N žiurkėno prioniniame baltyme turėjo lygiai tokią pačią įtaką (Sweeting et al., 2013). Be to, mutacijos N170S ir N174T pelės PrP baltymo  $\beta 2$ - $\alpha 2$  kilpą padaro nelanksčia, kas gali turėti įtakos agregacijai. Laukinės pelės turi barjerą tarp žiurkėno ir elnio prionų, bet transgeninės pelės, ekspresuojančios PrP su N170S ir N174T mutacijomis, gali užsikrėsti šių gyvūnų prionais (Bett et al., 2012). Pelių prioniniai baltymai su Q218K mutacija kartu polimerizuoja su wtPrP, tačiau ilgina lag fazę ir lėtina polimerizaciją (Lee et al., 2007). Prioniniai baltymai su poliformizmu E219K (pasitaikantys japonų populiacijoje) nekeičia savo konformacijos į PrP<sup>Sc</sup> bei gali net slopinti laukinio

PrP virtimą į infektyvią formą (Kretschmar ir Tatzelt, 2013).

## 1.5. Prioniniai baltymai

Žmogaus PrP genas (PRNP) randamas 20 chromosomoje. Genas sudarytas iš dviejų egzonų, bet tik antrame egzone yra koduojamas pilnas skaitymo rėmelis (Lloyd et al., 2013). PrP<sup>C</sup> funkcija ląstelėje nėra aiški. Yra teorijų, kad PrP<sup>C</sup> dalyvauja ląstelės išgyvenimo, mirties, oksidacinio streso, imunoreguliacijos, diferenciacijos, metalų jonų transporto, adhezijos ir transmembraninio signalo perdavimo procesuose. Taip pat aprašyta, kad prionų yra randama limfiniuose audiniuose (Mehrpour ir Codogno, 2010). Be to, yra teorijų, kad PrP<sup>C</sup> dalyvauja žmogaus vėžinių ląstelių metastazėje ir proliferacijoje (Mehrpour ir Codogno, 2010). PrP<sup>C</sup> yra neinfektyvus baltymas, bet pasikeitęs į PrP<sup>Sc</sup> konformaciją, jis tampa infektyvus. PrP<sup>Sc</sup> nuo PrP<sup>C</sup> labiausiai išsiskiria PK atsparumu. PK pilnai hidrolizuoja PrP<sup>C</sup>, o PrP<sup>Sc</sup> sukarpo tik N-galą ir palieka PK-atsparų branduolį, kuris dar vadinamas PrP27-30 (Legname et al., 2012). Žinduolių prionai geriausiai žinomi dėl jų sukeliamų ligų, tačiau yra atrasti ir kitų klasių prionai (3 lentelė), pavyzdžiui, mielių prionai Ure2p ir Sup35p, kurie turi specifines funkcijas. Sup35p agregacija skatina stop kodonų nuskaitymą ir lemia [Psi+] fenotipą, o Ure2p agregacija sustabdo baltymo jungimąsi prie transkripcijos faktorių, dėl to yra aktyvuojami genai, atsakingi už geresnį azoto pasisavinimą iš aplinkos (Chiti ir Dobson, 2006).

**3 lentelė.** Žinomi ne žinduolių prioniniai baltymai, sudarantys amiloidines fibriles (Chiti ir Dobson, 2006).

Baltymas	Organizmas	Funkcija
Ure2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (mielės)	Gerina azoto pasisavinimą iš prastų šaltinių
Sup35p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (mielės)	Lengvina stop kodonų nuskaitymą nuo mRNR
Rnq1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (mielės)	Nelabai gerai suprastas [RNQ+] fenotipas
HET-s	<i>Podospora anserina</i> (grybai)	Atsakingas už programuotos ląstelės žūties pradžia
CPEB izoforma	<i>Aplisia californica</i> (jūrinė sraigė)	Reguliuoja ilgalaikius sinapsinius pokyčius, susijusius su atminties kaupimu

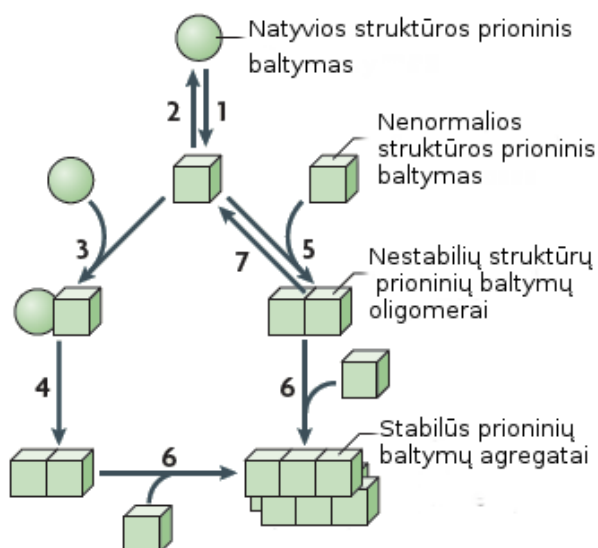
## 1.6. De novo ir PMCA prionai

Prionų sukūrimas *in vitro* turėtų būti lengvas, remiantis teorija, kad PrP<sup>C</sup> vertimui į PrP<sup>Sc</sup> užtenka tik baltymo (Prusiner, 1982), tačiau iki šiol nėra patikimai gauto *in vitro* rekombinantinio priono, nenaudojant smegenų homogenizato. 2004 m. Legname ir kole-

gos aprašė kaip rekombinantinio prioninio baltymo suformuotos amiloidinės fibrilės gali užkrėsti peles (Legname et al., 2004), tačiau jų pelės numirdavo tik po 450-600 dienų bei ekspresuodavo PrP 16 kartų daugiau negu laukinės pelės (Benetti et al., 2010). Norint apibūdinti prioną, reikia patikrinti 4 kriterijus: infektyvumą gyvūnams, neuropatologines, biochemines savybes ir stabilumą denatūrantams (Benetti et al., 2010). Daugelis *de novo* sukurtų PrP<sup>Sc</sup> pasižymi kitokiomis savybėmis ir jų kamienai skiriasi nuo *in vivo* randamų (Barria et al., 2009). Dažniausias metodas naudojamas sukurti *in vitro* PrP<sup>Sc</sup> yra netinkamai sulankstomų baltymų ciklinė amplifikacija (angl. protein-misfolding cyclic amplification (PMCA)). Atliekant PMCA yra imami PrP<sup>Sc</sup> homogenizatai iš kemplinge sergančio organizmo smegenų, sumaišomi su PrP<sup>C</sup> homogenizatu, išskirto iš sveikų smegenų ir mišinys inkubuojamas. Po kurio laiko mėginys ultragarsinamas ir pridodama naujo PrP<sup>C</sup> homogenizato. Toks procesas kartojamas keletą kartų, kol susidaro pakankamai agregatų (Saborio et al., 2001).

## 1.7. Prioninių baltymų agregacijos mechanizmai

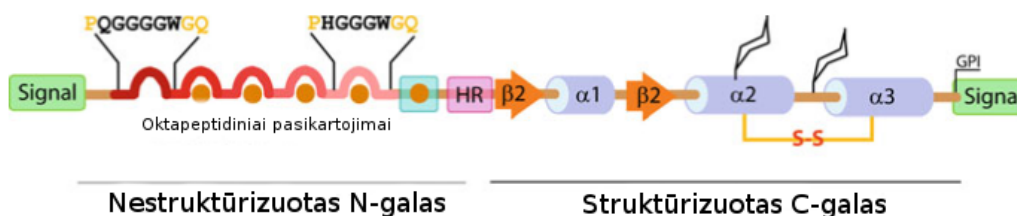
Yra pasiūlyta keli prionų agregacijos mechanizmai: šabloninis, kooperatyvinis ir „sėklos“ modelis (3 pav.). Pirma, esant palankiom sąlygom PrP<sup>C</sup> gali spontaniškai pasikeisti į PrP<sup>Sc</sup> (3 pav.(1)). Šis perėjimas yra nepalankus, nes nenatūralios struktūros PrP<sup>Sc</sup> yra nestabilus. PrP<sup>C</sup> virtimas į PrP<sup>Sc</sup> yra svarbiausia prionų agregacijos dalis, kuri yra prastai suprata ir paaiškinta. Heterodimerinis arba kitaip šablono modelis teigia, kad naujai susidarę PrP<sup>Sc</sup> toliau veikia kaip šablonai, kurie per tiesioginę sąveiką verčia PrP<sup>C</sup> į PrP<sup>Sc</sup> (3 pav.(3)) (Surewicz ir Apostol, 2011). Daugelis eksperimentų rezultatų rodo, kad prionai agreguoja pagal „sėklos“ mechanizmą (Nagel-steger et al., 2010). Pagal „sėklos“ mechanizmą susidarę PrP<sup>Sc</sup> jungiasi tarpusavyje į nestabilius oligomerus. Abiejų mechanizmų galutinė stadija yra tai, kad susidaro stabilūs prionų agregatai - branduoliai (3 pav.(6)). Šie branduoliai panašūs į amiloidines fibriles – turi du galus, prie kurių gali jungtis PrP<sup>Sc</sup> ir taip ilginti agregatų struktūrą. Be to fibrilės gali skilti ir taip sukurti naujus polimerizacijos centrus. (Brundin et al., 2010). Papildomi veiksniai kaip glikozilinimas gali turėti įtakos galutinei PrP struktūrai, stabilumui ir sąveikai su kitomis molekulėmis bei gali turėti įtakos priono infektyvumui. Pelės, kurios ekspresavo PrP baltymus be GPI arba su GPI inkaru, pasižymėjo skirtingais klinikiniais rezultatais (Caughey ir Baron, 2006).



3 pav. Prioninių baltymų teoriniai agregacijos mechanizmai (Brundin et al., 2010).

## 1.8. Prioninių baltymų struktūra

Šiuolaikiniais metodais dar neįmanoma tiksliai nustatyti PrP<sup>Sc</sup>, išskirto iš smegenų, struktūros, bet žinomi bendri motyvai. PrP<sup>C</sup> struktūra (4 pav.) santykinai turi 45%  $\alpha$ -spiralių bei dvi mažas  $\beta$ -juostas, tačiau PrP<sup>Sc</sup> jau turi 30%  $\alpha$ -spiralių ir 45%  $\beta$ -juostų (Riek et al., 1996). Dėl didelio  $\beta$ -juostų kiekio ir elektroninės mikroskopijos nuotraukų, PrP<sup>Sc</sup> agregatai dažnai priskiriami prie amiloidinių fibrilių.



4 pav. Prioninio baltymo struktūra (Surewicz ir Apostol, 2011).

