

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos fakultetas

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė

Gerda BLANTAITYTĖ

Bakalauro darbas

**Jaučio rekombinantinio prioninio baltymo raiška,
gryninimas ir jo stabilumo bei agregacijos tyrimai**

Darbo vadovas

Dr. Vytautas Smirnovas

Vilnius, 2014

Jaučio rekombinantinio prioninio baltymo raiška, gryninimas ir jo stabilumo bei agregacijos tyrimai

Darbas atliktas Biotechnologijos instituto
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Gerda BLANTAITYTĖ

/parašas/

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

/parašas/

Turinys

Santrumpos	5
Įvadas	6
1 Literatūros apžvalga.....	8
1.1. Prionai.....	8
1.1.1 Prioninės ligos ir prioniniai baltymai	8
1.1.2 Jaučių kempinligė bei naujo varianto Creutzfeldto-Jakobo liga	9
1.1.3 Tarprūšinio barjero koncepcija ir prionų kamienai	11
1.1.4 Rekombinantinių prioninių baltymų tyrimai	12
1.1.5 Rekombinantinis bPrP23-230	13
1.2 Rekombinantinių baltymų gamyba.....	14
1.2.1 <i>E. coli</i> kaip ekspresijos sistema.....	14
1.2.2 Auto-indukcinė mitybinė terpė.....	16
1.2.3 Intarpiniai kūneliai ir baltymų renatūracija iš jų	18
1.2.4 Afininė chromatografija naudojant imobilizuotus metalo jonus (IMAC).....	19
1.2.5 Histidininė uodega ir jos kirpimas	19
1.2.6 Jonų mainų chromatografija.....	20
1.3 Fluorescencinė analizė.....	21
2 Medžiagos ir metodai.....	23
2.1 Naudoti reagentai, laboratoriniai įrenginiai, terpės, buferiniai tirpalai	23
2.1.1 Laboratorinė įranga	23
2.1.2 Reagentai	24
2.1.3 Naudotos terpės ir buferiniai tirpalai.....	24
2.2 Metodai.....	28
2.2.1 Bakterijų transformacija ir tikslinio baltymo raiškos indukcija	28
2.2.2 Baltymų elektroforezė	29
2.2.3 Renatūracija ir gryninimas giminingumo chromatografijos metodu	30
2.2.4 Histidino uodegos kirpimas ir jonų mainų chromatografija.....	32
2.2.5 Fibrilių paruošimas ir jų susidarymo įrodymas.....	32
2.2.6 Fluorescencinė analizė	32
2.2.7 Rekombinantinio bPrP23-230 agregacijos tyrimai	33
2.2.8 Rekombinantinio bPrP23-230 stabilumo įvertinimas	33
Denatūrantų įtakos tyrimas	34
2.2.9 Duomenų analizė.....	35
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	37

3.1	Rekombinantinio bPrP23-230 raiška.....	37
3.2	Rekombinantinio bPrP23-230 gryninimas	38
3.3	Rekombinantinio bPrP23-230 agregacijos tyrimai	42
3.4	Elektroninė mikroskopija	44
3.5	Rekombinantinio bPrP23-230 stabilumo tyrimai	45
3.5.1	Denatūrantų įtakos baltymo temperatūriniam stabilumui tyrimas	45
3.5.2	bPrP23-230 fibrilių stabilumo nustatymas	49
	Išvados	50
	Summary	52
	Literatūra.....	53

Santrumpos

ANS – 1,8-anilinoftaleno sulfonatas;

apm – apsisukimai per minutę;

APS – amonio persulfatas;

bPrP23-230 (angl. *bovine prion protein*) – jaučio prioninis baltymas;

bvPrP121-230 (angl. *bank vole prion protein*) – pelėno prioninis baltymas;

CD (angl. *circular dichroism*) – apskritiminis dichroizmas;

CJD (angl. *Creutzfeldt-Jakob disease*) – Creutzfeldto-Jakobo liga;

CNS – centrinė nervų sistema;

CWD (angl. *chronic wasting disease*) – lėtinis išsekimas;

GdnHCl – guanidino hidrochloridas;

GdnSCN – guanidino tiocianatas;

huPrP23-231 (angl. *human prion protein*) – žmogaus prioninis baltymas;

IPTG – izopropiltio-β-D-galaktozidas;

MBM (angl. *meat and bone meal*) – kaulamilčiai;

NDS – natrio dodecilsulfatas;

O.V. – optiniai vienetai;

PB – fosfatinis buferis;

PrP^{Res} (*resistant*) ir PrP^{Sc} (*scrapie*) – patogeniškos prioninio baltymo izoformos;

S.O.C. terpė (angl. *super optimal broth with catabolite repression*) – optimali mitybinė terpė;

scPrP23-231 (lot. *Sus scrofa*) – kiaulės prioninis baltymas;

TEM – transmisinis elektroninis mikroskopas;

TEMED – tetrametiletilendiaminas;

ThT (angl. *thioflavin T*) – tioflavinas T;

TSE (angl. *transmissible spongiform encephalopathy*) – transmisinė spongiforminė encefalopatija;

vCJD (angl. *new variant Creutzfeldt-Jakob disease*) – naujo varianto Creutzfeldto-Jakobo liga.

Įvadas

Prioniniai baltymai yra žinduolių smegenyse, ypač nervinių ląstelių paviršiuje, ekspresuojami glikoproteinai. Nepaisant to, kad tai evoliuciškai konservatyvūs baltymai, jų fiziologinės funkcijos nėra visiškai aiškios. Jie gali turėti dvi izoformas – natyvią (PrP^c) ir netinkamai susisukusią patogeninę izoformą (PrP^{Sc}). Pastaroji, patekusi į organizmą, katalizuoja natyvios formos virsmą į patogeninę izoformą. Tokie infekciniai patogenai sukelia spongiformines encefalopatijas – grupę mirtinų neurodegeneracinių ligų, kurios paveikia tiek laukinius bei naminius gyvūnus, tiek žmones. Avių ir ožkų *scrapie*, jaučių kempinligė, žmonių Creutzfeldto-Jakobo liga yra labiausiai paplitusios spongiforminės encefalopatijos. Praeito amžiaus viduryje klaidingai laikyti „lėtais centrinės nervų sistemos virusais“, šiuo metu prionai priskiriami baltyminių infekcinių patogenų klasei.

Terminas „prionas“ yra 1982 m. Stanley B. Prusiner įvesta anagrama (angl. *proteinaceous infectious particle*). Tačiau ligos, kurias sukelia prionai, buvo žinomos dar anksčiau – pirmieji įrašai apie avių *scrapie* siekia dar 18 a. pradžią, o praeito amžiaus šeštajame dešimtmetyje atradus Kuru ligą bei 1986 m. Didžiojoje Britanijoje kilus BSE epidemijai šie baltymai sulaukė didžiausio mokslininkų susidomėjimo. Prioninėms ligoms, kaip ir kitiems neurodegeneraciniams sutrikimams, būdingas netaisyklingai susisukusių baltymų kaupimasis, o esminis aspektas patogeniniame procese yra natyvaus PrP^c konformacijos virtimas patogenine PrP^{Sc} izoforma, kuri turi daugiau β struktūrų nei α spiralių. Toks infektyvus patogenas geba replikuotis, yra linkęs agreguoti bei yra labai stabilus.

Nepaisant to, kad prioninių baltymų tyrimai prasidėjo jau prieš keletą dešimtmečių, ir šiuo metu yra sukaupta nemažai duomenų, leidžiančių geriau suprasti neurodegeneracinių ligų eigą ir numatyti galimus prevencijos ar gydymo būdus, žinios apie prionus yra toli gražu nepilnos. Todėl šio darbo tikslas yra pagaminti pakankamą jaučio rekombinantinio prioninio baltymo (bPrP23-230) kiekį ir biofizikiniais metodais tirti jo agregaciją bei stabilumą. Tikslui pasiekti iškeliami tokie uždaviniai:

1. ekspresuoti rekombinantinį bPrP23-230 *E. coli* ląstelėse;
2. išgryninti jį chromatografiniais metodais;

3. nustatyti, ar jaučio prioninio baltymo fibrilės gali inicijuoti žmogaus, kiaulės ir pelėno prioninių baltymų agregaciją bei kokių greičiu ši agregacija vyksta;
4. pasitelkus elektroninę mikroskopiją įsitikinti, kad tikrai susidaro fibrilės;
5. patikrinti baltymo temperatūrinį stabilumą;
6. įvertinti bPrP23-230 fibrilių stabilumą guanidino tiocianato buferiniuose tirpaluose.

1 Literatūros apžvalga

1.1. Prionai

1.1.1 Prioninės ligos ir prioniniai baltymai

Prioninės ligos (žinomos kaip transmisinės spongiforminės encefalopatijos (TSE) arba tiesiog kempinligės) yra mirtinos neurodegeneracinės centrinės nervų sistemos ligos, kurios būdingos žmonėms (kuru, CJD, mirtina paveldimoji nemiga, Gerstmann-Straussler-Scheinker sindromas) ir gyvūnams (BSE – galvijams, *scrapie* – avims ir ožkoms, CWD – elniams ir briedžiams) (Prusiner, 1998). TSE būdinga CNS spongiforminė degeneracija, padaugėja astrocitų ir amiloidinių fibrilių agregatų smegenyse (Watts et al., 2006). Žmonių prioninės ligos ypatingos tuo, kad gali išsivystyti atsitiktinai (dėl geno mutacijos), gali būti paveldimos autosominiu dominantiniu būdu arba perduotos infektyviu mechanizmu (Prusiner, 1991), o kiekvienu atveju užkrėsti audiniai bei pasireiškiantys simptomai gali būti labai skirtingi. Ligos eigą galima suskirstyti į kelias stadijas: (1) infekcija ir periferinė replikacija, (2) perėjimas iš periferijos į CNS („neuroinvazija“), (3) neurodegeneracija (Aguzzi et al., 2004). Kaip ir kitiems neurodegeneraciniams sutrikimams, prioninėms ligoms būdingas netaisyklingai susisukusių baltymų kaupimasis. Tokie baltymai dažniausiai telkiasi dėl neefektyviai veikiančių kontrolės mechanizmų, lemia atskiros neuronų grupės sutrikimą, o vėliau – ir ligos simptomų pasireiškimą (Prusiner, 2001).

Esminis aspektas, išskiriantis prionines ligas iš kitų yra normaliomis sąlygomis ekspresuojamo ląstelės paviršiaus glikoproteino (prioninio baltymo, toliau - PrP) konformacinis pokytis į patogeninę izoformą. Prioninių baltymų nomenklatūra nėra sudėtinga: natyvus šeimininko koduojamas ląstelinis PrP žymimas PrP^c (angl. *prion protein*, *cellular*), o ligai specifinė, bet taip pat šeimininko koduojama izoforma – PrP^{Sc} (*scrapie*; toliau darbe toks sutrumpinimas naudojamas izoformos infektyvumui pabrėžti) (Aguzzi et al., 2004). PrP^{Sc} izoforma yra netirpi, sudaryta daugiausia iš β struktūrų, PrP^c – tirpus, daugiausia iš α spiralių sudarytas baltymas (Pan et al., 1993; Pergami et al., 1996). PrP^{Sc} kaupiasi infekuotų individų smegenyse, yra netirpus daugelyje detergentų ir atsparus proteazėms bei viduląsteliniam katabolizmui (Prusiner, 1982). Paveikus PrP^{Sc} proteinaze K, lieka C galinis domenai, *scrapie* infekcijų atveju vadinamas PrP27-30 (pagal molekulinę masę), o bendrai – PrP^{Res} (toliau darbe toks sutrumpinimas naudojamas izoformos atsparumui pabrėžti) (Watts et al., 2006). Kadangi PrP^c koduojantis genas yra būtinas spongiforminių encefalopatijų vystymuisi (Büeler et al., 1993;

Aguzzi et al., 2008), užblokavus šį geną, prionine liga susirgti neįmanoma (Jain ir Udgaonkar, 2011), todėl susitarta laikytis „protein-only“ hipotezės, kuri teigia, kad PrP^{Sc} yra pagrindinis infektyvaus patogeno komponentas (Okada et al., 2013).

PrP^c yra gausiai ekspresuojamas žinduolių CNS, taip pat blužnyje, limfmazgiuose, kraujyje ir kituose audiniuose (Linden et al., 2008), tačiau jo funkcija nėra iki galo aiški. Manoma, kad jo vaidmuo yra svarbus daugelyje fiziologinių procesų, pavyzdžiui, degraduojamas periferinėse nervinėse ląstelėse, PrP aktyvuoja mielino taisymo mechanizmą Švano ląstelėse, o kai jo nėra ląstelėse – indukuojama demielinizacija (Aguzzi, 2004; Jain ir Udgaonkar, 2011). Linden su kolegomis siūlo pabrėžti PrP svarbą nervinio signalo perdavime, antiapoptoziniuose procesuose (Linden et al., 2008).

PrP^{Res} kol kas yra vienintelė žinoma ligai specifiška makromolekulė, todėl visi komerciniai diagnostiniai metodai remiasi jos imunologiniu nustatymu (Aguzzi et al., 2004). Prioninės ligos taip pat diagnozuojamos atlikus CNS mikroskopinius tyrimus. Deja, tam tikromis sąlygomis PrP^c ir kai kurios PrP^{Sc} formos gali būti visiškai hidrolizuojamos, todėl toks būdas nėra labai patogus aptikti PrP^{Sc}. Šios proteazėms jautrios PrP^{Sc} formos žymimos sPrP^{Sc} (angl. *sensitive*). Skirtingų gyvūnų rūšių PrP^{Sc} ar tiesiog skirtingi jų kamienai taip pat gali būti nevienodai atsparūs proteazėms (Colby ir Prusiner, 2011).

1.1.2 Jaučių kempinligė bei naujo varianto Creutzfeldto-Jakobo liga

BSE, Lietuvoje žinoma kaip karvių kempinligė, yra užkrečiama galvijų degeneracinė liga, atsiradusi 1986 metais Didžiojoje Britanijoje, vėliau paplito daugelyje Europos šalių, taip pat Kanadoje, JAV, Japonijoje. Jaučių kempinligė priklauso TSE ligų grupei. Ji yra nepagydoma, mirtina, jai būdingas ilgas latentinis periodas; sunku nustatyti ligos pradžią, nes ji dažniausiai nespecifiška; nėra išrasta vakcinų, nes infekcija nesukelia šeimininko imuninio atsako (Soto, 2011).

Kempinligėms būdinga PrP^c potransliacinė konformacinė modifikacija, kurios metu susidaro PrP^{Res}. Palyginus su kitų gyvūnų TSE, karvių kempinligė aprėpia mažesnę audinių, kuriuose kaupiasi PrP^{Sc}, spektrą, nes ligos eigoje limfinė sistema dalyvauja mažiau (Aguzzi et al., 2004), bet agregatų aptinkama periferiniuose nerviniuose audiniuose (tinklainėje, nugaros smegenyse, neurohipofizėje) (Okada et al., 2013).

Jaučių kempinligės kilmė nėra iki galo aiški. Šiuo metu jos pradžia siejama su jaučio prioniniu baltymu, kurio geno sekoje įvyko spontantinė mutacija, arba *scrapie* patogeno (pastarasis labiau tikėtinas) (Watts et al., 2006). BSE atsiradimas sutapo su permainingomis MBM

gamyboje, kurio metu perdirbami kritę galvijai, avys, vištos, kiaulės, t. y., patogenas galėjo būti perduodamas su pašaru. Taupant gamyboje buvo atsisakyta tirpiklių ir virinimo procedūrų, o atskirymui apsiribota centrifugavimu. Manoma, kad toks pokytis lėmė, jog avių *scrapie* prionai atlaikė pakitusias perdirbimo sąlygas ir užkrėtė galvijus (Soto, 2011).

Nežiūrint to, kad atliekama daug testų su gyvais gyvūnais, kol kas nėra nė vieno metodo, kuris padėtų patikimai nustatyti BSE. Paprastai diagnozė nustatoma po mirties tiriant CNS audinius – identifikuojant būdingus audinių pažeidimus, aptinkant PrP^{Res}, ar *scrapie* fibriles elektroniniu mikroskopu. Kaip jau minėta, tokios diagnostikos jautrumas yra labai ribotas ir PrP^{Res} kaupimasis gali būti neaptinkamas inkubacijos metu. Pažeidimai (neuronų spongiforminis pokytis) atsiranda vėliau ligos eigoje, paprastai sutampa su pasireiškiančiais klinikiniais simptomais. Astrocitų pagausėjimas ir cerebralinė amiloidozė nebūdinga BSE (nors yra kitų TSE bruožas). Svarbu kontroliuoti jaučių kempinligę, nes galvijai yra skerdžiami, o jų mėsa vartojama maisto pramonėje ir patenka į žmonių maisto grandinę.

Manoma, kad jaučio prionai yra persidavę žmonėms. Pirmieji naujo varianto CJD (angl. *new variant CJD*; toliau – vCJD) atvejai užfiksuoti 1996 metais Didžiojoje Britanijoje. Ryšys tarp BSE ir vCJD buvo pasiūlytas pastebėjus vienodas inkubacijos trukmes netransgeninėse RIII pelėse (~310 dienų) po užkrėtimo jaučio ir žmogaus prionais (Aguzzi et al., 2008). vCJD prionai labai skiriasi nuo kitų žmogaus prionų tipų, pastebimi ankstyvi psichikos sutrikimai (depresija, irzlumas), raumenų koordinavimo stoka, o mirtis ištinka po 14 mėnesių nuo ligos pradžios. Patekę į organizmą, prionai replikuojasi limfiniuose audiniuose, o smegenyse mikroskopu pastebimos rausvos dėmės, paplitusio PrP^{Sc} sankaupos (Kretzschmar ir Tatzelt, 2013).