### 1.8.1. PrP<sup>C</sup> struktūra

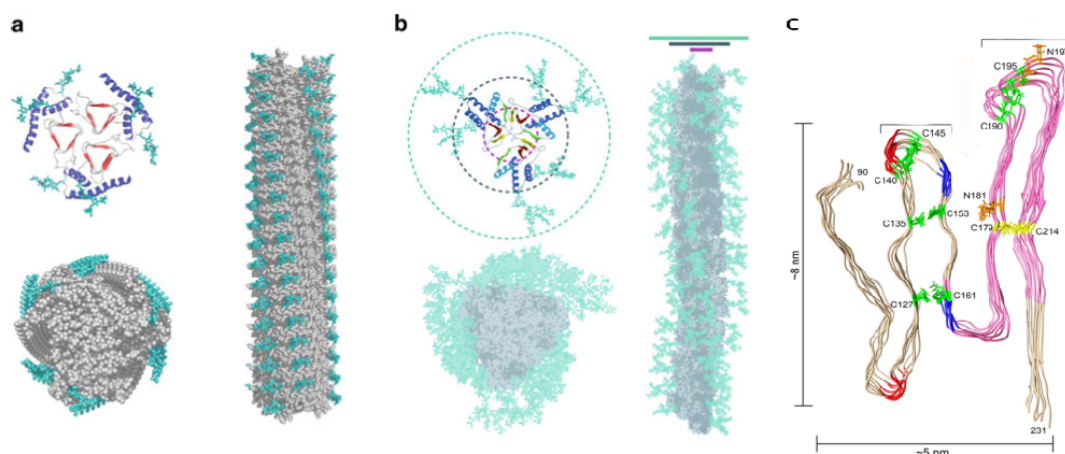
Žmogaus ir kitų žinduolių PrP seka skiriasi iki 20 aminorūgščių, bet bendri struktūriniai motyvai panašūs. Žmoguje PrP sudaro 253 aminorūgštys, iš kurių pirmos 22 ir galinės 23 koduoja atitinkamai N-galo ir C-galo signalines sekas. Likusios 209 aminorūgštys sudaro funkcionalų baltymą, kuris yra prikabinamas prie ląstelės su glikozilfosfatidilinozitoliniu inkaru ties 231 aminorūgštimi. Vykstant potransliacinėms modifikacijoms N-galo signalinė seka yra nukerpama. Oligosacharidų grandinės yra prijungiamos prie peptidinės grandinės dviejose vietose: ties 180 ir 196 aminorūgštimis (DeMarco ir Daggett, 2005). N-gale yra pasikartojantys oktapeptidai PHGGGWHQ, kurie geba surišti vario jonus ir

prie jų gali jungtis neigiamai įkrauti angliavandeniai ar nukleorūgštys. C-galą sudaro trys  $\alpha$ -grandinės, iš kurių  $\alpha 2$  ir  $\alpha 3$  sujungtos disulfidiniu tilteliu, ir dvi  $\beta$ -juostos (Surewicz ir Apostol, 2011). PrP turi ilgą hidrofobinį segmentą ( $\sim 112$ -135 ar.), kuris gali sąveikauti su lipidais (Ma, 2013). Taip pat PrP struktūroje išsiskiria dvi teigiamai įkrautos sritys: pirma N-galo pradžioje, antra ties 101-110 aminorūgštimi. Antroje teigiamoje srityje yra du prolinai ir keturi lizinai. Dėl didelio teigiamo krūvio atsiranda elektrostatinė stūmos jėga, kuri turėtų trukdyti šioje srityje agreguoti baltymui, todėl gali būti, kad reikia papildomų kofaktorių-anijonų, kurie stabilizuotų struktūrą (Grovesman et al., 2014). Didžiausi skirtumai tarp žinduolių PrP aminorūgščių sekų yra ties 168-172 aminorūgštėmis esančia kilpa (Damberger et al., 2011). Būtent čia esanti žmogaus PrP seka SNQNNF geba suformuoti sterinius užtrauktukus, kurie yra struktūriniai motyvai amiloidinėse fibrilėse. PrP<sup>Sc</sup> užtrauktukuose  $\beta$ -klostės išsidėto paeiliui (angl. face to back) (Sawaya et al., 2007). Manoma, kad šitie steriniai užtrauktukai gali lemti tam tikrų prionų kamienų tarpūšinį barjerą (Kurt et al., 2014).

### 1.8.2. PrP<sup>Sc</sup> struktūra

PrP<sup>Sc</sup> struktūra yra labai ginčijama ir diskutuojama tema. Dėl netirpios PrP<sup>Sc</sup> formos, jo negalima iškristalizuoti ir tiksliai nustatyti struktūros, tačiau egzistuoja įvairūs PrP<sup>Sc</sup> modeliai:  $\beta$ -sraigtinis, spiralinis ir paraleliai išsidėsčiusių  $\beta$ -klostių (5 pav.).  $\beta$ -sraigtinis modelis remiasi elektroninės mikrofotografijos duomenimis, pagal kuriuos  $\beta$ -plokštės susidaro N-gale ties 89-175 aminorūgštėmis, o C-galo  $\alpha$ -spiralės išlaiko savo struktūrą kaip ir natyviame baltyme. Pagal šį modelį  $\beta$ -klostės jungiasi į trimerus ir išsidėsto viena virš kitos, o  $\alpha$ -spiralės susisuka aplink šį branduolį. „Spiralinis“ modelis remiasi molekulinės dinamikos skaičiavimas ir pagal jį PrP<sup>Sc</sup> išlaiko natyvaus PrP struktūrą, tačiau esančios dvi  $\beta$ -juostos susijungia ir sudaro vieną ilgą  $\beta$ -klostę, taip pat susidaro dvi naujos  $\beta$ -juostos, kurios gali sąveikauti su kitais struktūriniais motyvais (Surewicz ir Apostol, 2011). Abu modeliai eksperimentiškai neįrodyti ir net paneigti kai kurių mokslininkų. Pirma, likusios  $\alpha$ -spiralės turėtų būti sukarpytos PK, tačiau PK tose vietose nekerpa. Antra, atlikus vandenilio-deuterio apsikeitimo tyrimus su PrP<sup>Sc</sup> išskirto iš smegenų, nustatyta, kad  $\alpha$ -spiralių nėra C-gale ties 160-220 aminorūgštėmis (Smirnovas et al., 2011), o tai prieštarauja pirmiems dviem modeliams. Analizuojant rekombinantinio PrP agregatų struktūras ir ieškant panašumų su PrP<sup>Sc</sup>, buvo padaryta išvados, kad rPrP amiloidinis branduolys susidaro ties 160-220 aminorūgštėmis. Šiame branduolyje  $\beta$ -klostės paraleliai išsidėsto viena kitos atžvilgiu (Cobb et al., 2007). Pagal rPrP amiloidines fibriles, prionams sudarytas paraleliai išsidėsčiusių  $\beta$ -plokščių modelis, kuris yra naujausias ir labiausiai patikimas. Šis modelis remiasi kompiuterinio modeliavimo duomenimis ir pagal jį  $\beta$ -plokščių branduolys susidaro ties 124-223 aminorūgštėmis ir nebelieka jokių  $\alpha$ -spiralių. Toks ilgas branduolys paaiškintų didelį PrP<sup>Sc</sup> kamienų įvairovę (Grovesman et al., 2014).





**5 pav.** PrP<sup>Sc</sup> struktūrų modeliai. (a)  $\beta$ -sraigtinis modelis. (b) „spiralinis” modelis (Surewicz ir Apostol, 2011). (c) paraleliai išsidėsčiusių  $\beta$ -klosčių modelis (Groverman et al., 2014).

### 1.8.3. Amiloidinės fibrilės

Amiloidinės fibrilės tai baltymų agregatai pasižymintys labai tvarkinga vandenilinių jungčių struktūra ir stabilumu. Susiformavusios fibrilės gali gyvuoti ilgą laiką bei kauptis audiniuose (Dobson, 2003). rPrP amiloidinės fibrilės skiriasi nuo randamų smegenyse. rPrP turi mažesnę PK atsparų branduolį bei  $\beta$ -klostės susidaro trumpesnės (ties 160-220 a.r.) (Surewicz ir Apostol, 2011). Dėl įvairių priežasčių rPrP fibrilės gali sudaryti skirtingus kamienus. Buvo parodyta *in vitro*, kad dėl skirtingo mėgintuvėlio kratymo metodo, galima gauti skirtingus fibrilinius kamienus. Sukant žiurkėno PrP mėginį susidaro lenktos, o kratant tiesios fibrilės. Šių fibrilių konformacijos skiriasi vertinant IR spektrus (Makarava ir Baskakov, 2008).

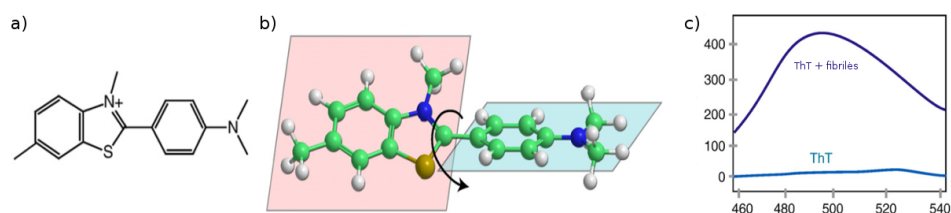
## 1.9. Tioflavinas T

Pirmą kartą amiloidinių fibrilių identifikavimo metodas buvo aprašytas 1853 m. Fibrilės buvo atpažintos nudažant audinių pavyzdžius su jodo ir sieros rūgštimi (Aterman, 1976). XX a. pradžioje ir viduryje dažniausiai amiloidines fibriles atpažinti buvo naudojamas audinių pramonės dažas Congo red. Tačiau dirbant su šiuo dažu reikėjo įdėti daug pastangų gauti gerus mėginus, o stebėti pavyzdžius galima tik su poliarizuotos šviesos mikroskopu, taip pat jo jungimasis su kitomis molekulėmis buvo dažnas ir tai duodavo klaidingus rezultatus (Elghetany ir Saleem, 1988). 1959 m. Mokslininkai Vassar ir Culling pristatė tioflaviną T (ThT) dažą, kuris stipriai jungiasi su amiloidinėmis fibrilėmis ir intensyviai fluorescuoja.

ThT molekulės sužadavimo maksimumas nuo 385 iki 450 nm, o jos emisijos maksimumas nuo 445 nm iki 482 nm. Pačią molekulę sudaro hidrofobinė dietilamino grupė prijungta prie fenilo žiedo ir labiau polinė benziltiazolo grupė. Tirpale benzilamino ir

benziltiazolo žiedai gali laisvai sukis vienas kito atžvilgiu (6 pav.). Rotacijos metu sužadintos būsenos yra greitai nugesinamos ir tai duoda silpną fluorescenciją. Kai ThT yra sustabdytas sužadintoje būsenoje - fluorescencija daug kartų išauga. Taip pat manoma, kad jungimosi vietos prie amiloidinių fibrilių sustabdo ThT konformaciją ir taip dar labiau padidina fluorescenciją (Biancalana ir Koide, 2010).

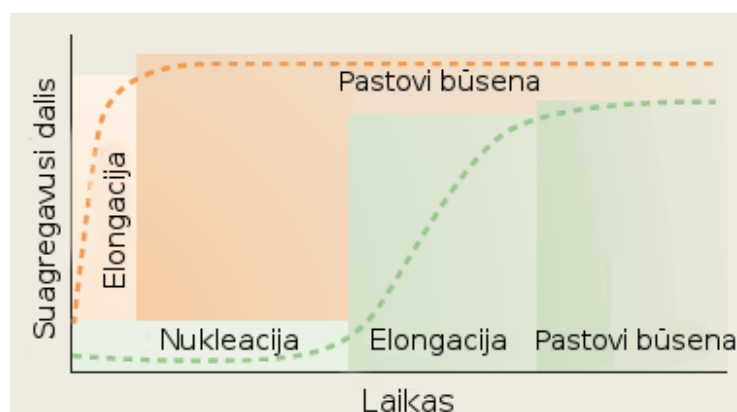
Esant neutraliam pH, ThT geltonos-šviesiai žalios spalvos. ThT blunka bei praranda savo fluorescenciją aukštoje temperatūroje (35-50 °C) ir šarminiame pH (Foderà et al., 2008).



**6 pav.** Tioflavinas T. (a) ThT molekulės struktūra, (b) ThT žiedų rotacija, (c) ThT fluorescencija (Biancalana ir Koide, 2010).

### 1.9.1. Amiloidinių fibrilių agregacijos kinetika

Priimant teoriją, kad prioniniai baltymai agreguoja į amiloidines fibriles, jų elongaciją galima matuoti specifiniu fluorescenciniu dažų ThT ir atvaizduoti kinetinėmis kreivėmis (7 pav.). Nesant „sėklos“, natyvus baltymas, turi pereiti „lag“, arba kitaip vadinamą nukleacijos fazę, kurios metu nefiksuojami agregatai, bet susidaro nauji branduoliai. Pasiekus kritinę branduolių koncentraciją, prasideda staigi elongacija – fibrilių augimas iki tol, kol nebelieka natyvaus baltymo. Esant „sėklos“, nebelieka „lag“ fazės ir baltymas eksponentiškai agreguoja, o kreivė tampa sigmoidinė (Chuang et al., 2013).



**7 pav.** Amiloidinių baltymų agregacijos kreivė Brundin et al. (2010).

## 2. Medžiagos ir metodai

### 2.1. Medžiagos

- *AB Vilniaus degtinė*: 96 % etanolis;
- *Acros organic*:  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,
- *Roth*:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , KCl, ampicilino natrio druska,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ;
- *Fisher scientific*: TRIS, glicinas, NDS, acto rūgštis, TEMED, EZ-run baltymų dažymo tirpalas, EZ-run baltymų molekulinės masės markeris,  $\text{K}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , guanidino hydrochloridas (Gnd-HCl), NaOH, HCl,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , imidazolas, redukuotas glutationas, IPTG, agarozė, EDTA, amonio persulfatas, akrilamido/bis-akrilamido 40 % tirpalas;
- *General Chemical Division, Baker and Adamson*:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;
- *Sigma-Aldrich*: PIPES;

#### 2.1.1. Rinkiniai

- *Fisher scientific* Polimerazės rinkinys „Pfu DNA Polymerase”: Pfu DNR polimerazė 2,5 U/ $\mu\text{l}$ , 10 $\times$  Pfu buferis su 20mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 $\times$  Pfu buferis, 25mM  $\text{MgSO}_4$ ;
- *Fisher scientific* Polimerazės rinkinys „Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNR Polymerase”: Phusion DNR polimerazė 2 U/ $\mu\text{l}$ , 5 $\times$  Phusion HF buferis, 5 $\times$  GC Phusion buferis, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , DMSO;
- *Fisher scientific* Plazmidės išskyrimo rinkinys „Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0502, #K0503”;

#### 2.1.2. Konstruktai

pRSETB plazmidė su N-galo heksahistidininiu inkaru, atsparumo ampicilinui genu ir įklonuotu ShaPrP23-232 prioniniu genu. Plazmidė sukonstruota *Fiziologijos ir Biofizikos skyriuje, Case Western Reserve universitete, Klyvlende, JAV (prof. Witold K.Surewicz grupėje)*.

#### 2.1.3. Laboratorinė įranga

- Autoklavas „AHS-75N” (Raypa);
- Centrifugos „Eppendorf 5424” (F-45-18-11-Kit rotorius); HiCen SR (AF 6.500, AF 8.50.2 rotoriai)(HeroLab);

- Chromatografijos sistema „ÄKT Apurifier” (GE Healthcare);
- Chromatografinė kolonėlė „XK 26/20” (GE Healthcare)(aukštis-20 cm, skersmuo-26 mm);
- Dializės žarnos: 28,7 mm ir 49,5 mm diametro „Zella Trans Roth” (pralaidumas 6-8 kDA);
- Elektroforezės aparatai „Biometra Minigel-Twin” su „Biometra PS 300T” srovės šaltiniu;
- Elektroninis mikroskopas „Morgagni 268” (FEI)
- Filtravimo indeliai „Millipore Stericup” (filtracinio popierėlio porų dydis 0,22 U/ $\mu$ l)
- Koncentratoriai „Amicon® Ultra-15” (pralaidumas - 10 kDa);
- Laboratorinės svarstyklės: „KERN ABJ”. „KERN PCB 400-2”, „Kern PLJ 6000-1GM”;
- Magnetinės maišyklės: „VARIOMAG Maxi Direct”, „BIOSAN MSH-300”; „Velp Scientifica ARE”; „C-MAG HS7” (IKA); „LABORTECHNIK RCT basic” (IKA);
- Maišyklė „CLASSIC vortex mixer” (VELP Scientifica);
- pH-metras „Orion DUAL STAR meter” (Thermo Scientific);
- Purtyklė „KS 4000i” (IKA);
- Realaus laiko PGR analizatorius „Rotor-Gene Q real-time analyzer” (GE Healthcare);
- Spektrofotometrai: „UV-1800” (Schimadzu); „Varian Cary Eclipse”; „Biotek Synergy H1 Multi-Mode Reader”;
- Švirkštinis filtras (diametras - 30 mm, porų dydis 0,22 U/ $\mu$ l);
- Termo-purtyklės: „New Brunswick Scientific”; „Heidolph Inkubator 1000 unimax 1010”; „Biosan Enviromental Shaker-Incubator ES-20”;
- Termostatas „Eppendorf Thermostat plus”;
- Ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls 3100” (antgaliai: VS70/T, MS72);
- Vakuuminė filtravimo įranga „Sigma-Aldrich”;
- Vandens valymo sistema „Simplicity UV system”

#### 2.1.4. Mitybinės terpės

- Agarizuota LB terpė: 25 g LB-Medium terpės ir 15 g agarą ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Terpė autoklavuojama 30 min. 121°C.
- LB (Luria-Bertani) terpė: 25 g LB-Medium terpės ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Terpė autoklavuojama 30 min. 121°C.
- S.O.C. mitybinė terpė: 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 3,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, ir 20 mM gliukozės. Triptonas, mielių ekstraktas, 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. Tirpalai

- **A1 buferinis tirpalas:** 100 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 10 mM Tris-HCl. Sumaišomi 50 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ir 5 ml TRIS, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 400 ml, tirpalo pH koreguojamas su HCl tirpalu ir skiedžiama iki 500 ml. Filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.
- **A2 buferinis tirpalas:** 50 mM imidazolo, 10 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 10 mM Tris-HCl, pH 8. 100 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 10 mM Tris-HCl. Sumaišomi 100 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ir 10 ml TRIS, 3,4 g imidazolo ištirpinama ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1000 ml, tirpalo pH koreguojamas HCl ir filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.
- **A3 buferinis tirpalas:** 700 mM imidazolo, 100 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 10 mM Tris-HCl, pH 5,8. Sumaišomi 100 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ir 10 ml TRIS, 47,66 g imidazolo ištirpinama ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1000 ml, tirpalo pH koreguojamas HCl ir filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.
- **B1 buferinis tirpalas:** 6 M guanidino chlorido, 10 mM glutationo, 100 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 10 mM Tris-HCl, pH 8. 267,48 g guanidino chlorido tirpinama 250 ml A1 buferiniame tirpale. Ištirpus druskai, tirpalas centrifuguojamas 4000 g 10 min. Supernatantas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą ir matuojama Gnd-HCl koncentracija refraktometru. Skiedžiama A1 buferiniu tirpalu iki 6 M Gnd-HCl. Prieš tirpalo naudojimą, išstripinamas glutationas ir koreguojamas pH iki 8 su NaOH.
- **D buferinis tirpalas:** 10 mM CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, pH 4. Santykiu 3:1 sumaišomi CH<sub>3</sub>COOH ir CH<sub>3</sub>COONa tirpalai ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 3500 ml. pH koreguojamas su NaOH ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 4000 ml.

- **0,5 M PIPES tirpalas:** 15,1 g PIPES ištirpinama 80 ml dejonizuoto vandens, pridedama pH iki 6,7 su 5 M KOH, pripilama dejonizuoto vandens iki 100 ml, filtruojama per 0,22  $\mu\text{m}$  porų dydžio, 47 mm diametro filtra;
- **Transformacijos buferis:** 10,88 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2,2 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 18,65 KCl, ištirpinama 900 ml dejonizuoto vandens, pridedama 20 ml 0,5 M PIPES, pripilama dejonizuoto vandens iki 1 l, filtruojama per 0,22  $\mu\text{m}$  porų dydžio, 47 mm diametro filtra;
- **50x TAE(Tris-acetato-EDTA) buferis:** 242,5 g TRIS, 18,5 g EDTA (tirpsta pH 8) ištirpinami 800 ml dejonizuoto vandens, įpilama 57 ml ledinės acto rūgšties ir skiedžiama iki 1 l. Leidžiant elektroforezę, buferis praskiedžiamas 50 kartų.
- **10x baltymų elektroforezės buferis:** 30,2 g TRIS, 144 g glicino, 10 g NDS tirpinami 850 ml dejonizuoto vandens. Skiedžiama iki 1 l. Leidžiant elektroforezę, buferis praskiedžiamas 10 kartų.

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Sekų palyginimas ir pradmenų konstravimas

HuPrP23-232 ir ShaPrP23-232 aminorūgščių sekos palygintos programomis „Multialign“ ir „Vector NTI“. Pradmenys buvo sukurti naudojantis PrimerX programa (4 lentelė), pasireikant mutagenezės protokolą „QuikChange Ste-Directed Mutagenesis Kit by Stratagene“ ir ekspresijos sistemą *Escherichia coli*. Gauti pradmenys ištirpinti gamintojų nurodytame tūryje iki 100  $\mu\text{M}$  koncentracijos ir 10 kartų praskiesti.

4 lentelė. Pradmenų konstravimo sąlygos

Sąlygos	Reikšmės
Lydomosi temperatūra	Nuo 65 iki 85°C
GC kiekis	Nuo 40 iki 60%
Ilgis	nuo 25 iki 45 b.p.
5' šoninio regiono ilgis	nuo 11 iki 21 b.p.
3' šoninio regiono ilgis	nuo 11 iki 21 b.p.
Baigiasi G arba C	Taip
Mutacija centre	Taip

### 2.2.2. Kryptinga mutagenėzė

Kryptinga mutagenėzė atlikta pagal PGR protokolą (5 ir 6 lentelės). PGR mišiniai veikiami DpnI restriktaze.

5 lentelė. PGR mišiniai

Pfu reakcijos mišinys	Tūriai	Phusion reakcijos mišinys	Tūriai
H <sub>2</sub> O	11,5 µl	H <sub>2</sub> O	9,4-10,3 µl
Pfu buferis 10x	2 µl	GC 5X arba HF 5X buferis	4 µl
dNTP (0,2 mM)	2 µl	dNTP (0,2 mM)	2 µl
Pradmenų poros (0,625/0,625 µM)	1,25/1,25 µl	Pradmenų poros (0,625/0,625 µM)	1,25/1,25 µl
DMSO	0 µl	DMSO	0-0,9 µl
Matricinė DNR (10 ng)	1 µl	Matricinė DNR (10 ng)	1 µl
Pfu polimerazė	1 µl	Pfusion polimerazė	0,2 µl
Bendras tūris	20 µl	Bendras tūris	20 µl

6 lentelė. PGR sąlygos. Viršutinė lentelė Pfu, apatinė Phusion polimerazei

Eiga	Temperatūra °C	Laikas	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	95	3 min	1
Denatūracija	95	30 s	30
Prilydymas	65	30 s	30
Ilginimas	72	6,5 min	30
Galutinis ilginimas	72	10 min	1
Pradinė denatūracija	98	30 s	1
Denatūracija	98	10 s	30
Prilydymas	65	30 s	30
Ilginimas	72	105 s	30
Galutinis ilginimas	72	10 min	1

### 2.2.3. Kompetentinių ląstelių ruošimas

1 µl atšildytų ląstelių praskiedžiama su LB terpe iki 1000 µl. 20 µl praskiestų ląstelių užsėjama ant agarizuotos LB terpės ir auginama 37°C termostate per naktį. Iš užaugusių kolonijų paimama viena kolonija ir užsėjama į 10 ml LB terpės, auginama purtyklėje (37°C, 220 aps/min). Ryte 2,5 ml naktinės kultūros persėjama į 250 ml LB terpės ir auginama iki 0,530 OT<sub>600</sub>. Pasiėkus 0,530 optinį tankį, ląstelės centrifuguojamos 2500 x g, 10 min +4°C. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 80 ml šaltame transformacijos buferiniame tirpale ir vėl centrifuguojama 2500 x g, 10 min +4°C. Supernatantas nupilamas, ląstelės resuspenduojamos 20 ml šaltame transformacijos buferiniame tirpale ir įpilama 1,5 ml DMSO. Suspensija pamaišoma ir inkubuojama 10 min ant ledo. Po 10 min ląstelės greitai išpilstomos į atšaldytus sterilius mėgintuvėlius ir užšaldomos –80°C.