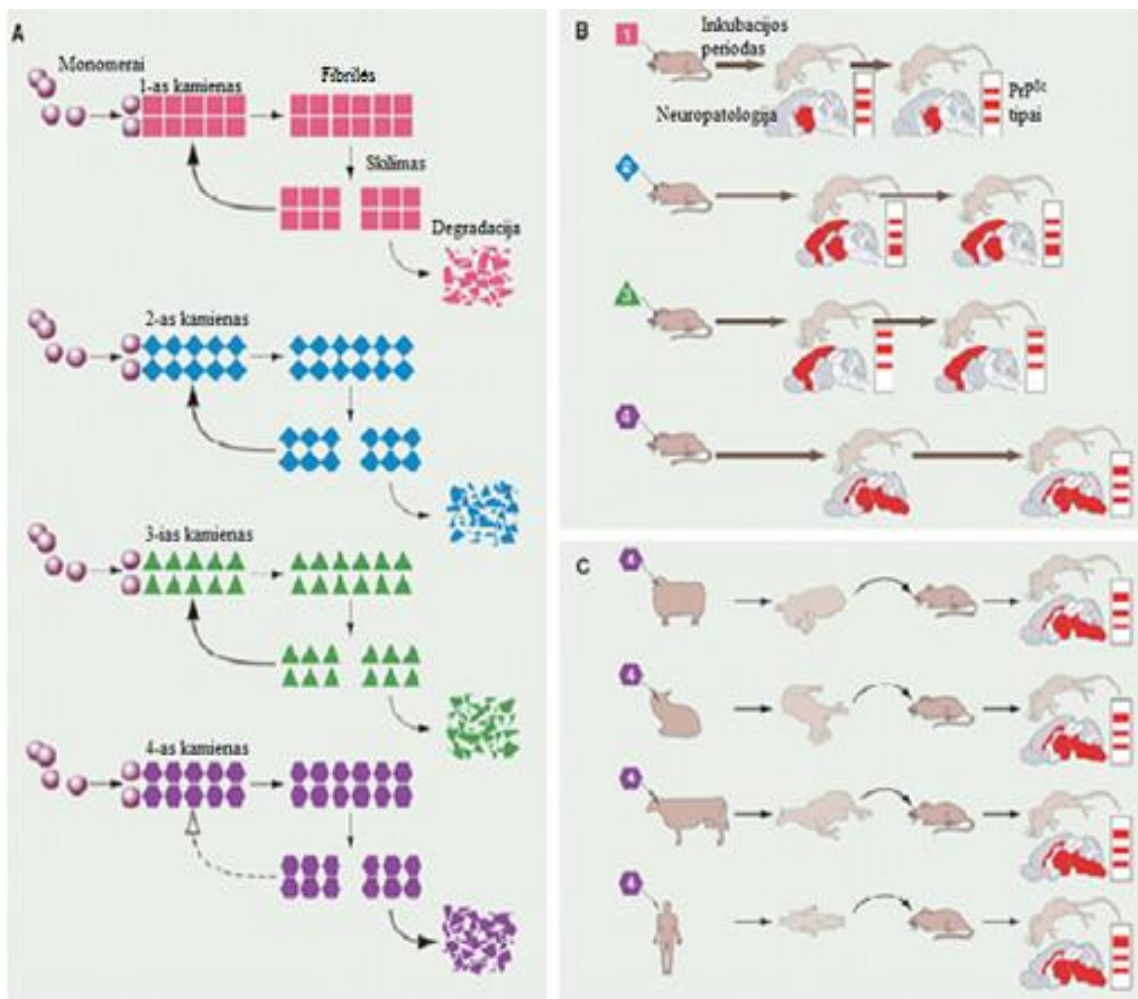
BSE patogenas, kaip ir *scrapie* ar CJD patogenai, yra unikalus savo atsparumu daugumai įprastų fizikinių ir cheminių nukenksminimo būdų, pavyzdžiui, inaktyvacijai ultravioletine ar jonizuojančia spinduliuote (Alper, 1993). Tuometinė vakcinų prieš virusines ligas gamybos metodika – poveikis karščiu ir formalinu – taip pat neveiksminga (Prusiner, 1998). Efektyvios cheminės priemonės – NaOH arba NaOCl, Environ LpH (Race ir Raymond, 2003).

1988 metais uždraudus maitinti avis ir jaučius MBM, BSE epidemija ir vCJD atvejų dažnumas sumažėjo. Liga buvo pasiekusi piką 2000 metais, kai mirė 28 žmonės (dabar sumažėjo iki 1-2 mirčių per metus). Iki šiol Didžiojoje Britanijoje diagnozuoti 176 vCJD atvejai, 49 – kitose 11-oje valstybių. Beje, BSE patogenas – jau ne vienintelė grėsmė vCJD atsirasti: užfiksuoti net 4 atvejai, kuomet vCJD infekcija buvo perduota žmogaus žmogui perpylus kraują (antrinė pernaša) (Kretzschmar ir Tatzelt, 2013). Tad nors vCJD pikas ir praėjo, lieka tikimybė, kad ligos

atvejų dar pasireikš, todėl būtina tirti prionines ligas sukeliančius baltymus ir ieškoti galimų gydymo būdų.

1.1.3 Tarprūšinio barjero koncepcija ir prionų kamienai

Infekciniai patogenai, tokie kaip virusai ir bakterijos, linkę mutuoti ir tokiu būdu atsiranda skirtingi jų tipai, kurie vadinami kamienais. Nors prioniniai baltymai neturi genetinės medžiagos, gali susidaryti skirtingos PrP^{Sc} struktūros, kurios lemia skirtingus ligos fenotipus. Tokios PrP^{Sc} struktūros pradėtos vadinti PrP kamienais. Tai yra infektyvios prioninių baltymų agregatų formos, kurios perduoda kamienui būdingą informaciją PrP monomerams ir tokiu būdu susidaro daugiau panašios struktūros agregatų (1.1 pav. A). Be to, kamienai lemia inkubacijos periodą, agregatų lokalizaciją, stabilumą bei atsparumą proteazėms skirtumus (1.1 pav. B), taip pat taip vadinamąjį tarprūšinį barjerą. Palyginus daugiau nei 40 žinduolių PrP sekų pastebėta, kad jų pirminės struktūros yra labai konservatyvios bei panašios, ir manoma, kad jos apsprendžia prionų infektyvumą tarp žinduolių rūšių (Collinge ir Clarke, 2007). Įvairios variacijos tarp rūšių bei atskirų individų gali turėti įtakos prioninės infekcijos imlumui. Taigi prionų pernaša į kitų rūšių atstovus dažniausiai yra stochastinis procesas, kuris priklauso nuo tarprūšinio barjero aukščio (Pattison, 1965). Trumpiausias inkubacijos periodas pasireiškia tarp tokių donorų ir recipientų, kurių PrP pirminės struktūros identiškos. Kuo labiau sekos skiriasi, tuo ilgesnis inkubacijos periodas; neretai infekuoti gyvūnai nesuserga prionine liga. Perdavimą kitoms rūšims taip pat lemia priono kamienas (Collinge ir Clarke, 2007). Pastebėta, kad prionų kamienas, lemiantis galvijų BSE, efektyviai perduodamas kitoms rūšims: nežiūrint to, kad pasikeičia pirminė PrP struktūra, būdingos molekulinės ir biologinės charakteristikos išlieka net įvykus kelioms pernašoms skirtingose rūšyse. Be to, tas pats kamienas iš skirtingų rūšių lemia tas pačias patologijas (1.1 pav. C). Kita vertus, skirtingi to paties šeimininko PrP kamienai, kurių pirminė struktūra ta pati, kitoms rūšims gali būti perduodami nevienodai – skirsis inkubacijos periodai bei ligų fenotipai. Skirtumus tarp kamienų lemia būtent skirtingos baltymo konformacijos (Collinge ir Clarke, 2007).

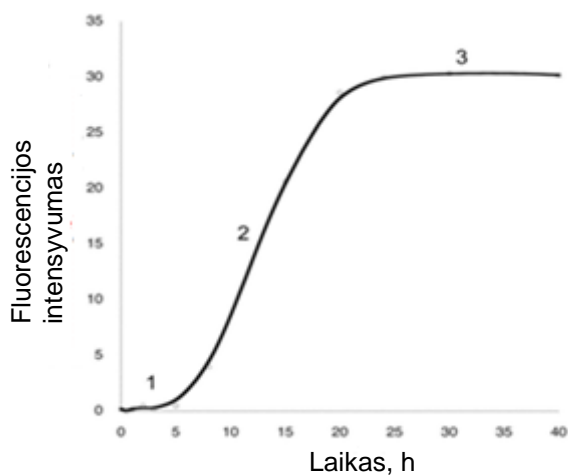


1.1 pav. Prionų kamienu replikacija ir perdavimas. *A* – prionų replikacija vyksta monomerams prisijungiant prie PrP^{Sc} polimerų (paveikslėlyje – kamienu), kurie skyla autokatalitiniu būdu ir suformuoja daugiau panašių agregatų. *B* – skirtingi kamienai, inokuliuoti vienos linijos pelėms, gali skirtis inkubacijos periodais (rodyklės ilgis), neuropatologija (raudonai nuspalvinta smegenų dalis). Skirtingiems kamienams būdingas proteolizės fragmentų pasiskirstymas pavaizduotas *Western blot* diagramose. *C* – kamieno savybės išlieka perduodant patogeninį baltymą įvairių rūšių individams. Pritaikyta iš (Collinge ir Clarke, 2007).

1.1.4 Rekombinantinių prioninių baltymų tyrimai

Baltymų agregacija yra svarbus gamtoje reiškinys, pavyzdžiui, baltymas aktinas ir fermentas glutamato dehidrogenazė savo funkcijas atlieka agregatų pavidale, o vorų šilkas neatliktų savo pagrindinės funkcijos be amiloidinems fibrilėms būdingo stabilumo (Morris et al., 2008; Marshall et al., 2009). Tačiau daugelio baltymų agregacija yra nepageidaujama, nes sukelia ligas. Priono baltymai yra vieni iš jų (šalia amiloidų β , poliglutamino) (Morris et al., 2008).

Tam, kad būtų galima įrodyti prionų baltyminių infektyvumą, pasitelkiami įvairūs būdai PrP patogeninei konformacijai *in vitro* gauti. Įvairiais metodais gautų rekombinantinių fibrilių struktūra yra panaši, tačiau savybės nėra visiškai identiškos *in vivo* priono baltymams, t. y., daugeliu atveju pagaminti patogeniniai rPrP turi didelį β antrinių struktūrų kiekį ir geba replikuotis esant natyviems PrP monomerams, tačiau jų infektyvumas būna mažas, o proteinazei



1.2 pav. Fibrilių susidarymo tyrimas stebint tioflavino T fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo laiko (schematinė iliustracija). Čia 1 – lag fazė, atitinkanti lėtą branduolių formavimąsi, 2 – fibrilių ilgėjimas, 3 – stabilizavimasis. Pritaikyta iš (Marshall et al., 2009).

K atspari šerdis būna daug trumpesnė. Paprastai amiloidinės fibrilės susiformuoja esant nedidelėms denatūrėtų koncentracijoms – tokiais sąlygomis natyvus baltymas yra iš dalies išsisukęs. Vienas iš galimų patogeninių PrP struktūros replikacijos mechanizmų yra amiloidinių fibrilių ilgėjimas, tad galima tirti, kaip susidaro rPrP fibrilės skirtingomis sąlygomis (t. y., esant skirtingai temperatūrai ir denatūrėtų koncentracijoms) (Milto et al., 2014). Tuo tikslu pasigaminama sėkla, t. y., padidinama fibrilių galų koncentracija.

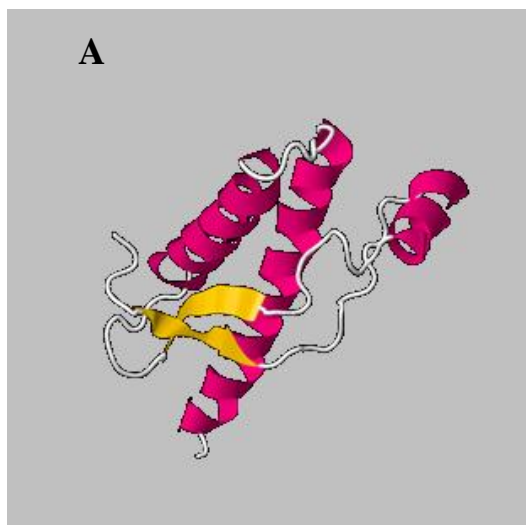
PrP fibrilių susidarymą apibūdina klasikinė sigmoidinė kreivė (1.2 pav).

Pirmiausia *de novo* susidaro amiloidinės dalelės (pradinių branduolių susidarymas) (1.2 pav. 1)); prisijungiant baltymo molekulėms, fibrilės ilgėja (1.1 pav. A) (1.2 pav. 2) ir galiausiai stabilizuojasi (1.2 pav. 3). Stebint fibrilių susidarymo kinetiką svarbu įvertinti ir galimą agregatų skilimą, kurio metu susidaro daugiau aktyvių fibrilių (antrinis branduolių susidarymas) (Marshall et al., 2009).

1.1.5 Rekombinantinis bPrP23-230

Jaučio prioninis baltymas (bPrP23-230) yra konservatyvus glikoproteinas, nuolat ekspresuojamas galvijų smegenyse, ypač nervinių ląstelių paviršiuje (Collinge, 1997). Jis sudarytas iš 219 aminorūgščių ir susideda iš dviejų domenų (Stahl et al., 1987): N-galinis domenas yra netvarkingas ir turi 5 pasikartojančius oktapeptido (PHGGGWGQ) motyvus, kurie suriša metalų jonus (pavyzdžiui, Cu^{2+}) ir polianijonus (Surewicz ir Apostol, 2011), o C-galinis domenas (bPrP 121-230) susideda iš trijų ilgų α spiralių (1.3 pav. A) (apima 144-154, 173-194 ir

200-226 pakaitus) ir trumpos antilygiagrečiai išsidėsčiusios β struktūros (apima pakaitus 128-131 ir 161-164). Skaičiai 23-230 parodo aminorūgščių seką pagal žmogaus prioninį baltymą. Skirtingai nuo bPrP^c, rekombinantinis baltymas nėra glikozilintas ties dviem asparagino aminorūgšties pakaitais (181Asn ir 197Asn), neturi glikozilfosfatidilinozitolio (GPI) inkaro, taip pat nesudaro disulfidinio ryšio, jungiančio 2-ą ir 3-ią α spirales (1.3 A pav.) (Jain ir Udgaonkar, 2011; Lopez-Garcia et al., 2000).



B

```
>1DX0:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
KKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGWGQPH
GGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWG
QGGTHGQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYML
GSAMSRPLIHFGSDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPVDQYSN
QNNFVHDCVNITVKEHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQ
MCITQYQRESQAYYQRGA
```

1.3 pav. A – tretinė bPrP23-230 struktūra. Čia rožine spalva pažymėtos trys α spiralės, geltona – dvi antilygiagrečiai išsidėsčiusios β struktūros. B – bPrP23-230 aminorūgščių seka FASTA formatu (pritaikyta iš *RCSB Protein Data Bank*: 1DX0).

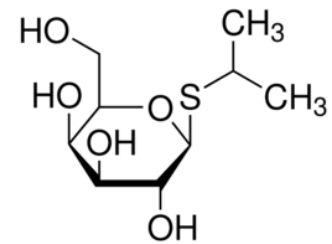
1.2 Rekombinantinių baltymų gamyba

1.2.1 *E. coli* kaip ekspresijos sistema

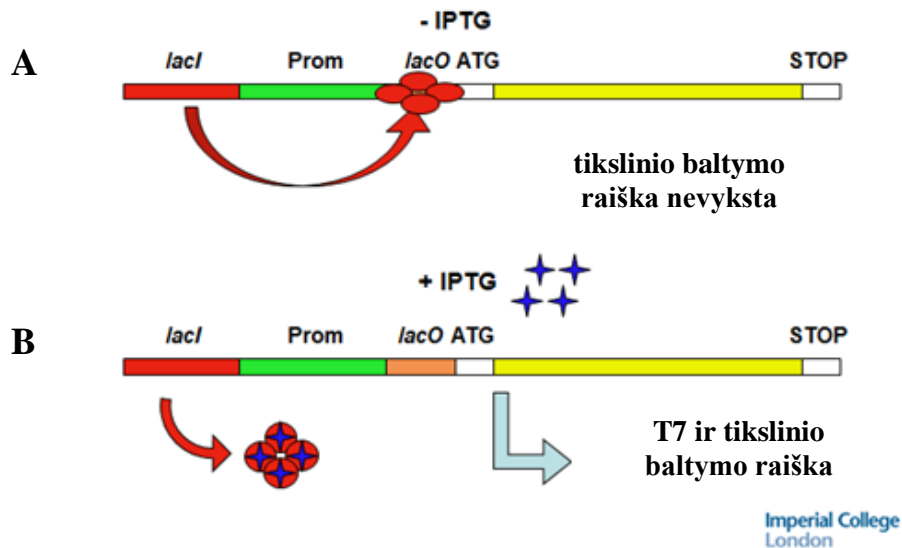
Patogiausia rPrP ekspresijos sistema yra gramneigiama enterobakterija *Escherichia coli*. Ir ne veltui – jos genomus puikiai ištirtas, yra daug galimų klonavimo vektorių, ląstelės geba greitai daugintis, jas paprasta ir nebrangu auginti, gaunamos didelės ekspresuojamų baltymų išeigos (Li et al., 2011). Kita vertus, dominantys rekombinantiniai baltymai tokia šeimininke susisuka netinkamai, susidaro neaktyvūs agregatai, kurie yra netirpūs ir jautrūs proteazėms (Völkel et al., 1998), pavyzdžiui, rPrP daugiausia ekspresuojamas intarpinių kūnelių pavidalu. Be to, *E. coli* ląstelėse baltymai nėra sekretuojami į terpę, nesusiformuoja disulfidiniai ryšiai, nevykdomos kai kurios potransliacinės modifikacijos (pavyzdžiui, GPI inkaro bei dviejų glikozilo fragmentų prijungimas) (Macrides, 1996). Šios problemos sprendžiamos tokiais būdais: rPrP renatūruojami iš intarpinių kūnelių, disulfidiniai tilteliai atstatomi gryninimo metu. Hornemann su kolegomis palygino iš sveikų jaučių smegenų išskirtus ir be detergentų išgrynintus natyvios ląstelinės

formos bPrP su rbPrP, ekspresuotu *E. coli* ląstelėse. ¹H-BMR spektroskopijos ir apskritiminio dichroizmo metodais jie parodė, kad natūralaus glikoproteino ir rekombinantinio polipeptido 3D struktūros ir termostabilumai yra iš esmės identiški (Hornemann et al., 2004). Taigi rPrP naudojimas eksperimentuose *in vitro* yra tinkamas, o rezultatai patikimi.

Iš visų *E. coli* ekspresijos sistemų populiariausia yra T7 RNR polimerazės sistema. T7 RNR polimerazę kontroliuoja *lac* operonas (Li et al., 2011), kurį sudaro trys struktūriniai genai: *lacZ*⁺ (β-galaktozidazės), *lacY*⁺ (β-galaktozidpermeazės) ir *lacA*⁺ (β-galaktozidtransacetilazės). Prieš juos yra valdančioji operono dalis: operatorius, promotorius ir cAMP jungimosi vieta. Transkripcija priklauso nuo induktoriaus ir geno reguliatoriaus *lacI*, kuris koduoja baltymą represorių. Dažniausiai baltymo indukcija LB terpėje inicijuojama pridėjus IPTG (1.4 pav.), į alolaktozę struktūriškai panašaus nemetabolizuojamo junginio (Rančelis, 2000; Walls ir Loughran, 2011). IPTG veikimo schema pateikta 1.5 paveikslėlyje. Jei terpėje nėra galaktozidų, kurie inicijuotų baltymo sintezę, tai represorius prisijungia prie operatoriaus ir mRNR sintezė nutrūksta (neigiama reguliacija) (1.5 pav. A). Induktoriais gali būti tik tokie galaktozidai, kurie suriša *lac* represorių ir keičia jo erdvinę struktūrą; tuomet represorius negali sąveikauti su *lac* operatoriumi ir vyksta mRNR sintezė (teigiama reguliacija) (1.5 pav. B).