### 2.2.4. Kompetentinių ląstelių transformacija

Į 100 µl atšildytų kompetentinių ląstelių įdedama 1 µl plazmidinės DNR ir inkubuojama 30 min ant ledo. Po inkubacijos vykdomas karščio šokas. Ląstelės laikomos 1,5 min

42°C termostate ir 2 min ledo vonelėje. Įpilama 400 µl S.O.C. terpės ir paliekama ląstelės 45 min kratytis purtyklėje (37°C, 220 aps/min). Centrifuguojama 2 min 6000 x g. 200 µl supernatanto nupilamas, o likusiame tūryje resuspenduojamos ląstelės ir išsėjamos Petri lėkštelėje ant agarizuotos LB terpės. Inkubuojama termostate 37°C 16h.

### 2.2.5. Kultūros auginimas ir tikslinio baltymo raiškos indukcija

Naktinė kultūra ruošiama į 100 ml autaklavuotos LB terpės įpilant 100 µl ampicilino (100 µg/l) bei įdedant atsitiktinę transformuotą *E. coli* bakterijų koloniją. Bakterijos auginamos per naktį purtyklėje (16h, 37°C, 220 aps/min). Ryte į 4 paruoštas kolbas su 400 ml autoklavuotos LB terpės įpilama po 20 ml naktinės kultūros. Ląstelės auginamos 37°C, 220 aps/min, stebint optinį tankį (matuojama spektrofotometru  $\lambda = 600$  nm). Kas 30 min tikrinamas optinis tankis ir imami mėginiai po 300 µl elektroforezei. Pasiėkus 0,6–0,8  $OT_{600}$  vykdoma tikslinio baltymo raiška: į kiekvieną kolbą įdedama 400 µl 1 M IPTG ir paliekama ląstelės augti. Po indukcijos ląstelių mėginiai imami mažesnio tūrio, taip išlaikant vienodą ląstelių skaičių. Ryte surenkama biomasa centrifuguojant 40 min 4700 x g.

### 2.2.6. Baltymų elektroforezė

Elektroforezės geliai ruošiami pagal žemiau pateiktą lentelę (7 lentelė). Pirmiausia ruošiamas 12 % gelis. Įpylus APS ir TEMED, mišinys pilamas tarp dviejų stiklinių elektroforezės plokštelių, ant viršaus užpilama dejonizuoto vandens. Po 40 min., kai gelis pilnai polimerizavosi, ruošiamas 4 % gelis. Nusiurbus vandenį nuo skiriamąjo gėlio, pilamas koncentruojamo gėlio mišinys ant viršaus ir įstatomos „šukos“. Geliui sustingus, po 30 min elektroforezės plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą. Aparato talpyklos užpildomos 1X elektroforezės buferiu. Elektroforezės metu palaikoma 30 mA srovė su 300 V įtampos riba. Dažui „išėjus“ iš gėlio, aparatas išjungiamas, o gelis išimamas iš stiklinių plokštelių ir skalaujamas 15 min. dejonizuotu vandeniu. Praplovus gelį, jis dažomas „Ez-run“ baltymų dažu 45 min. ir paliekamas dejonizuotame vandenyje išryškėti

**7 lentelė.** Elektroforezės skiriamą ir koncentruoto gėlio sudėtis

Apatinis skiriamasis 12% gelis		Viršutinis koncentruojamasis 4% gelis	
H <sub>2</sub> O	2,55 ml	H <sub>2</sub> O	1,27 ml
1,5 M Tris-HCl ph 8,8	1,53 ml	1,5 M Tris-HCl ph 8,8	500 µl
40% AA/AB	1,83 ml	40% AA/AB	201 µl
10% NDS	61 µl	10% NDS	20 µl
10% APS	30,5 µl	10% APS	10 µl
TEMED	3,65 µl	TEMED	2 µl



### 2.2.7. Baltymo renatūracija ir gryninimas

Biomasė homogenizuojama denatūruojančiomis sąlygomis maišant su B1 buferiniu tirpalu. Laikant ledo vonelėje, homogenatas ardomas ultragarsu (20 min., 70 % amplitudė, 60 s veikimo / 60 s poilsio režimu). Suardyta biomasė centrifuguojama (4 °C, 40 min. 30000 x g). Supernatantas maišomas su B1 buferiniu tirpalu nupusiausvyrintu Ni(II) sefarozės sorbetu. Sorbentas užkraunamas į koloną, kuri prijungiama prie chromatografijos sistemos. Kolona praplaunama 100 ml B1 buferiniu tirpalu. Baltymas renatūruojamas leidžiant 200 ml B1/A1 tirpalų gradientą. Kolona praplaunama 50 ml A1 buferiniu tirpalu ir toliau leidžiamas A2 buferinis tirpalas, su kuriuo išeina silpnai prisijungę baltymai. Kolona plaunama su A3 eliuentu su kuriuo išeina tikslinis baltymas.

Surinktos frakcijos 18 h dializuojamos D buferiniame tirpale, kas 6 h keičiant buferį. Baltymo absorbcija matuojama spektrofotometru ( $\lambda = 280$  nm), o koncentracija nustatoma pagal Bero ir Lamberto dėsnį. Baltymas koncentruojamas iki 3 mg/ml naudojant „Amicon® Ultra-15” koncentratorius ir išpilstomas po 0,5 mg į mėgintuvėlius, kurie užšaldomi -80 °C šaldiklyje.

### 2.2.8. *De novo* fibrilių susidarymas

Mėginiai su 0,5 mg/ml prioninio baltymo paruošti 2 M Gnd-HCl 50 mM fosfatiname buferyje pH 6, įstatomi į aplink horizontalią ašį besisukančią maišyklę ir inkubuojami termostate 37 °C 4 dienas. Amiloidinių fibrilių susidarymas patikrinamas fluorimetru, išmatuojant ThT fluorescencijos intensyvumą (sužadinamas 450 nm, emisija matuojama 460-550 nm bangų srityje)

### 2.2.9. Mėginių paruošimas elektroninei mikroskopijai

Žmogaus ir žiurkėno prioninių baltymų fibrilės buvo patikrintos elektroniniu mikroskopu. 3  $\mu$ l 20 kartų skiesto mėginio buvo užnešami ant anglimi dengtų vario tinklelių ir 30s dažomi 3  $\mu$ l 2% uranilacetatu. Po dažymo tinkeliai 3 kartus po 3  $\mu$ l praplaunami dejonizuotu vandeniu.

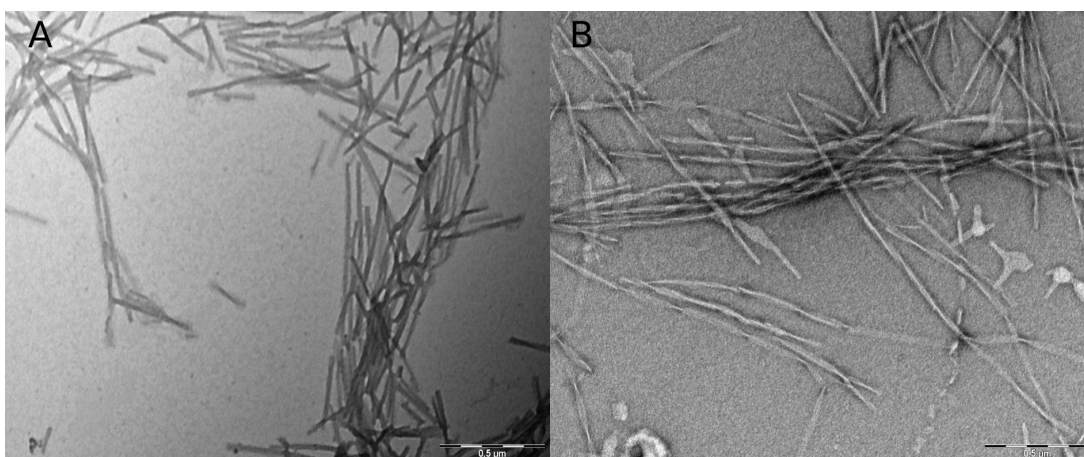
### 2.2.10. Agregacijos kinetika

Suformuotos prioninių baltymų fibrilės skaldomas ultragarsu (10 min., 20 % amplitudė, 30 s veikimo / 30 s poilsio režimu). Į 900  $\mu$ l prioninio baltymo mėginį (0,5 mg/ml, 2 M Gnd-HCl 50 mM FB pH 6, 55 mM ThT) įdedama 100  $\mu$ l suskaldytų fibrilių ir staigiai išpilstoma po 150  $\mu$ l (po 6 pakartojimus) į 96 šulinėlių lėkštelę. Fibrilių ilgėjimas matuojamas „Synergy H1 Multi-Mode Reader” spektrofotometru (sužadinimas 450 nm, emisija 482 nm, 300–600 nm absorbcija).

### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

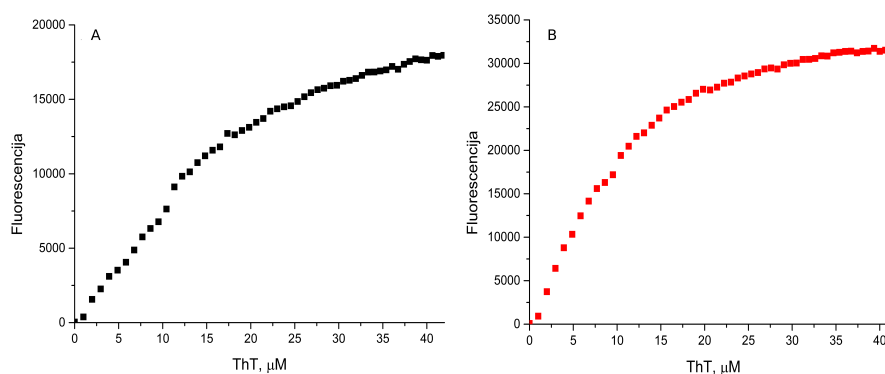
#### 3.1. Maišymo pobūdžio įtaka agregacijai

Darbo pradžioje buvo suformuotos HuPrP23-231 ir ShaPrP23-232 amiloidinės fibrilės. Mėginiai su fibrilėmis buvo patikrinti elektroniniu mikroskopu, norint įsitikinti ar tikrai susidarė fibrilės (8 pav.).