1.4 pav. IPTG struktūrinė formulė.

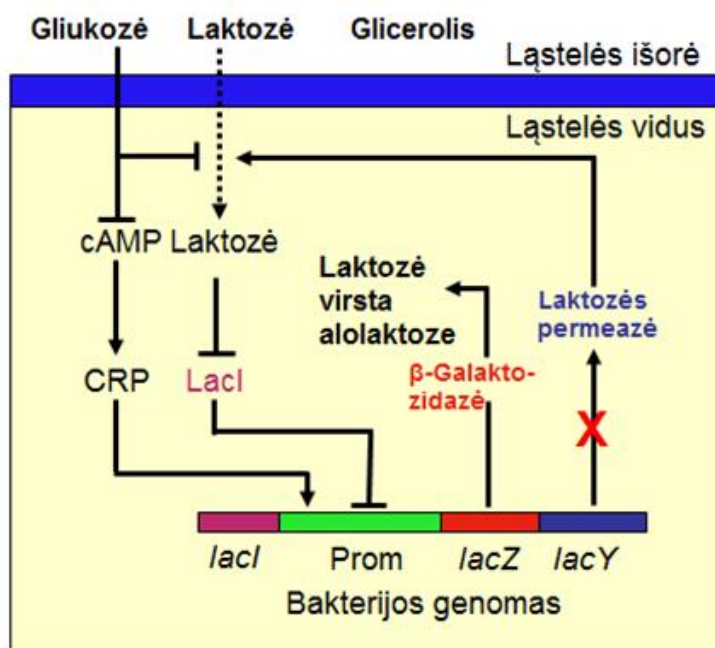


1.5 pav. Induktoriaus IPTG veikimo schema. *A* – baltymas represorius, kurį koduoja *lacI* genas, prisijungia prie operatoriaus ir slopina mRNR sintezę. *B* – IPTG suriša represorių (*lacI* produktą), tokiu būdu T7 RNR polimerazė gali nekludoma nurašyti genus. Pritaikyta iš (Sweeney, 2007).

1.2.2 Auto-indukcinė mitybinė terpė

Tyrinėdamas T7 RNR polimerazės sistemos bakterijų kamienų genų raiškos indukciją, augimą ir stabilumą, amerikiečių mokslininkas Studier 2005 metais apibendrinio ankstesnių tyrinėtojų pastebėjimus apie nenumatytai indukuotą baltymų ekspresiją kompleksinėje mitybinėje terpėje, ir išvystė naują bei patikimą auto-indukcijos koncepciją. Jos pagrindas yra auto-induktyvios mitybinės terpės komponentai, kurie metabolizuojami skirtingu laiku. Priešingai tradiciniam indukcijos IPTG metodui, auto-indukcijos būdu pirmiausia skatinamas biomasės augimas (jo nebūtina kontroliuoti), po to baltymų raiška yra inicijuojama automatiškai (taip pat kaip ir su IPTG – nuo *lac* promotoriaus), o tikslo baltymo išėiga paprastai būna net kelis kartus didesnė (Studier, 2005; Sweeney, 2007). Studier savo darbe pristatė, kokie terpės komponentai yra būtini auto-indukcijai (2.1 lentelė). Žinoma, dabar yra keletas kompleksinių auto-indukcinių terpių, kurias galima įsigyti (pavyzdžiui, „Overnight Express™ Autoinduction System“ (Novagen) ir „MagicMedia™“ (Invitrogen), kurių sudėtis nėra atskleidžiama, be to, jos naudojamos dideliems baltymų kiekiams gauti (Li et al., 2011), bet originalią Studier apibūdintą terpę (ZYM-5052) nesunku pasigaminti, o komponentai nėra brangūs, tad šio mokslininko pasiūlytą metodiką didesnei rekombinantinių baltymų ekspresijai gauti pritaikėme mūsų laboratorijoje.

Kai yra pakankamai anglies šaltinio gliukozės, CRP baltymas (angl. *cAMP receptor protein*), kuris suriša cAMP, teigiamai reguliuoja *lac* operono ekspresiją. Kai gliukozės trūksta, naudojamas alternatyvus anglies šaltinis (pavyzdžiui, laktozė); tuomet adenilato ciklazė sąveikauja su fosfotransferazinės sistemos komponentais ir padidėja cAMP koncentracija, o šis atlieka viduląstelinės signalinės molekulės vaidmenį. cAMP susiriša su CRP ir susidaro dimeras; pasikeitus dimero konformacijai, šis gali prisijungti prie DNR. Tai padidina transkripciją net 50 kartų, nes padeda formuotis stabiliam transkripcijos pradėties kompleksui (RNR polimerazė ir abi DNR grandinės) (1.6 pav.) (Michal ir Schomburg, 2012).



1.6 pav. Auto-indukcijos veikimo principas. Čia gliukozė – ankstyvasis energijos šaltinis, taip pat represorius; glicerolis ir laktozė – vėlyvieji energijos šaltiniai. Pritaikyta iš (Sweeney, 2007).

Toliau, remiantis Studier, trumpai aprašoma kompleksinės mitybinės terpės ZYM-5052 komponentų svarba.

- Kazeino hidrolizatas ir mielių ekstraktas naudojami kaip augimui reikalingos maistinės medžiagos, tinkančios įvairiems *E. coli* bakterijų kamienams. Kultūros auga 2-3 kartus greičiau nei įprastoje mineralinių druskų terpėje su gliukoze kaip vieninteliu anglies šaltiniu, taip pat padidėja tikslinio baltymo raiška.
- Fosfatai (Na_2HPO_4 ir KH_2PO_4) atlieka buferinio tirpalo vaidmenį, taip pat tai natrio, kalio bei fosfato jonų šaltinis.

- Magnio jonų dėka ląstelių kultūros auga sparčiau, be to, esant 2 mM magnio jonų koncentracijai stebimas efektyvus ląstelių augimas bei gyvybingumas.
- Gliukozė, glicerolis ir laktozė – anglies šaltiniai. Gliukozė yra pradinis energijos šaltinis: ją vartojant didėja ląstelių augimo greitis, tačiau dideli jos kiekiai slopina indukciją laktoze. Tuo metu glicerolis neslopina, todėl tinka tiek apibrėžtai, tiek kompleksinei auto-indukcinei terpei ir yra vėlesnis energijos šaltinis. Laktozė pradedama naudoti tik ląstelėms suvartojus gliukozę.
- Azoto šaltinis – NH_4Cl .

Išbandęs įvairias gliukozės, glicerolio ir laktozės kiekių kombinacijas, Studier teigia, kad standartinis 5052 mišinys (0,5 % glicerolio, 0,05 % gliukozės ir 0,2 % laktozės) yra tinkamiausias įvairių baltymų (tarp jų – ir rekombinantinių) indukcijai (Studier, 2005).

1.2.3 Intarpiniai kūneliai ir baltymų renatūracija iš jų

Intarpiniai kūneliai (toliau – IB, angl. *inclusion bodies*) susidaro dėl ženkliai padidėjusios baltymo raiškos bei jo agregacijos (Fink, 1998) ir yra ekspresuojami bakterijų citoplazmoje. Paprastai tai tankios ir didelės, rutulio ar cilindro formos dalelės (0,2-1,2 μm dydžio), kurių sankaupų didžiąją dalį (80-95%) sudaro ekspresuojamas tikslinis baltymas (Ramon et al., 2014). Nors IB paprastai yra labai homogeniški, renatūracija dažnai yra sudėtinga (Fink, 1998). Pirmiausia ląstelės yra suardomos – biomasė išmaišoma denatūruojančiame buferiniame tirpale ir homogenizuojama. Būtina pilnai suardyti ląsteles, nes nesuardytos ląstelės ar didelės jų nuolaužos nusėda kartu su IB ir užteršia juos (Lilie et al., 1998). Ardant ląsteles išsiskiria daug šilumos ir proceso metu baltymai gali sulipti (agreguotis); siekiant to išvengti, homogenizavimo procedūros atliekamos greitai ir esant 0-4 °C temperatūrai (Bagdonienė et al., 2006).

IB tirpinimui naudojami didelės koncentracijos denatūrantų tirpalai, pavyzdžiui, 5-8 M GdnHCl arba 6-8 M karbamidas; šie ardo antrinę baltymo struktūrą (Fischer et al., 1993). IB tirpinimą apsunkina cisteino aminorūgščių turintys baltymai, nes jie sudaro netaisyklingus tarpmolekulinius ir vidumolekulinius disulfidinius tiltelius. Šiems tilteliams suardyti reikia naudoti tokį renatūracijos buferinį tirpalą, kurio redukcijos-oksidacijos potencialas leistų susiformuoti taisyklingiems disulfidams, tad paprastai naudojami mažos molekulinės masės tioliniai reagentai (Lilie et al., 1998), pavyzdžiui, glutationas. Kad susidarytų tiolato anijonai, renatūracija vykdoma silpnai šarminėje terpėje (pH 8-9) (Middelberg, 2002).

1.2.4 Afininė chromatografija naudojant imobilizuotus metalo jonus (IMAC)

Afininė, arba giminingumo, chromatografija – tai skysčių chromatografijos būdas, pagrįstas biospecifine, grįžtama sąveika tarp biologiškai aktyvių arba erdviškai unikalių molekulių su kitomis komplementariomis molekulėmis; tarp stacionarios fazės imobilizuoto ligando ir skystos judriosios fazės nusistovi pusiausvyra (Sasnauskienė, 2008). Kadangi histidininė uodega yra toli nuo baltymo struktūrinio domeno ir todėl netrukdo jo tretinei struktūrai susidaryti, rekombinantinis baltymas su šia žyme gali būti išgrynintas ir renatūruojamas imobilizuotų metalų jonų afininės chromatografijos būdu (toliau – IMAC) denatūruojančiomis sąlygomis ir čia pat renatūruojamas. Histidinui būdinga stipriausia sąveika su imobilizuotų metalų jonų matricomis, nes šios aminorūgštis imidazolo žiedo elektronų donorinė grupė greitai suformuoja koordinacinius ryšius su imobilizuotais pereinamųjų metalų jonais (tokiais kaip Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) ir sudaro patvarų kompleksą su ligandais netgi esant didelei denatūrantų koncentracijai (Walls ir Loughran, 2011).

Dėl stiprios sąveikos metodas puikiai tinka baltymų atskyrimui atlikti, tačiau būtina atsižvelgti į sąveikos stabilumą, nes pagal tai parenkamos renatūracijos sąlygos (Middelberg, 2002; Block et al., 2009). Chelatoriais, kurie suriša metalų jonus su agaroze, naudojami iminodiacto rūgštis, trikarboksimetiletilelendiaminas arba nitrilotriacto rūgštis (Block et al., 2009), bet yra ir kitų prijungimo būdų, kurių firmos neatskleidžia.

Denatūruotas baltymas, kuris turi šešių His seką, adsorbuojamas ant metalo chelatinio sorbento, renatūruojamas kolonėlėje mažinant denatūrantų koncentraciją ir po renatūracijos desorbuojamas imidazolo tirpalu (Lilie et al., 1998). Renatūracijos metu iš baltymo tirpalo pašalinamas denatūrantas (tada iš naujo susidaro vandeniliniai ryšiai ir baltymas gali vėl įgyti natyvią struktūrą), imidazolas pakeičia baltymo histidininę uodegą, sąveikaujančią su chelatuotais metalo jonais, ir baltymas atpalaiduojamas (Middelberg, 2002; Block et al., 2009).

1.2.5 Histidininė uodega ir jos kirpimas

Histidininės uodegos panaudojimas yra labiausiai paplitusi strategija, taikoma rekombinantinių baltymų gryninime. Trumpai polihistidino uodegai prie baltymo N ar C galo pridėti pasitelkiami rekombinantinės DNR metodai. Dažniausiai sutinkama histidininės uodegos žymė susideda iš 6 nuosekliai išsidėsčiusių histidino aminorūgštis pakaitų, kurių kiekvienas gali sudaryti koordinacinį ryšį su metalu ir pastumia pusiausvyrą į asociacijos pusę, kas lemia stabilesnį surišimą. Ši prijungta žymė yra maža (0,84 kDa), esant pH 8 – nejonizuota, tačiau vis dėlto gali turėti įtakos ekspresijai, baltymo 3D struktūrai ar net tirpumui, taip pat lemia gebėjimą

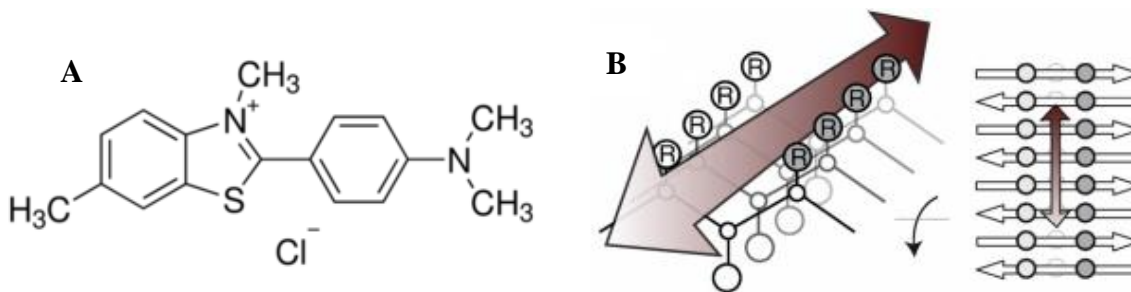
prisijungti prie IMAC ligandų. Polihistidino uodegai pašalinti naudojamas įvairios proteazės, pavyzdžiui, trombinas (EC 3.4.21.5). Tai serino proteazė, kuri atpažįsta Leu–Val–Pro–Arg–Gly–Ser aminorūgščių seką ir selektyviai kerpa Arg–Gly ryšį (Block et al., 2009; Walls ir Loughran, 2011). Kaip efektyviai trombinas nukirpo histidininę uodegą nuo baltymo, patikrinama pasitelkus masių spektrometrijos analizę arba atliekant elektroforezę natrio dodecilsulfato poliakrilamidiniame gelyje.

1.2.6 Jonų mainų chromatografija

Jonų mainų chromatografija yra mišinių frakcionavimas, pagrįstas elektrostatine (jonine) sąveika tarp baltymų ir nejudriosios fazės (t. y., sorbento) jonizuotų grupių. Konkretaus baltymo jonizuotų grupių disociacijos konstanta priklauso nuo baltymo erdvinės struktūros bei jonogeninių grupių apsupties, o sąveiką su jonitais apibrėžia neigiamų ir teigiamų krūvių skaičius (Sasnauskienė, 2008). Renkantis sorbentą, atsižvelgiama į baltymo molekulinę masę, jo izoelektrinį tašką (pI) bei pH intervalą, kuriame baltymas yra stabilus. Dažniausiai naudojami sorbentai yra celiuliozės dariniai – karboksimetilceliuliozė (katijonitas) arba dietilaminoetilceliuliozė (anijonitas). Šiame darbe naudojama CM-sefarozė, kuri yra silpnai rūgštinis katijonitas, nes turi neigiamai įkrautą karboksimetil funkcinę grupę (CH_2COO^-). Baltymo eliacijai parenkami buferiai, kurių pH artimas chromatografuojamo mišinio izoelektriniam taškui. Eliaciją galima vykdyti keičiant buferinio tirpalo pH arba joninę jėgą (Bagdonienė et al., 2006; Sasnauskienė, 2008).

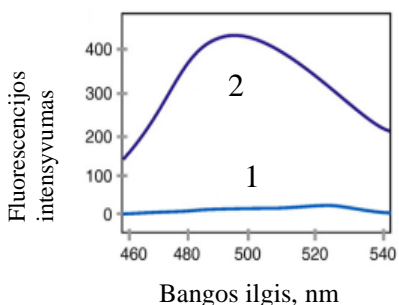
1.3 Fluorescencinė analizė

ThT fluorescencinė analizė. Pastangos aptikti, diagnozuoti ir analizuoti amiloidinių fibrilių struktūrinės savybes bei kinetiką leido sukurti platų spektrą joms savitų molekulinų žymių, tačiau tioflavinas T (ThT) (1.7 pav. A) yra dažniausiai naudojamas (Hudson et al., 2009; Biancalana ir Koide, 2010). Tai benzotiazolo dažas, naudojamas baltymų agregacijos tyrimuose kaip fluorescuojanti molekulinė žymė (Hudson et al., 2009).



1.7 pav. A – Tioflavino T cheminė struktūra. Dažas turi hidrofobinę dalį, čia dimetilamino grupė yra prijungta prie fenilo grupės, kitame gale yra labiau polinė benzotiazolo grupė su poliniais S ir N atomais. Tokia polinio ir hidrofobinio regiono kombinacija leidžia tioflavino T molekulėms vandeniniuose tirpaluose prisijungti prie amiloidinių fibrilių. **B** – ThT prisijungimo prie fibrilių β struktūrų „kanalo“ modelis. ThT jungiasi išilgai šoninių grandinių. Pritaikyta iš (Biancalana ir Koide, 2010).

Manoma, kad fluorescencijos intensyvumo padidėjimas yra selektyvios ThT imobilizacijos



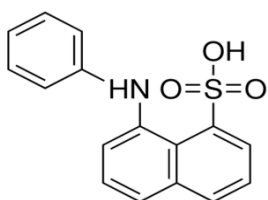
1.8 pav. Fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo bangos ilgio ThT neprisijungus prie fibrilių (1 kreivė) ir prisijungus (2 kreivė). Pritaikyta iš (Biancalana ir Koide, 2010).

pasekmė. ThT elgiasi kaip molekulinis rotorius: tirpale žemas energijos barjeras leidžia benzilamino ir benzotiazolo žiedams laisvai sukintis apie jų bendrą C-C ryšį. Toks sukimasis „gesina“ sužadintas būsenas, ir tai lemia nedidelę ThT fluorescencijos emisiją. Susidariusios amiloidinės fibrilės „sukuria“ ThT surišimo vietą; ThT imobilizacija užfiksuoja sužadintą būseną, o tai lemia fluorescencijos intensyvumo padidėjimą (Biancalana ir Koide, 2010).

Nors ThT – populiarus dažas, jo veikimo principas dar nėra iki galo aiškus. Žinoma, yra keletas modelių, kuriais galima apibūdinti molekulinį mechanizmą. Šiuo metu pasikliaunama „kanalo“ modeliu (1.7 pav. B) (Biancalana ir Koide, 2010). Prionai turi didelį β struktūrų, kurios išsidėsto savitai, kiekį, tad manoma, kad ThT jungiasi būtent fibrilių β struktūrų paviršiuje (kaip keičiasi fluorescencijos intensyvumas

prisijungus, pavaizduota 1.8 pav.). Fibrilių šoninės grandinės išsidėsto statmenai β klostėms, o lygiagrečios šoninių grandinių eilės susidaro nepaisant peptido sekos. Taip suformuojamas kanalo formos motyvas, kuris yra nukreiptas į fibrilės išorę ir suformuoja griovelį, kuriame gali prisijungti ThT. Toks modelis, žinoma, puikiai paaiškina, kodėl ThT gali jungtis prie skirtingų fibrilių, nes jis atpažįsta daugeliui fibrilių bendrą struktūrą (Biancalana ir Koide, 2010).

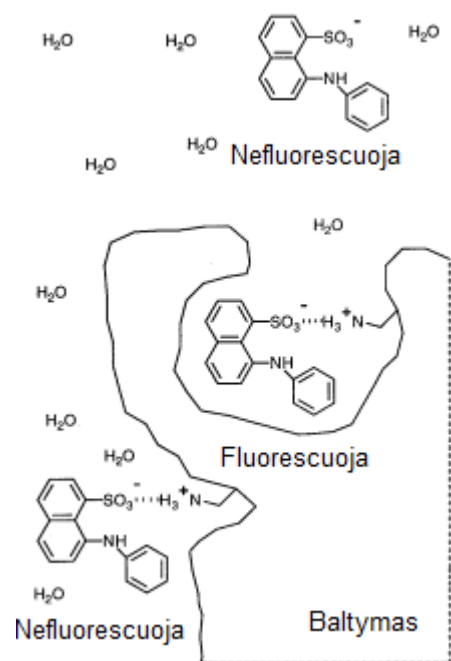
ANS fluorescencinė analizė. ANS anijonas (1.9 pav.) yra dažnai naudojama baltymų ir



1.9 pav. ANS struktūrinė formulė.

membranų „hidrofobinė žymė“. Ilgą laiką manyta, kad ANS jungiasi prie hidrofobinio baltymo paviršiaus per nepolinę anilinonaftaleno grupę. Tačiau ANS yra stiprus anijonas, o jo sulfoninė grupė sudaro joninius ryšius su tirpių baltymų katijoninėmis grupėmis. Kai dažas patenka prie baltymo paviršiaus aminorūgščių hidrofobinių fragmentų (pavyzdžiui, baltymo hidrofobinėse kišenėse), keičiasi jo fluorescencijos intensyvumas; tokie pokyčiai keliant temperatūrą atspindi baltymo denatūracijos kreivę. Baltymas išsivynioja, ir ANS anijonas suformuoja joninius ryšius su katijonais šalia atsiveriančių baltymo hidrofobinių sričių. Tokiu būdu fluorescencija didėja, o pasiekus tam tikrą temperatūrą pradeda mažėti. ANS prisijungimo prie baltymo būdai pavaizduoti 1.10 paveikslėlyje. Temperatūra, kai natyvaus ir išsivyniojusio baltymo koncentracijos lygios, vadinama baltymo lydymosi temperatūra (toliau – T_m). Neigiamą krūvį kompensuoja protonai iš vandens, tokiu būdu laisvi hidroksido anijonai lemia pH reikšmės pokytį. Be to, ANS puikiai fluorescuoja tokiuose tirpikliuose kaip izopropanolis, tačiau visiškai ne fluorescuoja vandenyje (Matulis et al., 1999).

membranų „hidrofobinė žymė“. Ilgą laiką manyta, kad ANS jungiasi prie hidrofobinio baltymo paviršiaus per nepolinę anilinonaftaleno grupę. Tačiau ANS yra stiprus anijonas, o jo sulfoninė grupė sudaro joninius ryšius su tirpių



1.10 pav. ANS prisijungimo prie baltymo būdai. Kai ANS anijono aminonaftaleno grupė nesąveikauja su vandeniu, tada ANS fluorescuoja. Kai aminonaftaleno grupė sąveikauja su vandens molekulėms, ANS anijonai ne fluorescuoja. Visi ANS anijonai su baltymu jungiasi joniniais ryšiais. Pritaikyta iš (Matulis ir Lovrien, 1998).

2 Medžiagos ir metodai

2.1 Naudoti reagentai, laboratoriniai įrenginiai, terpės, buferiniai tirpalai

2.1.1 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 „ÄKTApurifier” (GE Healthcare);
- chromatografinė kolonėlė „XK26/20” (GE Healthcare) (aukštis – 20 cm, skersmuo – 26 mm);
- dializės žarnos: 32 ir 50 mm diametro „Zella Trans Roth” (pralaidumas – 6-8 kDa);
- elektroforezės sistema „Minigel-Twin” (Biometra), sudaryta iš „BioRad Mini Protean 3” elektroforezės aparato ir „CONSORT EV 243” srovės šaltinio;
- elektroninis mikroskopas „Morgagni 268” (FEI);
- filtravimo indeliai „Millipore Stericup” (filtravimo popierėlio porų dydis – 0,22 µl);
- kaitinimo plytelė „ИСКОПКА”;
- 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);
- poliakrilamidinio gelio elektroforezės aparatas „Biometra PS 300T” ir jo priedai;
- purtyklė „KS 4000i” (IKA);
- rankinis homogenizatorius „Potter-Elvehjem” (Sigma-Aldrich);
- realaus laiko PGR analizatorius „Rotor-Gene Q real-time analyzer” (QIAGEN);
- refraktometras „RL3” (PZO);
- sorbentai: „Ni Sepharose™ 6 Fast Flow”; „CM Sepharose Fast Flow” (GE Healthcare).
- spektrofotometrai: „ALPHA FT-IR”; „UV-1800” (Schimadzu); „Varian Cary Eclipse”;
- spektropoliarimetras „Jasco J-815 CD Spectrometer”;
- švirkštinis filtras (diametras – 30 mm, porų dydis - 0,22 µm);

- 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”;

2.1.2 Reagentai

- Acros Organics: glicerolis, HCl, NaOH, APS;
- AppliChem: glicinas, NDS, TRIS;
- Carl Roth: akrilamidas, ampicilinas, GdnHCl 98 %, GdnHCl 99,7%, KCl, KH₂PO₄, K₂HPO₄;
- Fisher Scientific: glutationas, imidazolas, IPTG, kazeino hidrolizatas, gliukozė, mielių ekstraktas, trombinas, TRIS, natrio fosfatai, karbamidas, bis-akrilamidas, laktozė, TEMED, guanidino tiocianatas, molekulinės masės žymuo „Ez-Run Rec ladder”, dažas elektroforezės geliams dažyti „Ez-Run Protein Gel Staining Solution”;
- Fluka: bromfenolio mėlis;
- Invitrogen: D-gliukozė;
- MERCK: natrio chloridas.
- SERVA: 2-merkaptoetanolis;
- Sigma-Aldrich: ANS, ThT, uranilo acetatas.

2.1.3 Naudotos terpės ir buferiniai tirpalai

Terpės:

- **S.O.C. mitybinė terpė.** Vienam litrui terpės reikia: 20 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, 10 ml 1 M MgCl₂, 10 ml 1 M MgSO₄, 20 mM gliukozės ir dejonizuoto vandens, kad galutinis tūris būtų 1 l. Paruošta terpė autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje. Atšaldžius pridedama 20 ml 1 M gliukozės, kuri prieš tai filtruojama 0,2 μm polivinilidino difluorido filtru; išpilstoma nedideliais tūriais ir laikoma -20 °C temperatūroje.
- **Skysta LB (*Luria/Miller*) mitybinė terpė.** 25 g terpės (miltelių pavidalu) ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens;

- **Auto-induktyvi mitybinė terpė ZYM-5052.** Ruošiamos 4 kolbos su 400 ml auto-induktyvios mitybinės terpės. Komponentai tirpinami dejonizuotame vandenyje; autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje.

2.1 lentelė. Auto-induktyvios mitybinės terpės komponentai.

Eil. nr.	Auto-induktyvios mitybinės terpės ZYM-5052 sudėtis:	Medžiagų kiekiai 1,6 litrai terpės paruošti:
1.	Kazeino hidrolizatas (1 %)	16,00 g
2.	Mielių ekstraktas (0,5 %)	8,00 g
3.	25 mM Na ₂ HPO ₄	5,68 g
4.	25 mM KH ₂ PO ₄	5,44 g
5.	50 mM NH ₄ Cl	4,28 g
6.	5 mM Na ₂ SO ₄	1,12 g
7.	2 mM MgSO ₄	0,78 g
8.	0,5 % glicerolis	8,00 g
9.	0,05 % gliukozė	0,80 g
10.	0,2 % laktozė	3,20 g
11.	100 mg/l ampicilinas	1600 µl

Buferiniai bei kiti tirpalai

- A. 10 mM TRIS, 100 mM K₂HPO₄ (pH 8).** Sumaišoma 10 ml 1M TRIS ir 100 ml 1 M K₂HPO₄, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 800 ml; jei reikia, tirpalo pH koreguojamas HCl tirpalu ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1000 ml. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio filtrą.
- B. 50 mM imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM K₂HPO₄ (pH 8).** 10 ml 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 ml 1 M K₂HPO₄ tirpalo, 3,4 g imidazolo ištirpinama 800 ml dejonizuoto vandens; jei reikia, tirpalo pH koreguojamas HCl tirpalu ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1000 ml. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio filtrą.
- C. 700 mM imidazolo, 10 mM TRIS, 100mM KH₂PO₄ (pH 5,8).** 10 ml 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 ml 1M KH₂PO₄ tirpalo, 47,66 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu

vandeniui iki 800 ml; jei reikia, tirpalo pH koreguojamas HCl tirpalu ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1000 ml. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio filtrą.

- D. 6 M GdnHCl, 10 mM TRIS, 100 mM KH₂PO₄, 10 mM glutationo (pH 8).** 402,3 g guanidino chlorido užpilama 7 ml 1 M TRIS ir 70 ml 1M KH₂PO₄ tirpalo bei pakankamas kiekis dejonizuoto vandens (bendras tirpalo tūris ~ 650 ml) ir maišant ant magnetinės maišyklės laukiama, kol ištirps GdnHCl. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio filtrą. 2,15 g glutationo įdedama prieš pat naudojimą. Tirpalo pH koreguojamas su 1 M NaOH ir 0,5 M HCl iki 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 700 ml. Tirpalas su glutationu turi būti laikomas šaltai (ledo vonelėje).
- E. 10 mM fosfatinis buferinis tirpalas (pH 5,8).** 36,8 ml 1 M KH₂PO₄ sumaišoma su 3,2 ml K₂HPO₄, skiedžiama vandeniu iki 3500 ml; jei reikia, pH koreguojamas NaOH ar HCl iki 5,8. Galutinis tūris – 4000 ml.
- F. 2 M NaCl, 10 mM PO₄³⁻ (pH 5,8).** 9,2 ml 1 M KH₂PO₄ sumaišoma su 0,8 ml K₂HPO₄, pridedama 116,88 g NaCl, skiedžiama vandeniu iki 900 ml; jei reikia, tirpalo pH koreguojamas NaOH ar HCl tirpalu iki 5,8 ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1000 ml. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio filtrą.
- G. 10 mM acetatinis buferis (pH 4).** 30 ml 1 M CH₃COOH sumaišoma su 10 ml 1 M CH₃COONa, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki ~3800 ml; jei reikia, pH koreguojamas iki 4 ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 4000 ml.
- H. 6 M GdnHCl, 50 mM PB (pH 6).** 1,64 ml 0,2 M Na₂HPO₄ sumaišoma su 2,17 ml 1 M NaH₂PO₄, įpilama dejonizuoto vandens, ištirpinama 28,94 g GdnHCl, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 50 ml. Nustatomas GdnHCl lūžio rodiklis (ΔN_2); tiksliai GdnHCl koncentracija apskaičiuojama pagal formulę (Nozaki, 1972):
- $$c = 57,147 (\Delta N) + 38,68 (\Delta N)^2 - 91,6 (\Delta N)^3, \quad (2.1)$$
- čia c – GdnHCl tirpalo koncentracija (M), ΔN_1 – fosfatinio buferinio tirpalo be GdnHCl lūžio rodiklis, ΔN_2 – fosfatinio buferinio tirpalo su GdnHCl lūžio rodiklis, ΔN – lūžio rodiklio pokytis ($\Delta N = \Delta N_2 - \Delta N_1$).
- I. 10x TRIS-NDS-glicino elektroforezės buferis:** 10 g NDS, 30 g TRIS, 144 g glicino ištirpinami 600 ml dejonizuoto vandens (pH 8,3-8,6 (nekoreguojamas)), ir skiedžiama iki 1 l; laikoma 4 °C temperatūroje. Prieš elektroforezę buferinis tirpalas skiedžiamas 10 kartų.

J. 6x sample buferinis tirpalas: 1,2 g NDS, 6 mg bromfenolio mēlio ištirpinami 6 ml glicerolio, pridedama 3,75 ml 1 M TRIS (pH 6,8) ir 0,93 ml 2-merkaptoetanolio; skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 10 ml.

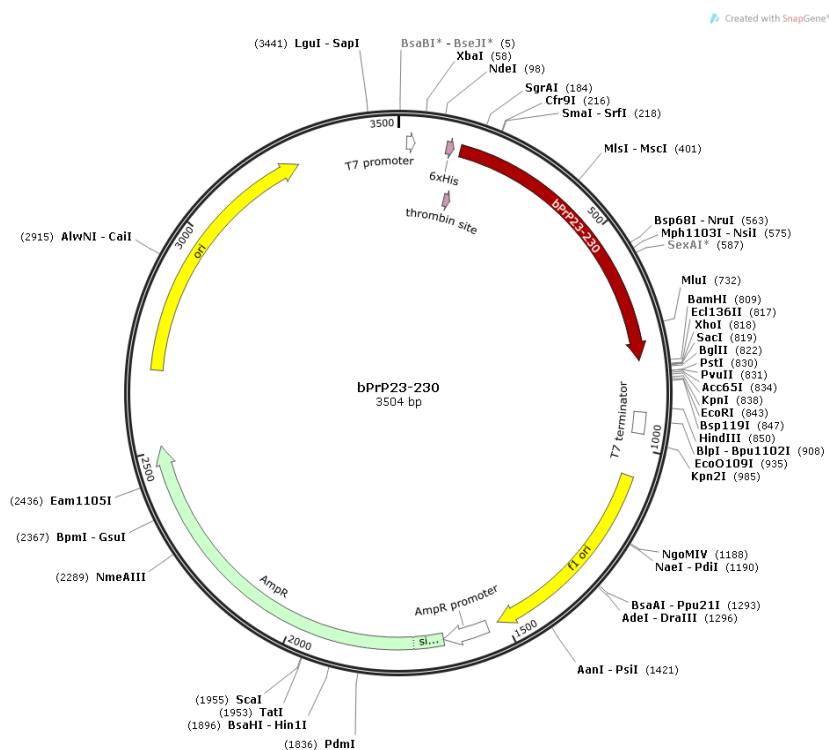
***E. coli* BL21 Star™ (DE3) bakterijų kamienas.** Šių bakterijų kamieno genotipo charakteristika tokia: *F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131*(DE3). Jis turi lizogeninį λ profagą DE3 ir T7 RNR polimerazės geną, kurį kontroliuoja *lacUV5* promotorius. Mutavęs *rne* genas (*rne131*) koduoja sutrumpintą Rnazės E fermentą, kuris neskaldo mRNR, tad šio fermento stabilumas didesnis. Kamienas įsigytas *Invitrogen*.

Plazmidė *pRSETA-6xHis-bPrP23-230(25-241)*. Plazmidės pRSET A (su įklonuotais bPrP23-230 konstruktu, šešių aminorūgšties His pakaitų seka N gale ir atsparumo ampicilinui genais) gautos iš Ciuricho Neuropatologijos instituto (Šveicarija) (Hornemann et al., 2009) (2.2 pav.)

Genetinio konstrukto N gale įterpta uodega susideda iš 15 aminorūgščių sekos (2.1 pav. pažymėta žaliai). Trombino proteazė kerpa peptidinį ryšį tarp 15 arginino ir 16 glicino aminorūgščių.

N galas					
10	20	30	40	50	60
MRGSHHHHHH	GLVPR	GSKKR	PKPGGGWNTG	GSRYPGQGSF	GGNRYPPQGG
GGWGQPHGGG					
70	80	90	100	110	120
WGQPHGGGWG	QPHGGGWGQP	HGGGWGQPHG	GGGWGQGGTH	GQWNKPSKPK	TNMKHVAGAA
130	140	150	160	170	180
AAGAVVGGGLG	GYMLGSAMSR	PLIHFGSDYE	DRYYRENMHR	YPNQVYYRPV	DQYSNQNNFV
190	200	210	220	230	
HDCVNIIVKE	HTVTTTTKGE	NFTETDIKMM	ERVVEQMCIT	QYQRESQAYY	QRGA
					(C galas)

2.1 pav. Jaučio rekombinantinio prioninio baltymo aminorūgščių seka su His uodega ir papildomais aminorūgščių pakaitais (pažymėta žaliai). Geltonai pažymėti baltymo N ir C galai.



2.2 pav. Plazmidės *pRSETA-6xHis-bPrP23-230(25-241)* genolapis (sumodeliuota pasitelkus „SnapGene Viewer” programą).

2.2 Metodai

2.2.1 Bakterijų transformacija ir tikslinio baltymo raiškos indukcija

Rekombinantinio prioninio baltymo raiškai gauti *E. coli* bakterijų BL21 Star™ (DE3) kamienas transformuojamas 1 µl genetiniu konstruktu *pRSETA-6xHis-bPrP23-230(25-241)* (2.1 pav.): į 100 µl kompetentinių ląstelių kultūros įdedama 1 µl DNR tirpalo, atsargiai sumaišoma ir inkubuojama 30 min ledo vonelėje; termostate vykdomas temperatūrinis šokas (90 s 42 °C) ir 2 min inkubuojama ledo vonelėje. Į transformacijos mišinį pridėjus 400 µl S.O.C. terpės, transformantai auginami 45 min termostatinėje purtyklėje (37 °C, 220 apm), po to centrifuguojami 2 min 6000 apm. Dalis tirpalo nusiurbiamo, ląstelės suspenduojamos likusiame supernatanto tūryje, išsėjamos ant paruoštos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe ir ampicilinu (100 µg/ml) ir inkubuojamos termostate (37 °C) ~ 16 val.

Naktinės kultūros paruošimas. Į 100 ml autoklavuotos (20 min 1 atm slėgyje) LB terpės dedama 100 µl ampicilino (100µg/ml); iš Petri lėkštelės paimta atsitiktinė transformuota *E. coli* bakterijų BL21 Star™ (DE3) kolonija auginama šioje terpeje purtyklėje per naktį (~ 16 val., 37 °C, 220 apm).

Kultūros buvo auginamos ir indukuojamos dviem būdais:

A. LB terpėje (indukuojujant IPTG). Paruošiamos 4 kolbos su 400 ml autoklavuota LB terpe, į kurias dedama 400 µl ampicilino ir perkeliama 10 ml naktinės bakterijų kultūros. Ląstelės auginamos 37 °C, 220 apm, stebimas optinis tankis (matuojama spektrofotometru, $\lambda = 600$ nm). Jam pasiekus 0,6-0,8 O. V., paimamas 300 µl ląstelių mėginys elektroforezei ir vykdoma tikslinio baltymo raiškos indukcija: į kiekvieną kolbą įdedama 400 µl 1 M IPTG, biomasė auginama 37 °C, 220 apm, 16 val.