**8 pav.** Elektroninės mikroskopijos nuotraukos. (A) HuPrP amiloidinės fibrilės, (B) žiurkėno amiloidinės fibrilės

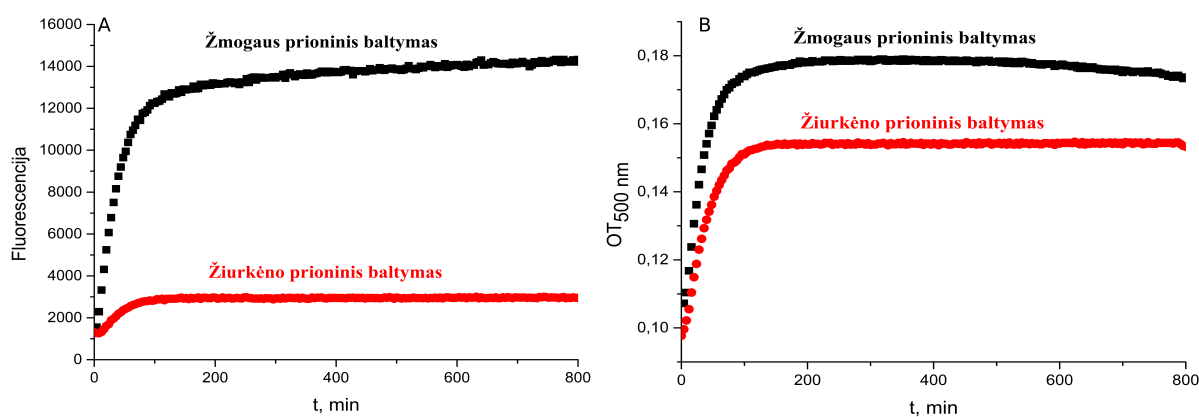
Tiriant HuPrP ir ShaPrP fibriles buvo pastebėta, kad jų ThT fluorescencijos intensyvumas skiriasi priklausomai nuo to, kaip jos buvo maišytos. Vartant mėgintuvėlius apie savo ašį arba juos kratant, susidaro skirtingos fibrilės, kurių ThT fluorescencijos intensyvumas skiriasi iki 2 kartų. Pabandžius titruoti fibriles su ThT (9 pav.), pastebėta, kad kratytų fibrilių maksimali ThT fluorescencija siekė apie 30000 vienetų, o suktų aplink savo ašį 18000 vienetų. Literatūros šaltinyje (Makarava ir Baskakov, 2008) teigiama, kad susidaro skirtingos morfologijos fibrilės. Siekiant, kad skirtingų mėginių fluorescencijos intensyvumai būtų panašūs, tolimesniuose tyrimuose nuspręsta baltymus agreguoti tik vartant mėgintuvėlius.



**9 pav.** HuPrP fibrilių titravimas su ThT. (A) Vartytos fibrilės. (B) Kratytos fibrilės.

### 3.2. Žmogaus ir žiurkėno fibrilių „sėklos“ įtaka

Sekančiu žingsniu buvo patikrinta ar tarp HuPrP23-231 ir ShaPrP23-232 yra tarprūšinis barjeras. HuPrP23-231 ir ShaPrP23-232 natyvūs baltymai buvo paveikti HuPrP23-231 fibrilėmis. Rezultatai (10 pav.) parodė, kad veikiant HuPrP fibrilėmis, ThT fluorescencija yra didžiausia kai HuPrP fibrilės sąveikauja su HuPrP, kas yra logiška, nes sąveikauja vienodų sekų baltymai. Abiem atvejais buvo pasiekta atkarpa, kuomet ThT fluorescencijos intensyvumas nebekito. Įvertinti ar tikrai vyko agregacija, neužteko vien fluorescencijos matavimų, nes skirtingų baltymų fibrilių ThT fluorescencija skiriasi, ir neaišku, ar tikrai agreguoja baltymas. Todėl buvo matuojamas optinis tankis esant 500 nm bangos ilgiui. Susidariusios fibrilės yra netirpios, dėl to atsiranda šviesos sklaida, kurią galima įvertinti optiniu tankiu. Pastebėta, kad HuPrP fibrilių „sėkla“ veikia vienodai gerai HuPrP ir ShaPrP, todėl iš ShaPrP baltymas barjero neturi.

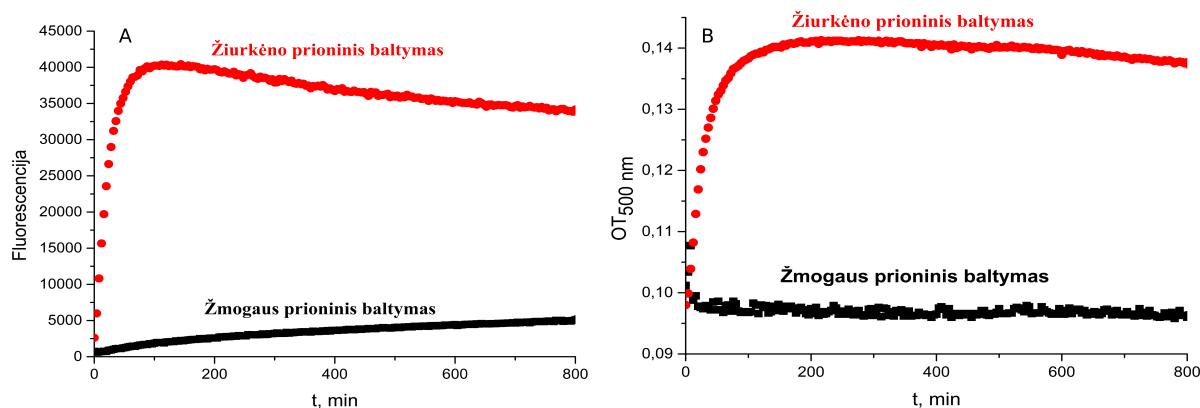


10 pav. HuPrP23-231 fibrilių „sėklos“ įtaka HuPrP23-231 ir ShaPrP23-232 baltymams. (A) Fluorescencijos kreivė. (B) Optinio tankio kreivė.

ShaPrP fibrilių „sėklos“ įtakos matavimai parodė, kad kaip ir su HuPrP fibrilėmis, didžiausia ThT fluorescencija stebima, kai fibrilės sąveikauja su baltymu, iš kurio jos buvo suagreguotos. Tačiau, pamatavus optinį tankį, buvo pastebėta, kad ShaPrP „sėkla“ labai silpnai veikia HuPrP baltymą. Remiantis šiais rezultatais nuspręsta, kad egzistuoja barjeras, kuris neleidžia inicijuoti HuPrP greitos agregacijos į amiloidines fibriles.

### 3.3. Sekų palyginimas

Literatūros šaltinyje (Surewicz ir Apostol, 2011) teigima, kad rekombinantiniuose prioniniuose baltymuose amiloidinių fibrilių  $\beta$ -klostės susidaro ties 160-220 aminorūgštimis, todėl siekiant surasti skirtumus tarp HuPrP160-220 ir ShaPrP160-220 sudarančių amino rūgščių, jų sekos palygintos tarpusavyje (12 pav.). Buvo rasti 8 skirtumai. Norint patikrinti ar tarprūšiniam barjerui užtenka vienos aminorūgšties nuspręsta atlikti 8 mutageneses, įvedant po vieną mutaciją (V166M, Q168E, N170S, I203V, I205M, V215T,



**11 pav.** ShaPrP23-232 fibrilių „sėklos“ įtaka HuPrP23-231 ir ShaPrP232-232 baltymams. (A) Fluorescencijos kreivė. (B) Optinio tankio kreivė.

Q219E ir K220R) į ShaPrP23-232 geną. Taip pat iš laboratorijos praktikos žinoma, kad ShaPrP fibrilės gali veikti pelės prioninį baltymą (MoPrP). Palyginus ShaPrP ir MoPrP sekas, pamatyta, kad 166, 168, 203, 219, 220 ar. sutampa, o 170, 205 ar. atitinka HuPrP randamas aminorūgštis, todėl buvo atlikta dviguba mutagenezė, pakeičiant dvi vienodas aminorūgštis Q168E/Q219E ShaPrP gene. HuPrP21-231, ShaPrP23-232 ir MoPrP23-230 pilnos sekos pateiktos priede (20 pav.) .

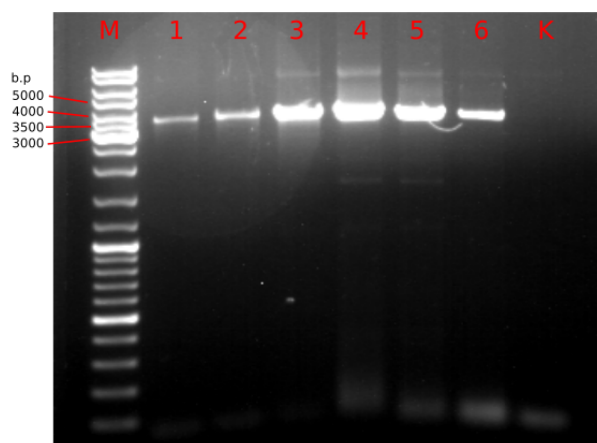
	160	170	180	190	200	210	220
HuPrP160-220	QVYYRPMDEYSNQNQNFVHDCVNI	TIKQHTVTTTTKGENFTETD	KKMERVVEQMCITQYER				
ShaPrP160-220	QVYYRPMDCVYNNQNQNFVHDCVNI	TIKQHTVTTTTKGENFTETD	KKMERVVEQMCITQYER				

**12 pav.** HuPrP160-220 ir ShaPrP160-220 aminorūgščių skirtumai. Raudonai pavaizduoti dideli skirtumai tarp aminorūgščių, o žaliai – maži.

### 3.4. Kryptinga mutagenezė

Kryptingos mutagenzės metu naudojamos dvi pradmenų poros su kelių nukleotidų neatitikimais pradmenų centruose. PGR reakcijos metu dėl šių neatitikimų polimerazė padaugina DNR su įvestomis mutacijomis. Be to, PGR produkto kiekis didėja linijškai, o ne eksponentiškai, nes susidarę produktai nenaudojami kaip šablonai. Polimerazės nuskaityto visą DNR plazmidę, todėl norint išvengti klaidų ar papildomų mutacijų, naudojamos procesyvos polimerazės. Mutagenezės atliktos su sukonstruotomis pradmenų poromis (lentelė 8, pateikta prieduose). Išbandytos dvi polimerazės Pfu ir Phusion. PGR produktai buvo karpomi DpnI restriktaze ir patikrinti elektroforezės metodu (13 pav.). Šabloninė DNR išskirta iš *E. coli* ląstelių būna metilinta, o DpnI specifiskai kerpa metilintą DNR. Konstruktai transformuoti į *E. coli* XL1 Blue kompetentines ląsteles, iš kurių vėliau išgryninta plazmidinė DNR, naudojant „Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį. Plazmidės nusekvenuotos VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre ir įsitikinta, kad pavyko sėkmingai gauti 8 plazmidės su taškinėmis mutacijomis ir

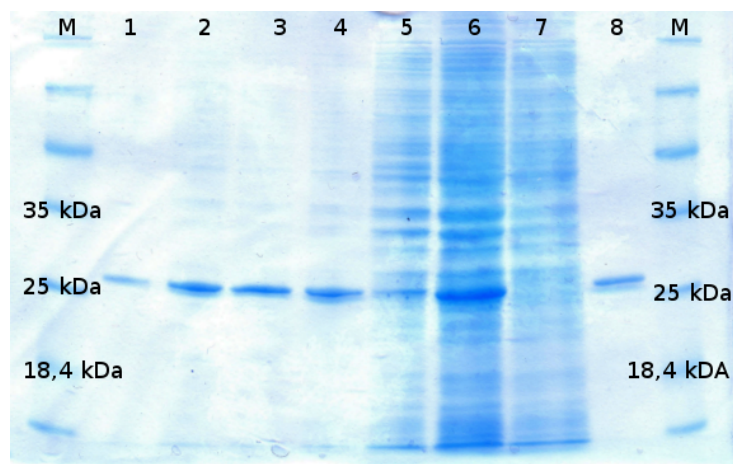
1 plazmidę su dviguba mutacija.