B. Auto-indukcinėje mitybinėje terpėje. Ruošiamos 4 kolbos su 400 ml auto-induktyvios mitybinės terpės ZYM-5052; 40 ml užaugintos naktinės kultūros perkeliama į paruoštą terpę (po 10 ml į kiekvieną kolbą) ir auginama 37 °C, 220 apm, 16 val. Indukcija vyksta automatiškai, kai tik baigiasi gliukozės šaltinis.

Tiek vienu, tiek kitu atveju transformantų kultūros buvo auginamos tomis pačiomis optimaliomis *E. coli* bakterijų augimo sąlygomis (37 °C, 220 apm, pH 7). Užaugintos kultūros centrifuguojamos 20 min 6000 apm „Amicon® Ultra–15” koncentratoriuose, -4 °C temperatūroje; supernatantas nupilamas, surenkama bei pasverama biomasė.

Mėginių paruošimas elektroforezei. Mėginiuose prieš (imama 300 µl) ir po indukcijos ląstelių kiekis turi būti vienodas. Jis yra atvirkščiai proporcingas išmatuotam optiniam tankiui po indukcijos, tad ląstelių suspensijos kiekį galima apskaičiuoti pagal formulę:

$$y = \frac{x \times OT_1}{OT_2}, \quad (2.2)$$

čia x – ląstelių lizato kiekis prieš indukciją, y – ląstelių lizato kiekis po indukcijos, OT_1 – optinis tankis prieš indukciją, OT_2 – po indukcijos.

Mėginiai elektroforezei centrifuguojami 2 min 6000 apm; dekantuojuama, ant nuosėdų užpilama denatūruojančio agento (*6x sample* buferinio tirpalo), suspenduojama, kaitinama 10 min 98 °C temperatūroje. Rekombinantinio bPrP23-230 raiška patikrinama išanalizavus mėginius baltymų elektroforezės metodu (pagal 2.2.2 skyrelyje pateiktą metodiką).

2.2.2 Baltymų elektroforezė

Elektroforezė vykdoma „BioRad Mini Protean 3” elektroforezės aparatu. Skiriamąjo gelio komponentai dedami tokia eilės tvarka, kaip nurodyta 2.2 lentelėje. APS ir TEMED

sudedami prieš gelio supylimą tarp stiklinių elektroforezės plokštelių, nes pirmasis (APS) sukelia polimerizacijos reakciją, o TEMED yra reakcijos katalizatorius; gelį supylus, šis padengiamas keliais mililitrais dH₂O ir leidžiama sustingti (apie 40 min); tada vanduo nupilamas, gelio viršus nusausinamas filtriniu popierumi, o ant viršaus polimerinamas koncentruojamasis poliakrilamido gelis. Į užpiltą koncentruojamąjį gelį įstatomos „šukos“ ir vėl leidžiama sustingti (apie 30 min), o geliui sustingus, plokšteles galima įstatyti į elektroforezės aparatą. Elektroforezės aparatas užpildomas elektroforezės buferiniu tirpalu ir išimamos „šukos“, į atskirus gelio takelius perkeliama mėginiai (5 µl molekulinės masės žymens bei po 7 µl kiekvieno mėginio (prieš ir po indukcijos)). Elektroforezė vykdoma esant nekintamam elektros srovės stiprumui (30 mA), įtampa – 200 V. Dažui pasiekus skiriamąjį gelio apačią, srovė išjungžiama. Po elektroforezės gelis dažomas „Ez-Run“ elektroforezės gelių dažų purtyklėje 20 min, 80 apm, 30 °C temperatūroje, po to blukinamas dH₂O.

2.2 lentelė. Elektroforezės skiriamąjo ir koncentruojamojo gelio komponentai bei jų kiekiai geliui tarp plokštelių suformuoti.

Eilės nr.	Skiriamasis gelis (12 %)		Koncentruojamasis gelis (4 %)	
	<i>Komponentai</i>	<i>Tūris</i>	<i>Komponentai</i>	<i>Tūris</i>
1.	dH ₂ O	2,55 ml	dH ₂ O	1,27 ml
2.	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,53 ml	1 M Tris-HCl (pH 6,8)	500 µl
3.	40 % AA/BAA	1,83 ml	40 % AA/BAA	201 µl
4.	10 % NDS	61 µl	10 % NDS	20 µl
5.	10 % APS	30,5 µl	10 % APS	10 µl
6.	TEMED	3,65 µl	TEMED	2 µl

2.2.3 Renatūracija ir gryninimas giminingumo chromatografijos metodu

Biomasė, sumaišyta su buferiniu tirpalu D (santykiu 1:5), homogenizuojama „Potter-Elvehjem“ rankiniu homogenizatoriumi iki vientisos masės. Ši vėliau ardoma ultragarsu (antgalis – VS70T) tokiomis sąlygomis: 20 min, ultragarsinimo/ramybės ciklas – 60 s/60 s, amplitudė – 70 %. Ardymo metu biomasė laikoma šaltai (ledo vonelėje). Suardyta biomasė centrifuguojama 40 min 17000 apm 4 °C temperatūroje. Paimamas supernatanto mėginys NDS-PAAG elektroforezei; po to supernatantas sumaišomas su buferiniu tirpalu D nulygsvarintu sorbentu

(jame yra nikelio jonų). Mišinys lėtai maišomas 30 min 4 °C temperatūroje (inkubacijos metu His aminorūgščių molekulės koordinaciniais ryšiais prisijungia prie metalo jonų), o po to juo kraunama XK 26/20 kolona, kuri prijungiama prie gryninimo sistemos.

Kolonėlė praplaunama 100 ml buferiniu tirpalu D. Baltymas kolonėlėje renatūruojamas lėtai mažinant GdnHCl koncentraciją nuo 6 M iki 0 M (200 ml), buferiniu tirpalu A išplaunamas GdnHCl. Po 70 ml buferiniu tirpalu B eliuojami silpniau prie nikelio jonų besijungiantys baltymai; tikslinis baltymas desorbuojamas buferiniu tirpalu C (90 ml). Imidazolas sąveikauja su Ni (II) jonais ir veikia kaip konkurencinis ligandas, pakeičiantis baltymą sąveikoje su Ni (II) jonais; tokiu būdu baltymas atsikabina nuo sorbento, o iš kolonėlės išplauti baltymai renkami į frakcijas.

Po giminingumo chromatografijos išgrynintas baltymas dializuojamas. Dializės tikslas – sumažinti druskos koncentraciją baltymo tirpale, iš dializuojamo tirpalo pašalinti detergentus, polisacharidus. Tai įmanoma, nes dializės žarnelė praleidžia tik tam tikro dydžio molekules. Priklausomai nuo to, ar bus kerpama histidininė uodega, baltymas dializuojamas buferiniame tirpale G arba E (tolesnė darbo eiga pateikta atitinkamai A ir B atvejais).

A. Tikslinis baltymas dializuojamas buferiniame tirpale G tris kartus ne mažiau dviejų valandų (2-16 val) nuolat maišant 80 apm, 4 °C temperatūroje. Po dializės baltymo tirpalas filtruojamas naudojant vakuuminio filtravimo įrangą, koncentruojamas „Amicon® Ultra–15” koncentratoriumi iki ~ 3 mg/ml. Baltymo tirpalo koncentracija nustatoma spektrofotometriškai: matuojamas baltymo tirpalo optinis tankis ($\lambda = 280$ nm), o žinant molinį ekstinkcijos koeficientą, galima apskaičiuoti koncentraciją pagal formulę:

$$c = \frac{A \times M}{\varepsilon \times l}, \quad (2.3)$$

čia c – baltymo koncentracija (mg/ml), A – baltymo tirpalo optinis tankis, M – baltymo molekulinė masė (g/mol), ε – baltymo ekstinkcijos koeficientas ($63495 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), l – optinio kelio ilgis (1 cm).

Sukoncentruotas baltymo tirpalas išpilstomas į mėgintuvėlius (po 0,5 mg baltymo kiekviename) ir laikomas -20 °C temperatūroje.

B. Tikslinis baltymas dializuojamas buferiniame tirpale E tris kartus ne mažiau dviejų valandų (2-16 val.) nuolat maišant 80 apm, 4 °C temperatūroje. Po dializės baltymo tirpalas filtruojamas naudojant vakuuminio filtravimo įrangą, o po to inkubuojamas su trombinu.

2.2.4 Histidino uodegos kirpimas ir jonų mainų chromatografija

Histidininės uodegos kirpimui naudojami 3 vienetai trombino proteazės vienam miligramui baltymo. Kirpimas atliekamas per naktį 4 °C temperatūroje. Ar efektyviai nukirpta histidininė uodega, nustatoma elektroforetiškai tiriant mėginius prieš ir po kirpimo arba masių spektrometrinės analizės metodu, kurį atlieka dr. Vytautas Smirnovas.

Tikslinis baltymas nuo trombino atskiriamas jonų mainų chromatografijos metodu. Kolonėlė plaunama 100 ml buferiniu tirpalu E, o baltymas nuo sorbento eliuojamas linijiniu buferinio tirpalo F gradientu (200 ml). Toliau baltymo tirpalas dializuojamas, filtruojamas ir koncentruojamas taip pat kaip ir nenukirptas baltymas po giminingumo chromatografijos (2.2.3 skyrelio A atvejis), tik čia dializei naudojamas buferinis tirpalas G..

2.2.5 Fibrilių paruošimas ir jų susidarymo įrodymas

Baltymo tirpalas skiedžiamas fosfatinu buferiu (pH 6) bei 6 M GdnHCl iki 1 ml bendro tūrio taip, kad galutinės koncentracijos būtų tokios: baltymo – 0,5 mg/ml, GdnHCl – 2 M arba 4 M, fosfatinio buferio – 50 mM. Taip paruošti mėginiai inkubuojami maišant 8 apm greičiu 37 °C temperatūroje 3-4 ir 6-7 dienas atitinkamai ir 2 M ir 4 M GdnHCl tirpaluose; fibrilių susidarymas patikrinamas pasitelkus ThT spektroskopinę analizę ir stebint fibriles elektroniniu mikroskopu.

Į 2 ml 50 μM ThT tirpalą pridedama 20 μl paruoštų fibrilių ir, naudojantis fluorescenciniu spektrofotometru, matuojamas fluorescencijos intensyvumas. ThT savybės aprašomos 1.3 poskyryje.

Elektroninio mikroskopo nuotraukoms gauti susidariusios fibrilės skiedžiamos (galutinė koncentracija – 0,05 mg/ml); 4 μl užnešami ant tinklelių, laikoma 1 min ir džiovinama; tada 30 s dažoma 4 μl 2% uranilo acetato tirpalo. Mėginiai džiovinami ir „FEI Morgagni 268” elektroniniu mikroskopu padaromos nuotraukos.

2.2.6 Fluorescencinė analizė

Fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas susidariusių fibrilių kiekiui ir nustatomas fluorescenciniu spektrofotometru „Varian Cary Eclipse” arba realaus laiko PGR analizatoriumi „QIAGEN Rotor-Gene Q” (agregacijos tyrimuose).

„QIAGEN Rotor-Gene Q” analizatorius šiame darbe naudojamas ne pagal paskirtį, tačiau atsižvelgiant į naudojimo principą – nedidelių tūrių mėginių fluorescencijos aukštose temperatūrose matavimą – aparatas puikiai tinka tirti baltymų agregaciją. Kameroje, kurioje

vyksta matavimas, oras juda greitai, todėl visuose mėginiuose palaikoma ta pati temperatūra. Reakcijos mišinys apšviečiamas monochromatine šviesa (sužadavimo $\lambda = 470$ nm), signalas sustiprinamas ir matuojama emisija ($\lambda = 510$ nm). Eksperimento metu 36 plonasieniai 200 μ l talpos mėgintuvėliai, kurių kiekviename išpilstoma po 20 μ l reakcijos mišinio, patalpinami disko pavidalo rotoriuje. Šis sukasi 400 apm, tokiu būdu dėl išcentrinės jėgos palaikomas pastovus mėginių tūris mėgintuvėlių apačioje, kur kas 150 ms išmatuojama visų 36 mėgintuvėlių fluorescencija (Milto et al., 2014; Qiagen).

2.2.7 Rekombinantinio bPrP23-230 agregacijos tyrimai

Sėklos paruošimas

Sėklos (fibrilių galų) koncentracijai padidinti, susidariusių fibrilių agregatai (2.2.5 skyrelis) ardomi ultragarsu naudojant MS72 antgalį tokiomis sąlygomis: 10 min, amplitudė – 20 %, ultragarsinimo/ramybės ciklas – 30s/30s. Ardymo metu mėgintuvėlis su fibrilėmis laikomas šaltai (ledo vonelėje).

Fibrilių ilgėjimas

Po ultragarsinimo, fibrilės kuo greičiau sumaišomos su iš anksto paruoštu monomerinio bPrP23-230 tirpalu taip, kad galutinės koncentracijos būtų tokios: 50 μ M ThT 50 mM PB, 10 % sėklos ir skirtingos GdnHCl koncentracijos bei pH. Agregacija stebima 37 °C temperatūroje pasitelkus ThT fluorescencinę analizę realaus laiko „Qiagen Rotor-Gene Q” analizatoriumi (2.2.6 skyrelis). Matavimas trunka 15 valandų. Gautos kreivės eksportuojamos į *Microsoft Excel* programą; duomenys normalizuojami ir analizuojami *OriginPro* programa (2.2.9 skyrelis).

2.2.8 Rekombinantinio bPrP23-230 stabilumo įvertinimas

Baltymo stabilumui tirti šiame darbe naudojami tokie metodai, kurių metu temperatūros pokytis sukelia fluorescencijos ir CD signalus; tokiu būdu, atitinkamai realaus laiko PGR analizatoriumi ir spektropoliarimetru, buvo matuojamas bPrP23-230 temperatūrinis stabilumas (t. y., pusiausvyrinis baltymo išsisukimas, kai pusė baltymo yra denatūruotoje būsenoje). Tyrimų metu buvo naudojamas fluorescencinis dažas ANS (1.9 pav.), kurio sužadavimo bangos ilgis – 365 nm, o emisija – 460 (Matulis ir Lovrien, 1998; Matulis et al., 1999).

Baltymo stabilumas tirtas realaus laiko PGR analizatoriuje GdnHCl bei NaCl (100 mM) 50 mM fosfatiniame buferiniame tirpale keičiant pH (6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5) ir naudojant ANS kaip fluorescuojančią žymę. Eksperimentai vykdomi 1,5 val., keliant temperatūrą nuo 25 iki 95 °C, o

rezultatai apdorojami *ThermoFluor++* ir *Microsoft Excel* programomis. Gauti duomenys parodo denatūrantų ir joninės jėgos įtaką temperatūriniam stabilumui.

Denatūrantų įtakos tyrimas

Įvairių koncentracijų denatūrantų įtaka baltymo temperatūriniam stabilumui stebima pasitelkus ThT fluorescencinę analizę bei apskritiminio dichroizmo (toliau – CD) spektroskopiją. Tolimojo UV CD spektras užrašomas naudojantis „Jasco J-815” spektropoliarimetru 2 mm storio kvarcinėje kiuvetėje kintant temperatūrai (nuo 25 iki 80 °C, temperatūra keliami ~ 1 °C/min greičiu). Eksperimentams įvykdyti bPrP23-230 suspenduojamas 50 mM fosfatinio buferinio tirpaluose (pH 6), turinčiuose skirtingas denatūrantų koncentracijas (galutinė baltymo koncentracija – 0,05 mg/ml). 400 µl paruošto mėginio perkeliama į 2 mm storio kvarcinę kiuvetę. Nuskaitymo greitis – 50 nm/min, skyra – 1 nm. Eliptiškumas (θ) nustatomas suvidurkinant signalo reikšmes (per 2 min, $\lambda = 222$ nm). Molinis eliptiškumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\theta = \frac{100 \times \vartheta}{Cnl}, \quad (2.4)$$

čia ϑ – eksperimentiškai nustatyta CD signalo vertė (mililipsniais, mdeg), C – baltymo koncentracija (0,05 mg/ml), n – baltymą sudarančių aminorūgščių skaičius (219), l – kiuvetės ilgis (cm).

Fibrilių stabilumo tyrimas

Fibrilių stabilumas įvairių koncentracijų GdnSCN buferiniuose tirpaluose (pH 6) tiriamas stebint baltymo denatūracijos profilį. Tam pagal 2.2.5 pateiktą metodiką paruoštos fibrilės centrifuguojamos 25 min, 14000 apm; supernatantas nusiurbiamas, nuosėdos suspenduojamos 1 ml 50 mM PB buferiniame tirpale ir vėl centrifuguojama (25 min, 14000 apm); dekantuojama, o nuosėdos suspenduojamos 1 ml 0,5 M GdnSCN tirpale ir ardomos ultragarsu (10 min, amplitudė – 20 %, ultragarsinimo/ramybės ciklas – 30s/30s, antgalis – MS72). Taip paruošta sėkla dedama į skirtingų koncentracijų GdnSCN tirpalą, kurio komponentų sudėtis ir kiekiai pateikti 2.3 lentelėje, ir inkubuojama kambario temperatūroje 1 valandą. Tuomet, pasitelkus ThT fluorescencinę analizę, tiriamas baltymo stabilumas – nustatoma, kokiai denatūrantų koncentracijai esant pusė fibrilių ištirpsta; apdorojus duomenis *OriginLab* programa gaunama x_0 vertė – koncentracija, kai fluorescencijos intensyvumas yra 50 % maksimalios vertės.

2.3 lentelė. Skirtingų koncentracijų buferinių tirpalų komponentų kiekiai (galutinis tūris – 250 µl).

<i>Galutinė GdnSCN koncentracija</i>	Komponentų kiekis, µl		
	<i>6 M GdnHCl</i>	<i>H₂O</i>	<i>Dezintegruotos fibrilės (sėkla)</i>
0,50	16,70	183,30	50,00
0,75	27,00	173,00	
1,00	37,50	162,50	
1,25	48,00	152,00	
1,50	58,30	141,70	
1,75	68,80	131,20	
2,00	79,20	120,80	
2,25	89,60	110,40	
2,50	100,00	100,00	
2,75	110,40	89,60	
3,00	120,80	79,20	
3,25	131,30	68,70	
3,50	142,00	58,00	
3,75	152,00	48,00	
4,00	162,50	37,50	

2.2.9 Duomenų analizė

Visi matematiniai veiksmai ir grafinis rezultatų vaizdavimas šiame darbe atliekami naudojantis *Microsoft Excel*, *OriginLab* programomis. Gautos fluorescencijos intensyvumo kreivės konvertuojamos į skaitinius duomenis *Microsoft Excel* programoje, kur yra normalizuojami kiekvieną kreivės tašką perskaičiuojant pagal lygtį:

$$I_{norm} = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}}, \quad (2.5)$$

čia I_{norm} yra normalizuoto fluorescencijos intensyvumo vertė, I – eksperimento metu nustatytas fluorescencijos intensyvumas, I_{min} ir I_{max} – atitinkamai mažiausia ir didžiausia fluorescencijos intensyvumo vertė. Baltymo spontaninio fibrilių susidarymo duomenys aproksimuojami sigmoidine Boltzmano lygtimi:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x-x_0)}{dx}}} + A_2, \quad (2.6)$$

čia y – fluorescencijos intensyvumas, x_0 – laikas, kai fluorescencijos intensyvumas yra 50 % maksimalios vertės, $A1$ – kreivės minimumo vertė, $A2$ – kreivės maksimumo vertė, dx – kreivės nuolinkis.