**13 pav.** Agarozės gelis. M – molekulinės masės žymuo, 1–3 - DNR su T215I mutacija, 4–6 DNR su K220R mutacija. 1, 2, 4, 5 – šulinėliuose naudotas CG buferinis tirpalas, 3, 6 – HF buferinis tirpalas, 1, 4 – šulinėliuose mėginiai su DMSO, K – kontrolė be šabloninės DNR.

### 3.5. Auginimas

Įsitikinus, kad sėkmingai gautos reikiamos plazmidės su mutacijomis, plazmidės buvo transformuotos ir augintos pagal pateiktą protokolą metodų apraše. Mėginiai NDS-PAGE imti prieš indukciją ir po indukcijos (14 pav.).

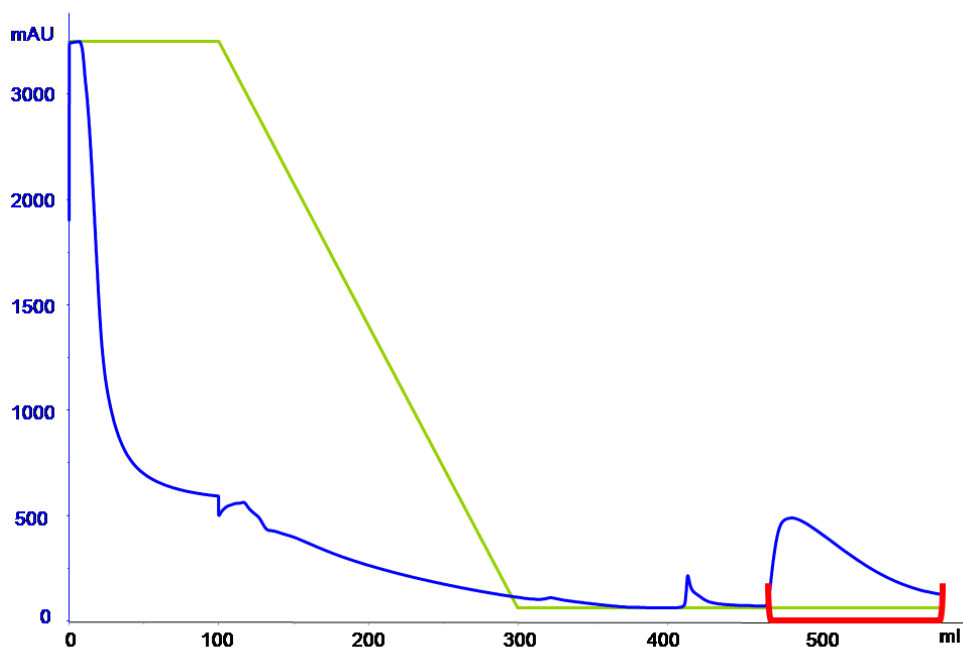


**14 pav.** NDS-PAGE gelis. M – molekulių masių žymuo. Auginimas: 1-4 mėginiai prieš indukciją, 5 – po indukcijos. Gryninimas: 6 – supernatantas, 7 – nesisorbavusi frakcija, 8 – išgryninta frakcija.

### 3.6. Renatūracija ir giminingumo chromatografija

Baltymai buvo ekspresuojami intarpiniuose kūneliuose, todėl biomasė sumaišoma su denatūruojančiu B1 buferiniu tirpalu ir ardoma ultragarsu. Renatūracija vykdoma ko-

lonoje. Baltymai renatūruojami mažinant B1 buferio tirpalo koncentraciją. Tiksliniai baltymai turi heksahistidininį inkarą N-gale, todėl gryninama naudojant nikeliu pakrautą „Ni Sepharose 6 Fast Flow” sorbentą (15 pav.). Frakcijos, kuriose buvo didžiausi kiekiai baltymo, surinktos ir dializuotos D buferiniame tirpale. Po dializės baltymai koncentruoti iki 2,5 mg/ml. Biomasių ir baltymų kiekiai aprašyti priede (9 lentelė).



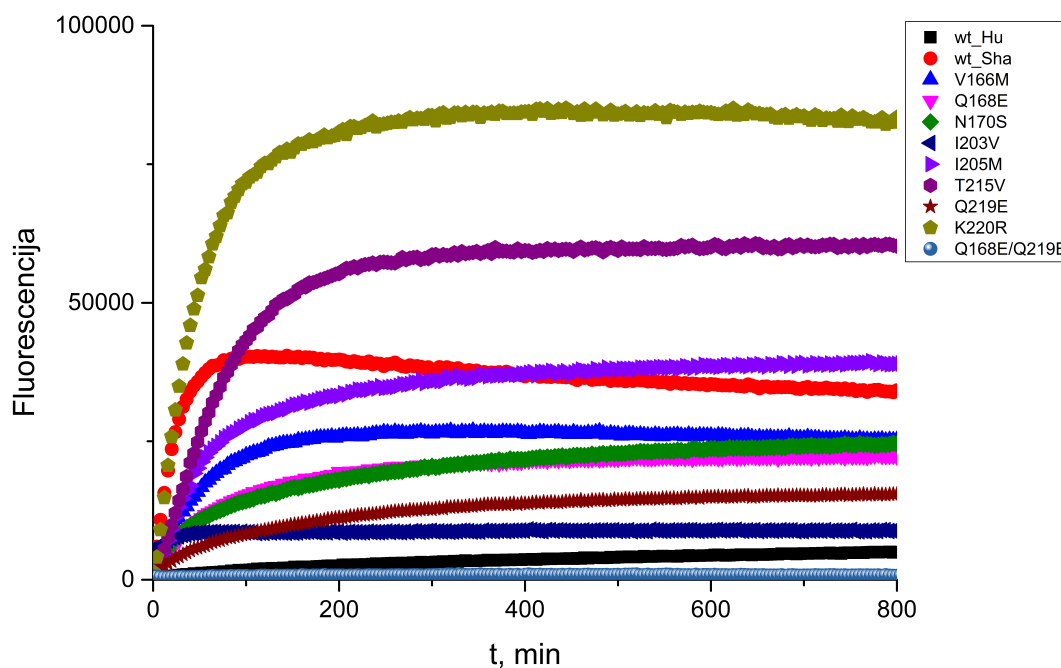
**15 pav.** ShaPrP23-232 baltymo giminingumo chromatograma. Mėlynai pavaizduota UV sugertis, žaliai – B1 buferinio tirpalo gradientas, raudonai – surinktos frakcijos.

### 3.7. Mutacijų įtaka baltymų agregacijai

#### 3.7.1. ShaPrP fibrilių „sėklos” įtaka baltymams su mutacijomis

Baltymai su mutacijomis buvo paveikti ShaPrP fibrilėmis, norint išsiaiškinti, kurį baltymą fibrilės veiks silpniausiai. ShaPrP fibrilės sugebėjo inicijuoti visų mutantinių baltymų agregaciją, bet kiekvienu atveju skyrėsi fluorescencijos intensyvumai (16 pav.). Pagal ThT fluorescenciją daugiausiai įtakos turėjo mutacijos I203V ir K220R. Lyginant su ShaPrP baltymu, labiausiai išsiskyrė K220R mutacija, kuri padidino ThT fluorescenciją 2 kartus, o mutacija I203V sumažino ThT fluorescenciją 2 kartus. ShaPrP fibrilės visiškai neveikė dvigubo mutanto Q168E/Q219E.

Įvertinus optinį tankį (17 pav.) nustatyta, kad ShaPrP sėkla tikrai neveikia HuPrP ir Q168E/Q219E mutanto. ThT fluorescencija I203V mutanto buvo labai silpna, bet pagal optinį tankį matosi, kad agregacija vyksta greitai.

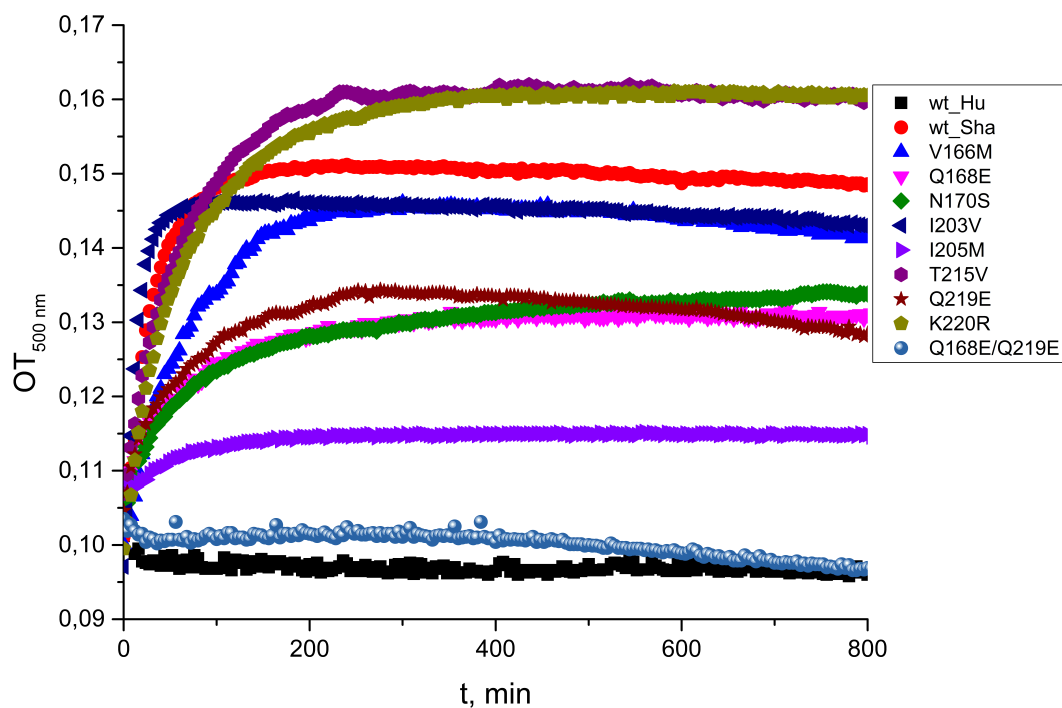


16 pav. ShaPrP fibrilių „sėklos“ įtaka baltymams su mutacijomis.