Fibrilių ilgėjimo greitis (v) charakterizuojamas tiesiškai aproksimuojant duomenis nuo 0,4 iki 0,6 fluorescencijos intensyvumo; gaunama nuolydžio koeficiento vertė, kurią žinant galima apskaičiuoti fibrilių ilgėjimo greitį šiame intervale:

$$v = k \times c, \quad (2.8)$$

čia v – greitis (nM/min), k – apskaičiuota nuolydžio vertė, c – baltymo molinė koncentracija (nM).

Ekspimentinių duomenų paklaidos apskaičiuojamos pasitelkus Stjudento metodą (pasiklivimo lygmuo $p = 0,05$).

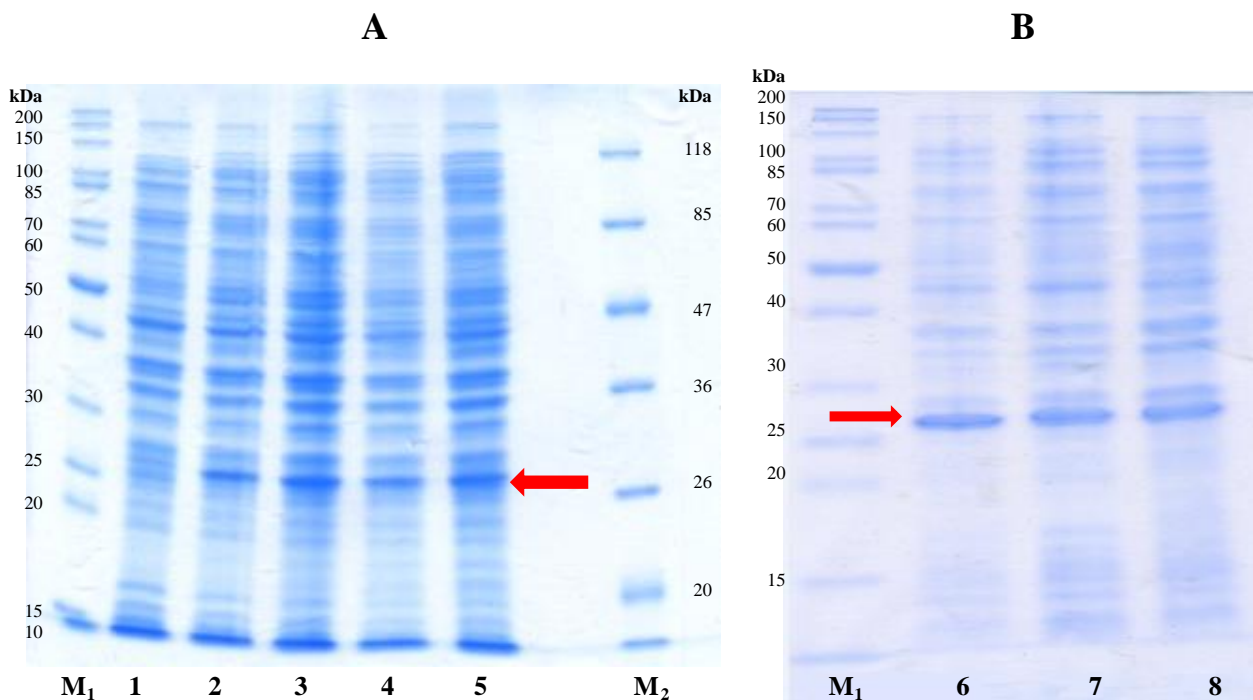
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Rekombinantinio bPrP23-230 raiška

Remiantis 2.2.1 pateikta metodika, *E. coli* bakterijų BL21 Star™ (DE3) kamienas buvo transformuotas *pRSETA-6xHis-bPrP23-230(25-241)* plazmide, o baltymo raiška indukuota dviem būdais – auginant bakterijas skystoje LB mitybinėje terpėje ir baltymo raišką indukuojant IPTG (1 mM), bei auto-induktyvioje mitybinėje terpėje ZYM-5052, kurioje baltymo raiška indukuojama vos tik bakterijoms suvartojus gliukozės šaltinį. Gautų biomasių išėigos smarkiai skyrėsi: auginant ląsteles LB terpėje ir indukuojant IPTG iš 1600 ml ląstelių kultūros gauta 3,14 g biomasės, o auginant tokį patį kiekį ląstelių kultūros auto-indukcinėje mitybinėje terpėje gauta 17,2 g biomasės, t. y., net 5,48 karto daugiau. Kita vertus, tai dar nereiškia, kad ir baltymo išėiga bus didesnė.

Rekombinantinio bPrP23-230 baltymo raiška patikrinama elektroforetiškai pagal 2.2.2 skyrelyje pateiktą metodiką. Elektroforeogramose (3.1 pav.) matomas apie 25 kDa molekulinės masės baltymas (3.1 paveikslėlio A ir B elektroforeogramose pažymėta raudonomis rodyklėmis; teorinė baltymo su histidinine uodega masė, remiantis *ProtParam* programa, yra 25390,9 Da), todėl galima teigti, kad transformantai gerai ekspresavo tikslinį baltymą. Remiantis 3.1 A paveikslu atrodo, kad LB terpėje yra mažesnė baltymo raiška, bet kol neišgryninome baltymo, taip teigti negalime.

Auginant biomasę auto-induktyvioje mitybinėje terpėje gaunamas didesnis jos kiekis, be to, toks bakterijų auginimo būdas yra paprastesnis, todėl toliau naudojamas tik šis metodas.



3.1 pav. *E. coli* bakterijų BL21 Star™ (DE3) kamiene ekspresuotų baltymų elektroforeograma poliakrilamidiniame gelyje (rodyklės rodo apie 25 kDa dydžio rekombinantinį bPrP23-230). *A* – baltymų raiška LB terpėje indukuojant IPTG; *B* – baltymų raiška auto-indukcinėje mitybinėje terpėje. Čia M_1 – molekulinės masės žymuo BP3602, M_2 – molekulinės masės žymuo BP3601; *1, 6 takeliai* – ląstelių lizatai prieš bPrP23-230 geno raiškos indukciją; *2, 7 takeliai* – ląstelių lizatai po bPrP23-230 geno raiškos indukcijos praėjus 2 val.; *3, 8 takeliai* – ląstelių lizatai po bPrP23-230 geno raiškos indukcijos praėjus 4 val.; *4 takelis* – ląstelių lizatas po bPrP23-230 geno raiškos indukcijos praėjus 6 val.; *5 takelis* – ląstelių lizatas po bPrP23-230 geno raiškos indukcijos praėjus 24 val.

3.2 Rekombinantinio bPrP23-230 gryninimas

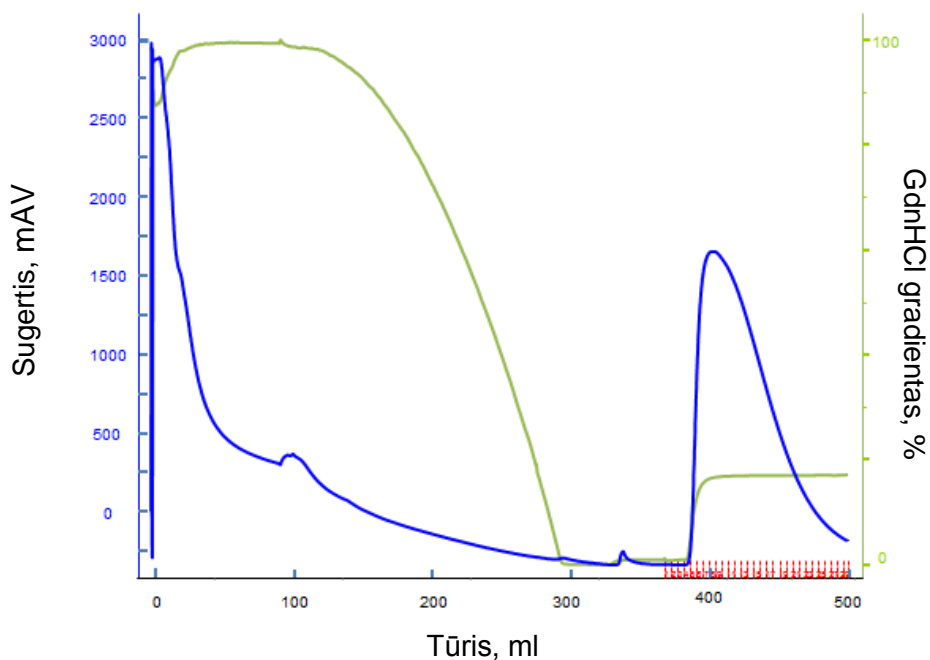
Iš gautos ląstelių biomasės rekombinantinis bPrP23-230 buvo renatūruojamas ir gryninamas pasitelkiant giminingumo chromatografijos metodą (2.2.3 skyrelis). Tipinis chromatogramos profilis pavaizduotas 3.2 paveikslėlyje. Didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją (3.2 paveikslėlyje mėlynu kontūru pažymėta sugerties smailė, kai $\lambda = 280$ nm) turinčios frakcijos apjungiamos kartu, dializuojama ir filtruojama pagal 2.2.3 skyrelyje pateiktą metodiką bei spektrofotometriškai nustatoma baltymo koncentracija (pagal 2.2 formulę).

Iš viso giminingumo chromatografijos metodu išgryninta 175,39 mg baltymo, kurio dalis (42,70 mg) panaudota biofizikinėms baltymo savybėms tirti, o likusi dalis (132,69 mg) inkubuojama su trombinu ir gryninama jonų mainų chromatografijos metodu. Baltymo išeiga vienam gramui biomasės, užaugintos auto-induktyvioje mitybinėje terpėje, yra beveik 2 kartus

didesnė nei LB terpėje užaugintosios, tuo metu išeiga vienam litrui terpės yra beveik 10 kartų didesnė (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Po giminingumo chromatografijos surinkto baltymo duomenys.

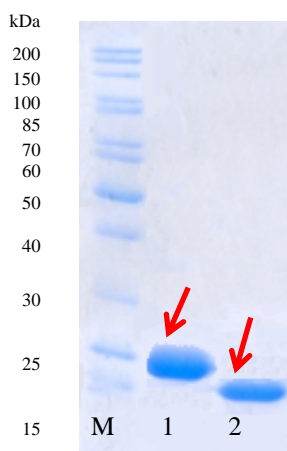
Naudota terpė	Terpės kiekis, ml	Surinktos biomasės kiekis, g	Frakcijų tūris, ml	Koncentracija, mg/ml	Gauto baltymo kiekis, mg	Išeiga, (mg baltymo/ 1 g biomasės)	Išeiga (mg baltymo/ 1 l biomasės)
LB	1600	3,15	46,00	0,38	17,42	5,53	3,46
ZYM-5052	1600	5,12	99,00	0,37	36,67	7,16	22,92
		12,00	133,00	0,91	121,30	10,11	75,81



3.2 pav. *E. coli* BL21Star™ kamiene ekspresuoto bPrP23-230 gryninimas afininės chromatografijos metodu (vieno iš gryninimų chromatograma). Čia žalia kreivė – buferinio tirpalo D laidumas, %; mėlyna – baltymo absorbcijos profilis, kai $\lambda = 280$ nm; raudona – baltymo tirpalo frakcijos.

Prieš gryninant baltymą jonų mainų chromatografijos metodu patikrinama, ar efektyviai nukirpta histidininė uodega. Tuo tikslu baltymo tirpalo mėginiai prieš ir po histidino uodegos kirpimo tiriami elektroforetiškai. Elektroforeograma yra pavaizduota 3.2 paveikslėlyje: atskyrus

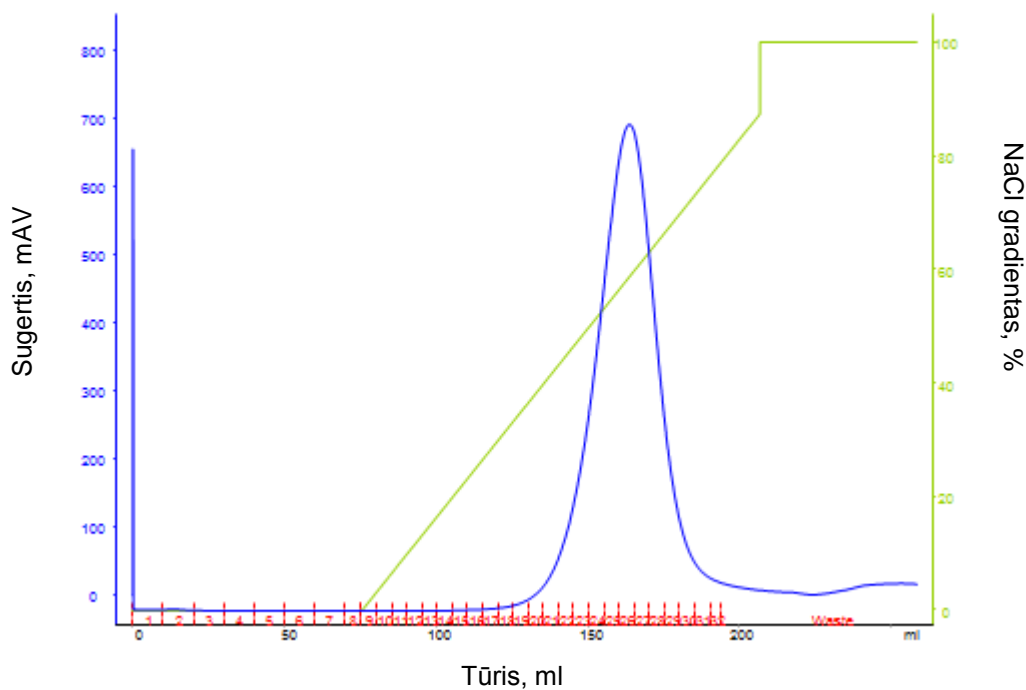
histidininę uodegą, baltymas sutrumpėja ~1,8 kDa ir dėl mažesnės masės gelyje juda greičiau. Taip pat mėginiai atiduodami masių spektrometrinei analizei, o gauti duomenys pateikiami 3.2 lentelėje bei palyginami su teorine baltymo molekuline mase prieš ir po kirpimo trombinu. Pastebime, kad teorinė ir praktiškai nustatyta baltymo molekulinė masė po kirpimo skiriasi $1,5 \pm 1$ Da; toks skirtumas parodo, kad po kirpimo susidaro disulfidinis ryšys, kurį turi didžioji dalis baltymo molekulių. Taigi pateikti rezultatai patvirtina histidininės uodegos atskyrimą nuo baltymo, todėl galima vykdyti tolesnį baltymo gryninimą jonų mainų chromatografijos metodu (pagal 2.2.4 skyrelyje pateiktą metodiką).



3.3 pav. Rekombinantinio bPrP23-230 elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje prieš ir po kirpimo trombinu. Čia *M* – molekulinės masės žymuo BP3602, *1* ir *2* takeliai – baltymo mėginiai atitinkamai prieš ir po kirpimo trombinu.

3.2 lentelė. Teoriniai duomenys, gauti pasinaudojus *ProtParam* programa, bei masių spektrometrinės analizės duomenys prieš ir po kirpimo trombinu.

	Teorinė bPrP23-230 molekulinė masė, Da	Praktiškai išmatuota bPrP23-230 molekulinė masė, Da
Prieš kirpimą trombinu	25390,9	25389,2±1
Po kirpimo trombinu	23613,9	23612,4±1



3.4 pav. *E. coli* BL21 Star™(DE3) kamiene ekspresuoto bPrP23-230 gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu (vieno iš gryninimų chromatograma). Čia *žalia kreivė* – buferinio tirpalo F linijinis gradientas, %; *mėlyna* – baltymo absorbcijos profilis, kai $\lambda = 280$ nm; raudona – baltymo tirpalo frakcijos.

Palyginus baltymo kiekius prieš ir po gryninimo jonų mainų chromatografijos metodu (3.3 lentelė), pastebėta, kad išeigos nedidelės. Manoma, kad taip yra dėl to, jog dalis baltymo suagreguoja atšildant baltymo tirpalą ir nemaža dalis baltymo suagreguoja kolonėlėje. Norint gauti didesnes išeigas, procesą būtina optimizuoti.

Iš viso gryninant chromatografiniais metodais gauta 132,69 mg bPrP23-230 su histidinine uodega ir 45,07 mg bPrP23-230 su nukirpta histidinine uodega (3.3 lentelė). Išgryninus šiuos rekombinantinius baltymus, juos jau galima analizuoti biofizikiniais metodais.

3.3 lentelė. Rekombinantinio bPrP23-230 išeigos išgryninus baltymą jonų mainų chromatografijos metodu.

Eil. nr.	Baltymo kiekis, mg		Išeiga, %
	Po afininės chromatografijos	Po jonų mainų chromatografijos	
1	16,67	10,28	61,67
2	36,67	12,10	33,00
3	40,13	13,20	32,89
4	39,22	9,49	24,20
Viso:	132,69	45,07	33,97

3.3 Rekombinantinio bPrP23-230 agregacijos tyrimai

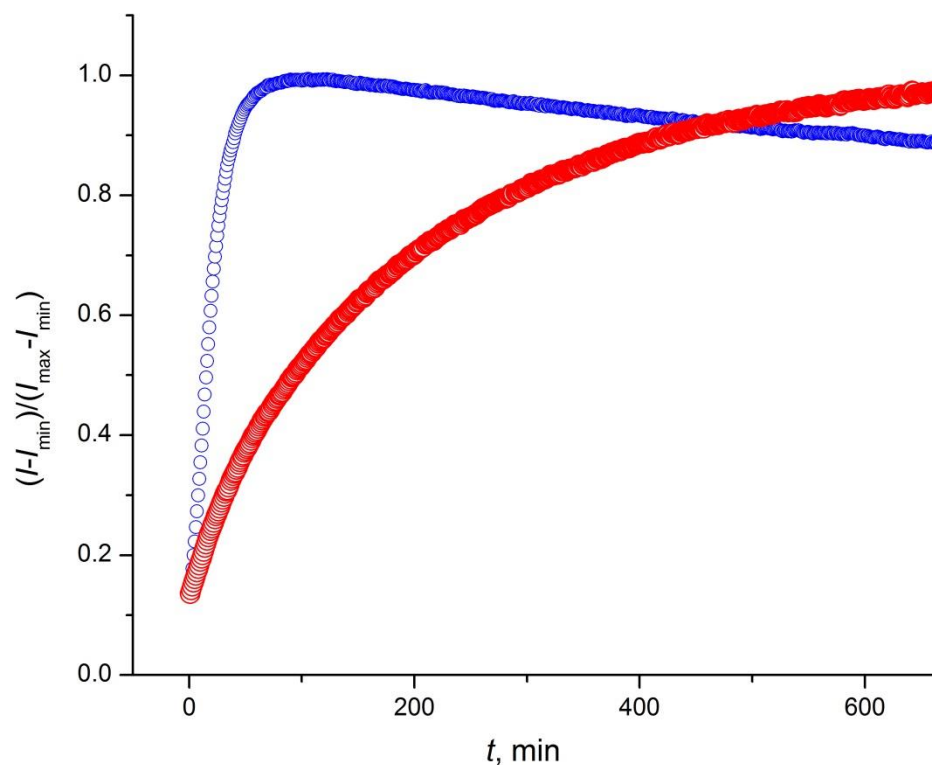
Buvo stebima, ar jaučio prioninio baltymo fibrilės, paruoštos 2 M GdnHCl buferiniame tirpale, gali inicijuoti žmogaus, kiaulės ir pelėno prioninių baltymų agregaciją 37 °C ir 50 °C temperatūroje bei koku greičiu ši agregacija vyksta.