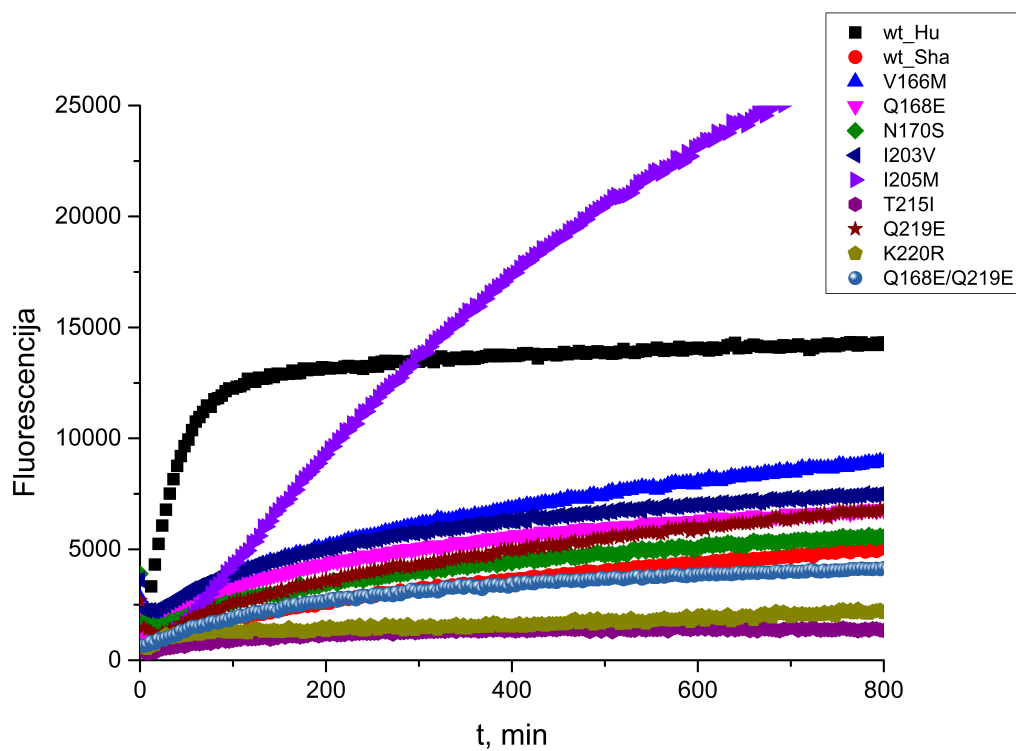
### 3.7.2. Mutantų fibrilių „sėklos“ įtaka HuPrP baltymui

Mutantų fibrilės veikė labai panašiai kaip ir ShaPrP fibrilės (18 pav.). Nei vienos fibrilės nepagerino HuPrP agregacijos. Labiausiai išsiskyrė mėginys su I205M fibrilėmis, nes jo ThT fluorescencija buvo labai didelė, bet agregacijos kreivė neužsilenkė. Pagal ThT fluorescenciją, fibrilės su T215I ir K220R mutacijomis veikė HuPrP silpniau negu ShaPrP fibrilės. ShaPrP su dvigubomis mutacijomis Q168E/Q219E veikė panašiai kaip ir kiti mutantai.

Pagal optinį tankį (19 pav.), HuPrP fibrilės sukeldavo greitą HuPrP baltymo agregaciją. ShaPrP mutantai V166M ir Q219E rodė aiškų optinio tankio kilimą, tačiau kitų mutantų fibrilės neskatinavo greitesnės agregacijos.

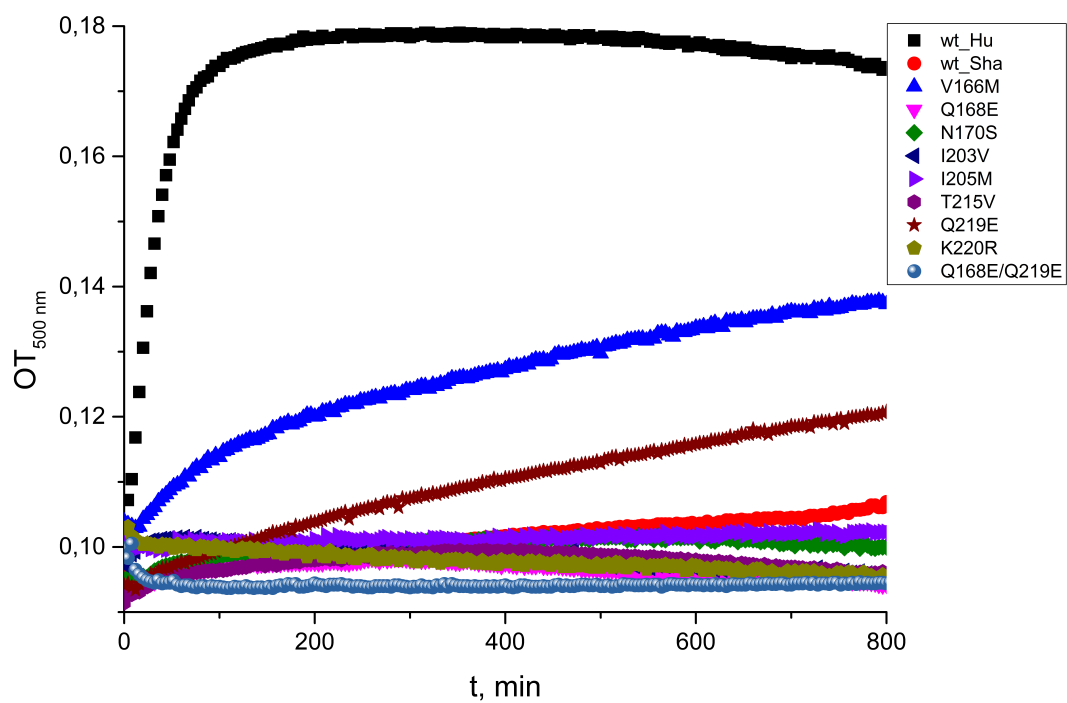


17 pav. ShaPrP fibrilių „sėklos“ įtaka baltymams su mutacijomis.



18 pav. Mutantų fibrilių „sėklos“ įtaka HuPrP baltymui.





19 pav. Mutantų fibrilių „sėklos“ įtaka HuPrP baltymui.

## 4. Išvados

1. Žmogaus prioninis baltymas turi tarprūšinį barjerą, kuris neleidžia žiurkėno prioninio baltymo fibrilėms incijuoti greitos agregacijos.
2. Atliktos 9 mutagenezės: įvestos 8 taškinės mutacijos (V166M, Q168E, N170S, I203V, I205M, V215T, Q219E, K220R) ir viena dviguba mutacija (O168E/Q219E) į ShaPrP23-232 geną.
3. Visų 9 baltymų su mutacijomis raiška gauta *E.coli* ląstelėse, baltymai renatūruoti iš intarpinių kūnelių ir išgryninti.
4. Nei vienos iš suformuotų mutantų amiloidinių fibrilių neturėjo didesnės įtakos HuPrP23-231 baltymo agregacijai negu ShaPrP23-232 fibrilės, tačiau ShaPrP23-231 baltymo fibrilės neveikė baltymo su O168E/Q219E mutacijomis.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS FAKULTETAS  
BIOCHEMIJOS IR MOLEKULINĖS BIOLOGIJOS KATEDRA

Biochemijos studijų programos IV kurso studentas

Darius Šulskis

BAIGIAMASIS BAKALAURO DARBAS

---

TARPRŪŠINIO BARJERO TARP ŽMOGAUS IR  
ŽIURKĖNO PRIONINIO BALTYMO TYRIMAS

---

SANTRAUKA

Transmisinės spongiforminės encefalopatijos (TSE) yra neurodegeneratyvinės ligos, kurių metu smegenyse yra randamos amiloidinių agregatų sancaupos. TSE ligos išsiskiria tuo, kad jas sukelia infektyvūs baltymai - prionai. TSE gali būti laisvai perduodamos tarp rūšių, bet kai kuriais atvejais egzistuoja barjerai, kurie neleidžia užsikrėsti prioninėmis ligomis. Barjerus nulemia skirtumai tarp prioninių baltymų (PrP) aminorūgščių sekų.

Šiame darbe tyrinėjamas tarprūšinis barjeras tarp rekombinantinio žmogaus ir žiurkėno prioninių baltymų. Darbo metu baltymai buvo agreguojami į amiloidines fibriles ir stebimas fibrilių gebėjimas incijuoti agregaciją su fluorescenciniu ThT dažū.

Rezultatai parodė, kad žiurkėno PrP fibrilės labai silpnai veikia žmogaus PrP agregaciją. Išgryninus devynis žiurkėno PrP baltymus su įvairiomis mutacijomis (V166M, Q168E, N170S, I203V, I205M, V215T, Q219E, K220R ir O168E/Q219E) pastebėta, kad nei vienos mutantų fibrilės nepagerino žmogaus PrP agregacijos, tačiau žiurkėno PrP fibrilės nebeveikė baltymo su Q168E/Q219E mutacijomis.

VILNIUS, 2015

VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF CHEMISTRY  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

IVth year student of Biochemistry Bsc

Darius Šulskis

BACHELOR THESIS

---

LOOKING FOR THE ORIGINS OF THE SPECIES  
BARRIER BETWEEN HUMAN AND HAMSTER PRION  
PROTEINS

---

SUMMARY

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are neurodegenerative diseases in which amyloid aggregates accumulate in the brain. TSE diseases are caused by infectious proteins – prions. TSE can be freely transmitted between species, but in some cases there are barriers, which give immunity to prion diseases. Barriers are determined by prion protein (PrP) amino acid sequence.

This research investigates the species barrier between human and hamster recombinant prion proteins. During the course of this work proteins were aggregated to amyloid fibrils and then checked with ThT fluorescence dye in order to find out whenever fibrils can initiate aggregation of native protein.

Results have shown that hamster PrP fibrils have diminished effects on Human PrP aggregation compared to human fibrils. Thus 9 hamster PrP with different mutations (V166M, Q168E, N170S, I203V, I205M, V215T, Q219E, K220R and O168E/Q219E) were purified and it was found out that none of mutant proteins fibrils can initiate aggregation of human PrP but it was noticed that hamster PrP fibrils had no influence on O168E/Q219E protein aggregation.

VILNIUS, 2015

## Priedai

>HuPrP21-231 229aa  
 MRGSHHHHHGMA SLVPRGSDPKRKP PGGWNTGGSRYPGQSSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWQPHGGG  
 WGQPHGGGGWQPHGGGGWQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPI IHFG  
 SDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQ  
 MCITQYERESQAYYQRGSS

>ShaPrP23-232 232aa  
 MRGSHHHHHGMA SLVPRGSDPKRKP PGGWNTGGSRYPGQSSPGGNRYPPQGGGTWGQPHGGGGWQPHG  
 GGWQPHGGGGWQPHGGGGWQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPMMH  
 FGNDWEDRYRENMNRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVV  
 EQMCTTQYQKESQAYYDGRSS

>MoPrP23-230 230aa  
 MRGSHHHHHGMA SLVPRGSDPKRKP PGGWNTGGSRYPGQSSPGGNRYPPQGGGTWGQPHGGGGWQPHGG  
 SWGQPHGGGGWQPHGGGGWQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPMIHF  
 GNDWEDRYRENMYRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTTKGENFTETDVKMMERVVE  
 QMCVTTQYQKESQAYYDGRSS

20 pav. HuPrP23-232, ShaPrP23-232 ir MoPrP23-230 aminorūgščių sekos.

8 lentelė. Pradmenų sekos.

Nr.	Mutacija	Kryptis	Seka
1.	V166M	Koduojuanti	5' GTATTACCGCCAATGGACCAGTACAAC 3'
		Nekoduojuanti	5' GTTGTACTGGTCCATTGGCCGGTAATAC 3'
2.	Q168E	Koduojuanti	5' CGGCCAGTGGACGAATACAACAACCAG 3'
		Nekoduojuanti	5' CTGGTGTGTATTCTGTCCTACTGGCCG 3'
3.	N170S	Koduojuanti	5' GTGGACCAGTACAGCAACCAGAACAAC 3'
		Nekoduojuanti	5' GTTGTCTGGTGTGCTGTACTGGTCCAC 3'
4.	I203V	Koduojuanti	5' CACGGAGACCGACGTGAAGATAATGGAGCG 3'
		Nekoduojuanti	5' CGCTCCATTATCTTCACGTCGGTCTCCGTG 3'
5.	I205M	Koduojuanti	5' CCGACATCAAGATGATGGAGCGCGTG 3'
		Nekoduojuanti	5' CACGCGCTCCATCATCTTGATGTCGG 3'
6.	T215I	Koduojuanti	5' GTGGAGCAGATGTGTATTACCCAGTATCAGAA 3'
		Nekoduojuanti	5' CTTCTGATACTGGGAATACACATCTGCTCCAC 3'
7.	Q219E	Koduojuanti	5' GTACCACCCAGTATGAAAAGGAGTCCCAGGCC 3'
		Nekoduojuanti	5' GGCCTGGGACTCCTTTTCATACTGGGTGGTAC 3'
8.	K220R	Koduojuanti	5' GTACCACCCAGTATCAGCGTGAGTCCCAGGCCTACTAC3'
		Nekoduojuanti	5' GTAGTAGGCCTGGGACTCACGCTGATACTGGGTGGTAC3'

9 lentelė. Biomasių ir baltymų kiekiai.

	V166M	Q168E	N170S	I203V	I205M	T215V	Q219E	K220R	Q168E Q219E
Biomasė	8,74 g	9,01 g	5,1 g	7,85 g	7,19 g	7,77 g	8,19 g	8,66 g	6,22 g
Baltymo kiekis	11 mg	16 mg	10 mg	21 mg	20 mg	28 mg	22 mg	21 mg	20 mg

## Literatūros sąrašas

- Abid, K. ir Soto, C. (2006). The intriguing prion disorders.
- Aguzzi, A., Baumann, F., ir Bremer, J. (2008). The prion's elusive reason for being. *Annual review of neuroscience*.
- Aguzzi, A. ir Calella, A. M. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiological reviews*, 89:1105–1152.
- Apostol, M. I., Wiltzius, J. J. W., Sawaya, M. R., Cascio, D., ir Eisenberg, D. (2011). Atomic structures suggest determinants of transmission barriers in mammalian prion disease. *Biochemistry*, 50(13):2456–63.
- Aterman, K. (1976). A historical note on the iodine-sulphuric acid reaction of amyloid. *Histochemistry*, 49:131–143.
- Barria, M. a., Mukherjee, A., Gonzalez-Romero, D., Morales, R., ir Soto, C. (2009). De novo generation of infectious prions in vitro produces a new disease phenotype. *PLoS Pathogens*, 5(5).
- Benetti, F., Geschwind, M. D., ir Legname, G. (2010). De novo prions. *F1000 biology reports*, 2(June):4–7.
- Bett, C., Fernandez-Borges, N., Kurt, T. D., Lucero, M., Nilsson, K. P. R., Castilla, J., ir Sigurdson, C. J. (2012). Structure of the 2-2 loop and interspecies prion transmission.
- Biancalana, M. ir Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(7):1405–12.
- Brown, K. ir Mastrianni, J. A. (2010). The prion diseases. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 23(4):277–298.
- Brundin, P., Melki, R., ir Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4):301–307.
- Caughey, B. ir Baron, G. S. (2006). Prions and their partners in crime. *Nature*, 443(7113):803–810.
- Chiti, F. ir Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry*, 75:333–366.
- Chuang, C.-C., Liao, T.-Y., Chen, E. H.-L., ir Chen, R. P.-Y. (2013). How do amino acid substitutions affect the amyloidogenic properties and seeding efficiency of prion peptides. *Amino acids*, 45(4):785–96.

- Cobb, N. J., Sönnichsen, F. D., McHaourab, H., ir Surewicz, W. K. (2007). Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(48):18946–18951.
- Cobb, N. J. ir Surewicz, W. K. (2009). Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry*, 48(12):2574–85.
- Collinge, J. ir Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science (New York, N.Y.)*, 318(2007):930–936.
- Damberger, F. F., Christen, B., Pérez, D. R., Hornemann, S., ir Wüthrich, K. (2011). Cellular prion protein conformation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42):17308–17313.
- DeMarco, M. L. ir Daggett, V. (2005). Local environmental effects on the structure of the prion protein.
- Dobson, C. M. (2003). (CUL-ID:1481556) Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(December):884–890.
- Elghetany, M. T. ir Saleem, a. (1988). Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain technology*, 63:201–212.
- Foderà, V., Groenning, M., Vetri, V., Librizzi, F., Spagnolo, S., Cornett, C., Olsen, L., van de Weert, M., ir Leone, M. (2008). Thioflavin T hydroxylation at basic pH and its effect on amyloid fibril detection. *The journal of physical chemistry. B*, 112(47):15174–81.
- Fry, D. E. (2010). Prions: Reassessment of the germ theory of disease.
- Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., ir Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: Classification and characterisation.
- Groveman, B. R., Dolan, M. a., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., ir Caughey, B. (2014). Parallel In-register Intermolecular -Sheet Architectures for Prion-seeded Prion Protein (PrP) Amyloids. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35):24129–24142.
- Ironside, J. W. (2010). Variant Creutzfeldt-Jakob disease.
- Jones, E. M., Surewicz, K., ir Surewicz, W. K. (2006). Role of N-terminal familial mutations in prion protein fibrillization and prion amyloid propagation in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 281(12):8190–8196.

- Kim, C., Haldiman, T., Surewicz, K., Cohen, Y., Chen, W., Blevins, J., Sy, M. S., Cohen, M., Kong, Q., Telling, G. C., Surewicz, W. K., ir Safar, J. G. (2012). Small Protease Sensitive Oligomers of PrPSc in Distinct Human Prions Determine Conversion Rate of PrPC. *PLoS Pathogens*, 8(8).
- Kocisko, D. a., Priola, S. a., Raymond, G. J., Chesebro, B., Lansbury, P. T., ir Caughey, B. (1995). Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(April):3923–3927.
- Kretzschmar, H. ir Tatzelt, J. (2013). Prion disease: a tale of folds and strains. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 23(3):321–32.
- Kurt, T. D., Jiang, L., Bett, C., Eisenberg, D., ir Sigurdson, C. J. (2014). A proposed mechanism for the promotion of prion conversion involving a strictly conserved tyrosine residue in the  $\alpha$ 2-  $\beta$ 2 loop of PrPC. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15):10660–10667.
- Lee, C. I., Yang, Q., Perrier, V., ir Baskakov, I. V. (2007). The dominant-negative effect of the Q218K variant of the prion protein does not require protein X. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 16(10):2166–2173.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H.-o. B., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., ir Prusiner, S. B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science (New York, N.Y.)*, 305(July):673–676.
- Legname, G., Giachin, G., ir Benetti, F. (2012). Non-fibrillar Amyloidogenic Protein Assemblies - Common Cytotoxins Underlying Degenerative Diseases. pages 289–317.
- Lloyd, S. E., Mead, S., ir Collinge, J. (2013). Genetics of prion diseases. *Current Opinion in Genetics and Development*, 23(3):345–351.
- Ma, J. (2013). Prion protein conversion and lipids. In *Prions and Diseases, Volume I*, pages 107–134. Springer.
- Makarava, N. ir Baskakov, I. V. (2008). The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23):15988–15996.
- Mehrpour, M. ir Codogno, P. (2010). Prion protein: From physiology to cancer biology.
- Montagna, P., Gambetti, P., Cortelli, P., ir Lugaresi, E. (2003). Familial and sporadic fatal insomnia.



- Moore, R. A., Taubner, L. M., ir Priola, S. A. (2009). Prion protein misfolding and disease.
- Moore, R. a., Vorberg, I., ir Priola, S. a. (2005). Species barriers in prion diseases—brief review. *Archives of virology. Supplementum*, (19):187–202.
- Nagel-steger, L., Riesner, D., Panza, G., Luers, L., Sto, J., Willbold, D., ir Birkmann, E. (2010). Molecular Interactions between Prions as Seeds and Recombinant Prion Proteins as Substrates Resemble the Biological Interspecies Barrier In Vitro. 5(12).
- Notari, S., Strammiello, R., Capellari, S., Giese, A., Cescatti, M., Grassi, J., Ghetti, B., Langeveld, J. P. M., Zou, W. Q., Gambetti, P., Kretzschmar, H. A., ir Parchi, P. (2008). Characterization of truncated forms of abnormal prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45):30557–30565.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Legname, G., Matsunaga, Y., Vergara, J., Burton, D. R., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., ir Scott, M. R. (2002). A Change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron*, 34(6):921–932.
- Priola, S. A. (2013). Species barriers in prion disease. In *Prions and Diseases, Volume II*, pages 139–154. Springer.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, 216(April):136–144.
- Race, R. E., Priola, S. a., Bessen, R. a., Ernst, D., Dockter, J., Rall, G. F., Mucke, L., Chesebro, B., ir Oldstone, M. B. (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron*, 15:1183–1191.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., ir Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*.
- Robinson, P. J. ir Pinheiro, T. J. T. (2009). The unfolding of the prion protein sheds light on the mechanisms of prion susceptibility and species barrier. *Biochemistry*, 48(36):8551–8.
- Rossetti, G., Cong, X., Caliandro, R., Legname, G., ir Carloni, P. (2011). Common structural traits across pathogenic mutants of the human prion protein and their implications for familial prion diseases. *Journal of molecular biology*, 411(3):700–12.
- Saborio, G. P., Permanne, B., ir Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 411(6839):810–813.

- Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. a., Apostol, M. I., Thompson, M. J., Balbirnie, M., Wiltzius, J. J. W., McFarlane, H. T., Madsen, A. O., Riek, C., ir Eisenberg, D. (2007). Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature*, 447(7143):453–457.
- Smirnovas, V., Baron, G. S., Offerdahl, D. K., Raymond, G. J., Caughey, B., ir Surewicz, W. K. (2011). Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nature structural & molecular biology*, 18(4):504–506.
- Surewicz, W. K. ir Apostol, M. I. (2011). Prion protein and its conformational conversion: a structural perspective. *Top Curr Chem*, 305(June):135–167.
- Sweeting, B., Brown, E., Khan, M. Q., Chakrabartty, A., ir Pai, E. F. (2013). N-terminal helix-cap in  $\alpha$ -helix 2 modulates  $\beta$ -state misfolding in rabbit and hamster prion proteins. *PloS one*, 8(5):e63047.
- Vanik, D. L., Surewicz, K. A., ir Surewicz, W. K. (2004). Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Molecular Cell*, 14:139–145.
- Weissmann, C. (2004). The state of the prion. *Nature reviews. Microbiology*, 2(11):861–871.
- Wiltzius, J. J. W., Landau, M., Nelson, R., Sawaya, M. R., Apostol, M. I., Goldschmidt, L., Soriaga, A. B., Cascio, D., Rajashankar, K., ir Eisenberg, D. (2009). Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance. *Nature structural & molecular biology*, 16(9):973–978.
- Zou, W.-Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., Shimoji, M., Langeveld, J. P. M., Castellani, R., Notari, S., Crain, B., Schmidt, R. E., Geschwind, M., Dearmond, S. J., Cairns, N. J., Dickson, D., Honig, L., Torres, J. M., Mastrianni, J., Capellari, S., Giaccone, G., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Cohen, M., Perry, G., Kong, Q., Parchi, P., Tagliavini, F., ir Gambetti, P. (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Annals of neurology*, 68(2):162–72.