3.4 lentelė. Jaučio sėklos incijuotų skirtingų monomerų agregacijos greičiai esant skirtingoms temperatūroms.

	v , nM/min	
	37 °C	50 °C
bPrP23-230 monomerai	135 ± 20	528 ± 31
huPrP23-231 monomerai	-	30 ± 1
bvPrP121-230 monomerai	40 ± 2	321 ± 23
scPrP23-231 monomerų	38 ± 4	-

Fibrilių ilgėjimo kinetikai stebėti paruošiama sėkla ir vykdomas eksperimentas pagal 2.2.7 skyrelyje pateiktą metodiką. Gauti duomenys normalizuojami, po to tiesiškai aproksimuojami fluorescencijos intensyvumo intervale nuo 0,4 iki 0,6; gaunama kreivių polinkio skaitinė vertė, kurią žinant galima apskaičiuoti, koks baltymo kiekis suagreguoja per minutę. Greičiausiai jaučio sėkla 37 °C temperatūroje inicijuoja jaučio prioninių baltymų agregaciją ($v = 135 \pm 20$ nM/min), panašiu greičiu agreguoja kiaulės ir pelėno PrP monomerai (atitinkamai, 38 ± 4 nM/min ir 40 ± 2 nM/min greičiu) (čia ir toliau nustatyti greičiai pateikiami 3.4 lentelėje), tuo metu žmogaus prioninio baltymo atveju agregacijos greičio nustatyti negalime, nes šis procesas daug ilgesnis ir nepasibaigia per matavimo laiką (t. y., per 15 val). Žmogaus prioninių baltymų agregacijos greitį pabandyta nustatyti aukštesnėje temperatūroje (50 °C): agregacija įvyko, nustatytas 30 ± 1 nM/min greitis. Padidinus temperatūrą iki 50 °C, bPrP23-230

agregacijos greitis išauga beveik 4 kartus, o pelėno – net 8. bPrP23-230 ir scPrP23-231 agregacijos 37 °C temperatūroje fluorescencijos intensyvumo priklausomybės pavaizduotos 3.5 paveikslėlyje.

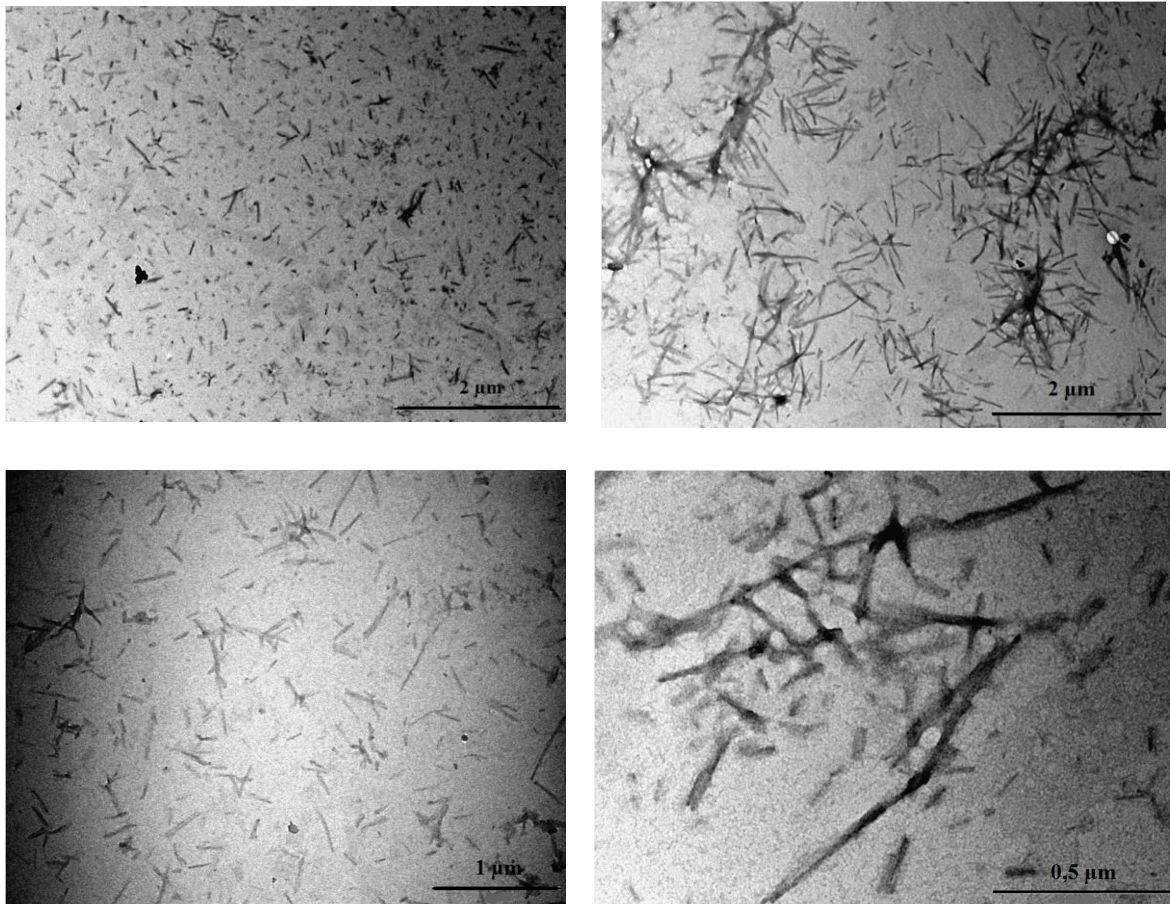


3.5 pav. Fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo laiko 37 °C temperatūroje normalizuoti duomenys. *Mėlyna kreivė* – bPrP23-230 monomerų ir sėklos agregatų fluorescencijos intensyvumas, *raudona kreivė* – scPrP23-231 monomerų ir sėklos agregatų fluorescencijos intensyvumas. Įvykdyta po 12 pakartojimų.

Remiantis apskaičiuotomis greičių vertėmis padaryta išvada, kad net vienos rūšies organizmo fibrilėms patekus į kitos rūšies organizmą agregacijos greičiai vis tik yra labai nedideli, o tai atitinka tarprūšinio barjero koncepciją (1.1.3 skyrelis).

3.4 Elektroninė mikroskopija

Norint įsitikinti, kad tikrai susidaro fibrilės, pagal 2.2.5 skyrelyje pateiktą metodiką ruošiamas jų mėginys elektroninei mikroskopijai. Fibrilės iliustruoja 3.6 paveikslėlyje pateiktos nuotraukos. Remiantis jomis, galima teigti, kad bPrP23-230 fibrilės linkusios sudaryti daug pradinių branduolių *lag* fazėje (1.2 pav.), nes jos yra trumpos (vidutiniškai 0,5 μm ilgio ir trumpesnės) ir jų daugybė, o tai lemia mažesnę fibrilių kiekį, kuris dalyvautų fibrilių ilgėjime.

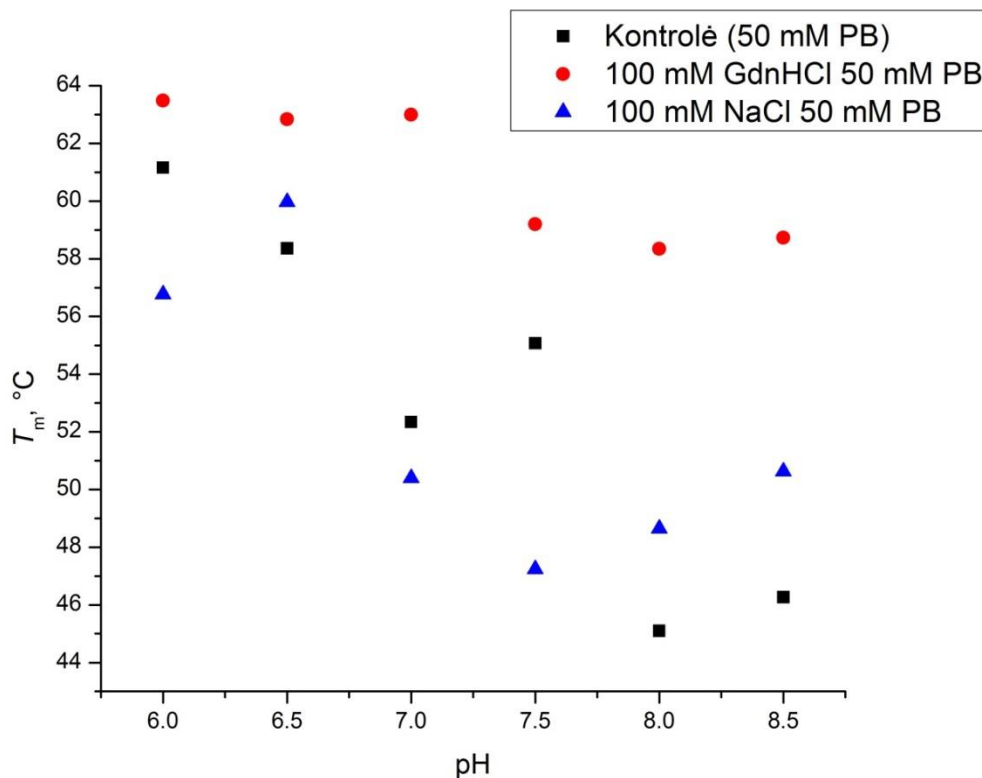


3.6 pav. bPrP23-230 fibrilių nuotraukos, gautos elektroniniu mikroskopu (baltymo koncentracija – 0,05 mg/ml, fibrilės buvo paruoštos 2 M GdnHCl 50 mM (pH 6) buferiniame tirpale).

3.5 Rekombinantinio bPrP23-230 stabilumo tyrimai

3.5.1 Denatūrantų įtakos baltymo temperatūriniam stabilumui tyrimas

Baltymo stabilumo priklausomybę nuo tirpalo pH (6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5) stebėjome skirtinguose buferiniuose tirpaluose: 50 mM PB buferyje be druskų, su NaCl (100 mM) ir su GdnHCl (100 mM) druskomis (3.7 pav.). Tyrimui realaus laiko PGR analizatoriuje kaip fluorescuojanti žymė panaudotas ANS. Gauti rezultatai apdorojami *ThermoFluor++* programa. Jie parodo denatūrantų ir joninės jėgos įtaką baltymo temperatūriniam stabilumui (T_m). Pastebėta, kad esant mažoms GdnHCl koncentracijoms pusė bPrP23-230 išsivynioja esant aukštesnei temperatūrai (lyginant su kontrole fosfatiniame buferyje, kuriame nėra denatūrantų), t. y., atrodo, kad baltymas yra stabilizuojamas mažų denatūrantų koncentracijų, o tai prieštarauja klasikiniams denatūrantų funkcijos apibrėžimui – destabilizuoti. Tuo metu NaCl nedidelės joninės jėgos buferiniame tirpale žymios įtakos bPrP23-230 temperatūriniam stabilumui nedaro. Iškeliama hipotezė – nedidelės denatūrantų koncentracijos stabilizuoja baltymą.



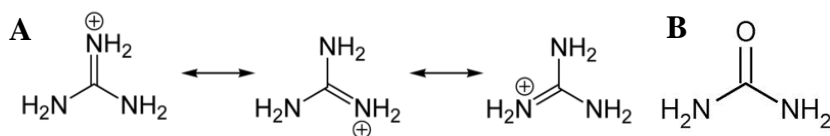
3.7 pav. bPrP23-230 T_m verčių priklausomybė nuo druskų bei skirtingo pH (6-8,5). Kadangi darytas tik vienas pakartojimas, paklaidos nenustatytos. Aparato matavimo paklaida – $\pm 0,1$ °C.

3.5 lentelė. bPrP23-230 T_m vertės esant skirtingoms GdnHCl koncentracijoms (0-250 mM) ir pH (6-8,5).

pH	GdnHCl koncentracija (mM)						
	0	50	100	150	200	250	
6	66,4	65,6	65,2	63,8	64,9	65,0	
6,5	59,8	60,0	61,6	60,8	62,7	61,9	
7	52,0	50,0	55,5	57,3	57,5	58,8	
7,5	49,8	50,1	51,9	54,4	55,7	56,9	
8	47,1	48,4	48,8	55,4	54,1	53,7	
8,5	47,1	48,5	49,6	50,9	53,9	55,1	

Vėliau buvo tiriama T_m priklausomybė nuo skirtingų denatūrantų GdnHCl koncentracijų bei pH. Remiantis 3.5 lentelės duomenimis pastebėta, kad nedidelės GdnHCl koncentracijos stabilizuoja baltymą, kai pH yra 6,5 ir daugiau, tačiau tokios tendencijos nėra, kai pH lygus 6. Be to, didinant pH ir palaikant vienodą GdnHCl koncentraciją, bPrP23-230 termostabilumas mažėja, ir atvirkščiai – didinant GdnHCl koncentraciją ir palaikant pastovų pH, T_m didėja.

Literatūros šaltinyje (Rashid et al., 2005) paaiškinama, kad esant mažoms GdnHCl koncentracijoms stebimas pereinamosios būsenos susidarymas. Taip yra dėl to, kad GdnHCl yra monovalentinė druska ir elgiasi kaip elektrolitas, tad turi įtakos elektrostatinėms sąveikoms (pasireiškia joninis efektas). Guanidino pK_a yra 11, vadinasi, tirpalo pH vertėms esant žemiau nei 11 (tokiomis sąlygomis ir atliktas eksperimentas), guanidinas yra protonizuotoje formoje (3.8 pav. A) ir kartu su tirpale esančiais chlorido jonais, kai denatūrantų koncentracija maža, stabilizuoja baltymą – teigiamai įkrauti jonai jungiasi prie neigiamai įkrautų baltymo paviršiuje

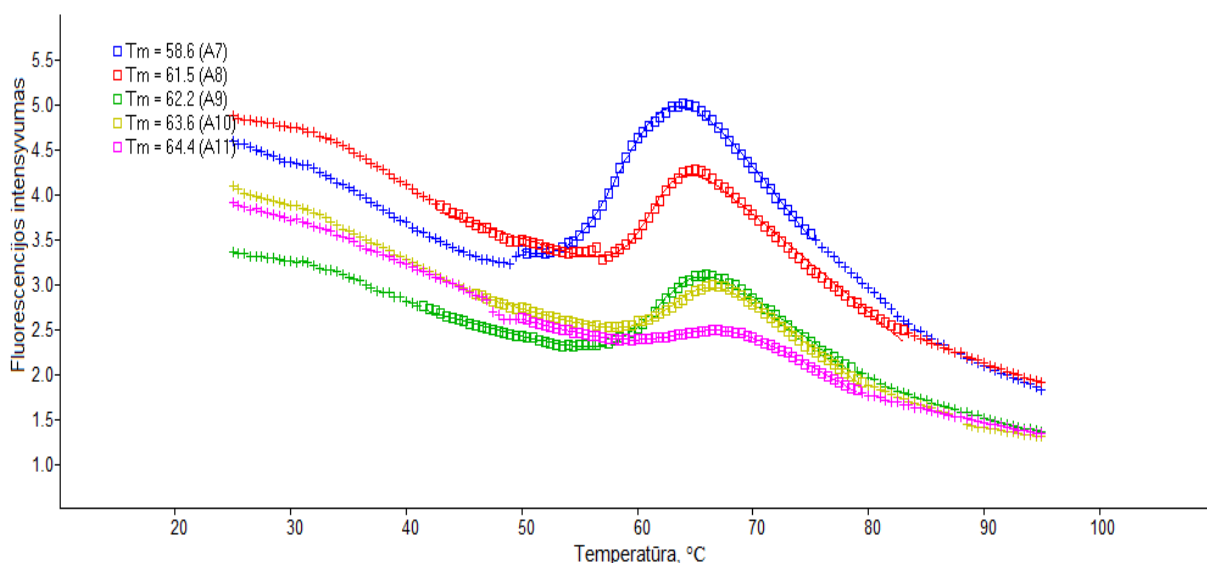


3.8 pav. A – guanidino jono rezonansinės struktūros, B – karbamido struktūrinė formulė.

esančių aminorūgščių, o chlorido jonai – prie teigiamai įkrautų aminorūgščių. Padidinus koncentraciją, GdnHCl veikia kaip klasikinis

denatūrantas – baltymas yra išvyniojamas. Kita vertus, tai nepaaiškina, kodėl stabilizavimo nepastebime, kai pH yra 6 (tiek GdnHCl, tiek NaCl atveju), tad nusprendėme papildomai atlikti tyrimus su kitu denatūrantu, neturinčiu jonų, kurie galėtų stabilizuoti baltymą. Tam puikiai tiko plačiai naudojamas denatūrantas karbamidas (3.8 pav. B). Atlikus eksperimentą, gauti įdomūs rezultatai – denatūrantų poveikis temperatūriniam stabilumui nepasikeitė. Temperatūrinį poslinkį

geriausiai charakterizuoja fluorescencijos intensyvumo kreivės, kai pH yra 6 (3.9 pav), o visi gauti rezultatai pateikiami 3.6 lentelėje.



3.9 pav. Jaučio prioninio baltymo temperatūrinės denatūracijos kreivės. Eksperimentai atlikti 50 mM PB (pH 6,5). Čia A7 – kontrolė, A8 – 200 mM (NH₂)₂CO, A9 – 400 mM (NH₂)₂CO, A10 – 600 mM (NH₂)₂CO, A11 – 800 mM (NH₂)₂CO .

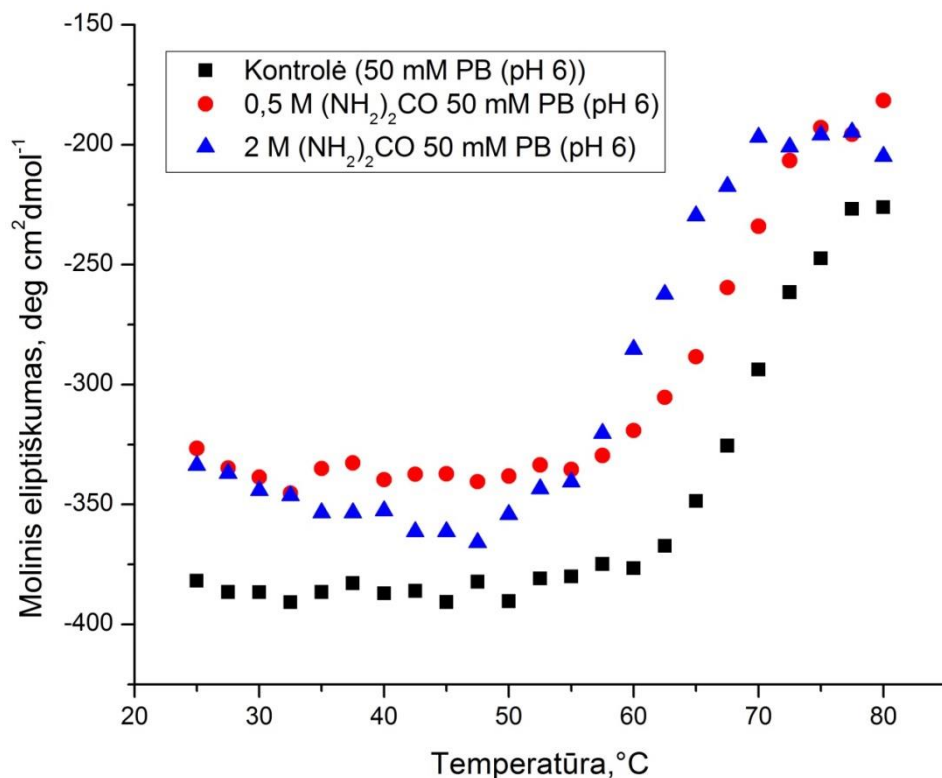
3.6 lentelė. bPrP23-230 temperatūrinio stabilumo priklausomybė nuo karbamido koncentracijos ir pH. Kadangi darytas tik po vieną pakartojimą, paklaidos nenustatytos. Aparato matavimo paklaida – ±0,1 °C.

pH	Karbamido koncentracija (mM)					
	0	200	400	600	800	1000
6	65,8	67,0	68,6	-	-	-
6,5	58,6	61,5	62,2	63,6	64,4	65,0
7	50,9	53,3	54,0	58,7	60,2	60,8
7,5	48,5	50,7	53,7	53,9	57,1	58,4
8	48,2	49,8	51,0	54,5	55,8	57,6
8,5	47,1	48,4	49,0	51,8	51,8	55,3

Išanalizavus 3.6 lentelės duomenis, pastebėtos tendencijos:

- didinant karbamido koncentraciją ir nekeičiant pH, baltymo temperatūrinis stabilumas didėja;
- didinant pH vertes ir nekeičiant karbamido koncentracijos, baltymo temperatūrinis stabilumas mažėja.

Norint įsitikinti, kad baltymas iš tikrųjų yra stabilizuojamas, reikėjo pasitelkti kitą analizės metodą, kuris tiesiogiai išmatuotų baltymo lydymosi temperatūrą. Buvo pasirinktas apskritiminio dichrozmo (CD) metodas ir nustatyta, kad baltymas, priešingai, yra destabilizuojamas (3.9 pav.).



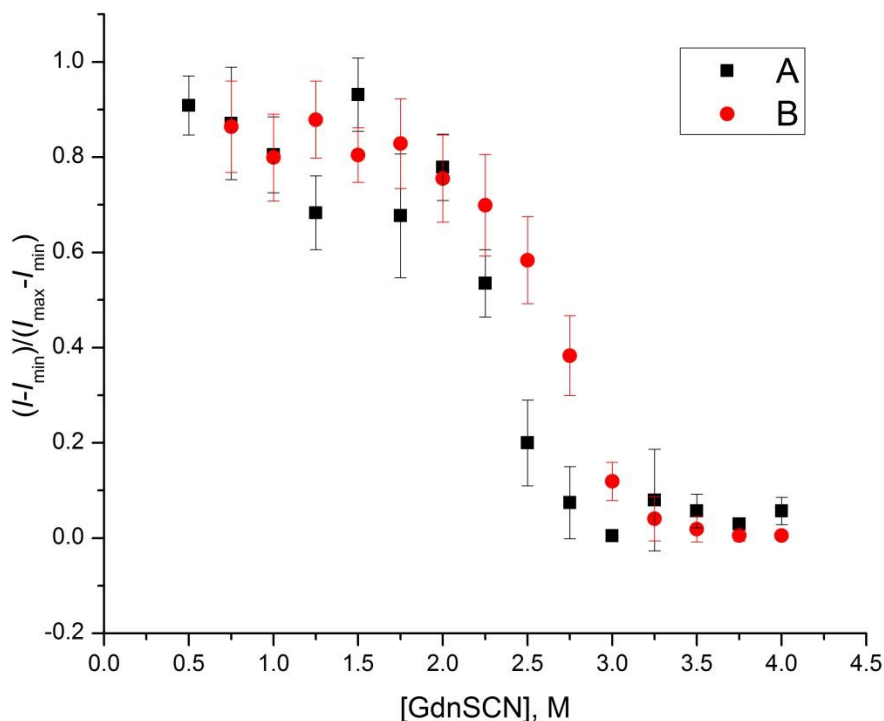
3.9 pav. Molinio eliptiškumo priklausomybė nuo karbamido koncentracijos ir temperatūros.

CD spektroskopinės analizės metodas pranašesnis tuo, kad eksperimentams atlikti užtenka nedidelių baltymo koncentracijų. Eksperimentas atliktas esant 0, 0,5 ir 2 M karbamido koncentracijoms (pH 6), o duomenys buvo aproksimuojami sigmoidine Boltzmano lygtimi (2.6) – apskaičiuotos T_m vertės atitinkamai yra $69,4 \pm 0,1$ °C, $67,5 \pm 0,1$ °C ir $61,3 \pm 0,1$ °C, vadinasi, baltymas yra destabilizuojamas ir hipotezė apie bPrP23-230 stabilizavimą nedidelėmis denatūrantų koncentracijomis nepasitvirtino. Manoma, kad klaidinga hipotezė buvo iškelta dėl to, jog dirbant su realaus laiko PGR analizatoriumi eksperimentams naudojamos didesnės baltymo koncentracijos. Tuomet tikriausiai susidaro bPrP23-230 agregatai, dėl to gali padidėti baltymo

hidrofobinio paviršiaus plotas ir prie jo prisijungus daugiau ANS molekulių gali pakisti fluorescencija. Naudojant CD metodą baltymo koncentracija yra mažesnė ir jis nesuagreguoja.

3.5.2 bPrP23-230 fibrilių stabilumo nustatymas

Kadangi literatūros šaltinyje (Cobb et al., 2014) mokslininkai parodė, kad žmogaus prioninio baltymo fibrilės, užaugintos skirtingomis sąlygomis, gali turėti didelių stabilumo skirtumų, nutarėme tokį eksperimentą atlikti ir su bPrP23-230 fibrilėmis. 2 ir 4 M GdnHCl 50 mM PB (pH 6) tirpaluose paruoštų fibrilių stabilumas įvertinamas pasitelkus ThT fluorescencinę analizę. Atlikus eksperimentą pastebėta, kad skirtingose GdnSCN koncentracijose bPrP23-230 fibrilių stabilumas skiriasi: su 4 M GdnHCl paruoštos fibrilės yra stabilesnės už su 2 M GdnHCl tirpale paruoštas fibriles (3.9 pav). Kiekvieną kreivę aproksimavus gauta, kad pusė 2 ir 4 M GdnHCl tirpaluose paruoštų bPrP23-230 fibrilių išstipsta atitinkamai $2,31 \pm 0,05$ M ir $2,67 \pm 0,03$ M GdnSCN tirpaluose. Lyginant su literatūroje aprašytais žmogaus PrP duomenimis, yra šioks toks skirtumas. Su 4 M GdnHCl paruoštų jaučio ir žmogaus PrP fibrilių stabilumas panašus, tuo metu 2 M GdnHCl tirpale paruoštos fibrilės yra stabilesnės nei huPrP fibrilės.



3.9 pav. 2 ir 4 M GdnHCl buferiniuose tirpaluose paruoštų fibrilių fluorescencijos priklausomybė nuo įvairių GdnSCN koncentracijų. Čia A – 2 M GdnHCl 50 mM PB (pH 6) paruoštos bPrP23-230 fibrilės; B – 4 M GdnHCl 50 mM PB (pH 6) paruoštos bPrP23-230 fibrilės. Įvykdyta po 6 pakartojimus.

Išvados

1. Norint gauti didesnius biomasės ir tikslinio baltymo kiekius, *E. coli* ląsteles geriau auginti auto-induktyvioje mitybinėje terpėje ZYM-5052.
2. Manoma, kad gryninant bPrP23-230 chromatografiniais metodais nedidelės baltymo išeigos gaunamos dėl to, jog dalis baltymo suagreguoja atšildant baltymo tirpalą, taip pat nemaža dalis baltymo suagreguoja kolonėlėje.
3. bPrP23-230 fibrilių inicijuota agregacija naudojant kitų organizmų prioninius baltymus yra lėtesnė negu naudojant bPrP23-230 monomerus, todėl galima daryti išvadą, kad veikia tarprūšinis barjeras.
4. Remiantis elektroniniu mikroskopu gautomis nuotraukomis galima teigti, kad bPrP23-230 fibrilės linkusios sudaryti daug pradinių branduolių *lag* fazėje, vadinasi, eksperimentų metu, kuomet vyksta fibrilių ilgėjimo reakcijos, susidaro daug trumpų fibrilių (vidutiniškai 0,5 μm ilgio ir trumpesnės).
5. Kai baltymo koncentracija yra 0,5 mg/ml, jis linkęs agreguoti žemesnėje temperatūroje nei jo lydymosi temperatūra.
6. 4 M GdnHCl buferiniame tirpale paruoštos fibrilės yra stabilesnės už 2 M GdnHCl buferiniame tirpale paruoštas fibriles.

Jaučio rekombinantinio prioninio baltymo raiška, gryninimas ir jo stabilumo bei agregacijos tyrimai

Bakalauro darbas

Gerda Blantaitytė

Vilniaus Universitetas

Chemijos fakultetas

SANTRAUKA

Prioniniai baltymai yra ekspresuojami žinduolių smegenyse ir gali turėti dvi izoformas – natyvią ir netinkamai susisukusią patogeninę izoformą. Nepaisant to, kad yra sukaupta nemažai duomenų, leidžiančių geriau suprasti neurodegeneracinių ligų eigą, žinios apie prionus yra nepakankamos.

Šio bakalauro darbo metu ekspresuotas ir išgrynintas jaučio rekombinantinis prioninis baltymas (bPrP23-230). Naudojant ANS fluorescenciją ir CD spektroskopinę analizę pastebėta, kad baltymas linkęs agreguoti aukštesnėse temperatūrose. Pasitelkus ThT fluorescencijos analizę ir elektroninę mikroskopiją nustatyta, kad galima gauti amiloidines fibriles. Patikrintas skirtingomis sąlygomis išaugintų fibrilių stabilumas. Parodyta, kad panaudojus bPrP23-230 fibriles kaip sėklą galima inicijuoti ne tik jaučio, bet ir kitų organizmų prioninių baltymų fibrilizaciją.

Expression, purification of recombinant bovine prion protein and studies of its stability and aggregation

Summary

Prion protein is expressed in mammalian brain. It can adopt two different forms, a normal form and a pathogenic misfolded form. Despite a number of studies on neurodegenerative diseases, the knowledge about prions is still insufficient.

First we expressed and purified recombinant prion protein (bPrP23-230). Using ANS fluorescence assay and CD spectroscopic analysis it was observed that the protein tends to aggregate at higher temperatures. Using ThT fluorescence assay and electronic microscopy the formation of amyloid-like fibrils was confirmed. The stability of fibrils, grown under different conditions was measured. In addition, it was demonstrated that bPrP23-230 fibrils seeds can initiate not only the bovine's, but other organisms's prion protein fibrillization.

Literatūra

1. Aguzzi A, Baumann F, Bremer J. The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* 2008;31:439-477.
2. Aguzzi A, Heikenwalder M, Miele G. Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases. *Journal of Clinical Investigation.* 2004;114(2):153-160.
3. Alper T. The scrapie enigma: insights from radiation experiments. *Radiat Res.* 1993;135:283–292.
4. Alper, T.et al. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*22, 278–284
5. Bagdonienė L, Bendikienė V, Kadziauskas J, Labeikytė D, Markuckas A, Sabaliauskienė V, Sasnauskienė S, Šeputienė V. *Biochemijos laboratoriniai darbai. Vilniaus universiteto leidykla,* 2006, p. 86-7.
6. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 2010;1804(7):1405-1412.
7. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in enzymology.* 2009;463:439-473.
8. Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C.. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* 1993;73(7):1339-1347.
9. Cobb NJ, Apostol MI, Chen S, Smirnovas V, Surewicz WK. Conformational Stability of Mammalian Prion Protein Amyloid Fibrils Is Dictated by a Packing Polymorphism within the Core Region. *Journal of Biological Chemistry.* 2014;289(5),2643-2650.
10. Colby DW, Prusiner SB. *Prions. Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2011; 3(1),a006833.
11. Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science.* 2007;318(5852):930-936.
12. Collinge J. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Human molecular genetics.* 1997;6(10):1699-1705.

13. Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and design*. 1998;3(1),R9-R23.
14. García FL, Zahn R, Riek R, Wüthrich K. NMR structure of the bovine prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(15):8334-8339.
15. Hornemann S, Christen B, von Schroetter C, Pérez DR, Wüthrich K. Prion protein library of recombinant constructs for structural biology. *FEBS journal*. 2009;276(8), 2359-2367.
16. Hornemann S, Schorn C, Wüthrich K. NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO reports*. 2004;5(12):1159-1164.

<http://www3.imperial.ac.uk/structuralbiology/teachingandtraining/techniquesworkshop/may2007>
17. Internetinė skaičiuoklė <http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>.
18. Jain S, Udgaonkar JB. Prion protein aggregation. *Current Science*. 2011;101(10):1311-1327.
19. Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, Grover RK, Roy R, Singh S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of structural biology*. 2005;151(3):229-238.
20. Kretzschmar H, Tatzelt J. Prion disease: a tale of folds and strains. *Brain Pathology*. 2013;23(3):321-332.
21. Li Z, Kessler W, van den Heuvel J, Rinas U.). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011; 91(4):1203-1213;
22. Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 1998;9(5):497-501.
23. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiological reviews*. 2008;88(2):673-728.
24. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*. 1996;60(3):512-538.
25. Marshall KE, Serpell LC. Structural integrity of beta-sheet assembly. *Biochem Soc Trans*. 2009;37:671-676.
26. Matulis D, Lovrien R. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophysical Journal*. 1998;74(1):422-429.

27. Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
28. Michal G, Schomburg D, editors. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. John Wiley & Sons. 2nd ed. Hoboken, New Jersey; 2013.
29. Middelberg AP. Preparative protein refolding. *TRENDS in Biotechnology*. 2002;20(10):437-443.
30. Milto K, Michailova K, Smirnovas V. Elongation of Mouse Prion Protein Amyloid-Like Fibrils: Effect of Temperature and Denaturant Concentration. *PLOS ONE*. 2014;9(4),e94469;
31. Morris AM, Watzky MA, Finke, RG. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2009;1794(3):375-397.
32. Nozaki Y. The preparation of guanidine hydrochloride. *Methods in enzymology*. 1972;26:43-50.
33. Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Matsuura Y, Shimizu Y, Kasai K, Mohri S, Yokoyama T, Czub S. Experimental H-Type Bovine Spongiform Encephalopathy. *Prion Biology: Research and Advances*. 2013;141-74.
34. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, Lobanov VS, Myslik J, Graf E, Carver T, Asel E, Springer BA, Lane P, Salemme FR. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of Biomolecular Screening*. 2001;6(6):429-440.
35. PDB [duomenų bazė internete]. Protein Data Bank. Sukurta 1999-12-15 [cituota 2014-04-27]. Adresas: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1dx0>
36. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science*. 1991;252:1515-1522.
37. Prusiner SB. Neurodegenerative diseases and prions. *New England Journal of Medicine*. 2001;344.20:1516-1526.
38. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982;216(4542):136-144.
39. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13363-83.
40. Qiagen [internetinė svetainė]. Rotor-Gene Q product details. Sukurta 2013 [cituota 2014-04-17]. Adresas: <http://www.qiagen.com/>
41. Race RE, Raymond GJ. Inactivation of transmissible spongiform encephalopathy (prion) agents by environ LpH. *Journal of virology*. 2004;78(4):2164-2165.

42. Ramon A, Señorale M, Marin M. Inclusion bodies: Not that bad.... *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:56;
43. Rančelis V. *Genetika*. Lietuvos mokslų akademijos leidykla. Vilnius; 2000, p. 271-4.
44. Rashid F, Sharma S, Bano B. Comparison of guanidine hydrochloride (GdnHCl) and urea denaturation on inactivation and unfolding of human placental cystatin (HPC). *The protein journal*. 2005;24(5):283-292.
45. Sasnauskienė Z. *Chromatografiniai metodai: vadovėlis*. Kaunas: Technologija. 2008; ISBN 978–9955–25–448–5
46. Soto C. Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(3):151-158.
47. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 1987;51:229–240.
48. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein expression and purification*. 2005;41(1):207-234.
49. Surewicz WK, Apostol MI. Prion protein and its conformational conversion: a structural perspective. In *Prion Proteins*. Springer Berlin Heidelberg. 2011;135-167.
50. Sweeney T. Auto-induction for over-expression in *E. coli*. Centre for Structural Biology Techniques Workshop on Cloning and Expression. 2007. [PowerPoint prezentacija]. Prieiga internetiniu adresu (žiūrėta 2014 04 17):
51. Völkel D, Blankenfeldt W, Schomburg D. Large-scale production, purification and refolding of the full-length cellular prion protein from Syrian golden hamster in *Escherichia coli* using the glutathione S-transferase-fusion system. *European Journal of Biochemistry*. 1998;251(1-2):462-471.
52. Walls D, Loughran ST. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification. *Protein Chromatography*. Humana Press. 2011;151-75.
53. Watts JC, Balachandran A, Westaway D. The expanding universe of prion diseases. *PLoS pathogens*. 2006;2(3),e26.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo bakalauro darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui ir Ksenijai Michailovai už perduotas žinias, naudingus patarimus ir pastabas, už pagalbą eksperimentinio darbo metu bei visam laboratorijos kolektyvui už draugišką aplinką.

