



VILNIAUS GEDIMINO TECHNINIS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Fausta Labanauskaitė

Hantingino pirmojo egzono gryninimas

Huntingtin Exon 1 Purification

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

Fausta Labanauskaitė

Hantingino pirmojo egzono gryninimas

Huntingtin Exon 1 Purification

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovas: dr. Vytautas Smirnovas

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)(Data)

Konsultantai: dr. Vaida Buivydienė

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)(Data)

lekt. Ričardas Mališauskas

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)(Data)

Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

Bioinžinerijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO

UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentei **Faustai Labanauskaitė**

Baigiamojo darbo (projekto) tema: **Hantingtino pirmojo egzono gryninimas**

patvirtintas 2015 m. lapkričio 06 d. dekanų potvarkiu Nr. 390fm

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2016 m. gegužės 30 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

Išsigryninti baltymą hantingtino pirmąjį egzoną, sulietą su glutatono S-transferaze. Atlikti baltymo proteolitinę hidrolizę HRV 3C proteaze bei tripsinu.

Baigiamojo magistro darbo (projekto) konsultantai:

dr. Vaida Buivydienė

lekt. Ričardas Mališauskas

Vadovas _____
(Parašas)

dr. Vytautas Smirnovas

Užduotį gavau

(Parašas)

Fausta Labanuaskaitė

(Vardas, pavardė)

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN

Egz. sk.

Data-....-....

Antrosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos magistro baigiamasis darbas 4

Pavadinimas: **Hantingtono pirmojo egzono gryninimas**

Autorius **Fausta Labanauskaitė**

Vadovas dr. **Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Hantingtono liga yra dažniausiai pasitaikanti paveldima naurodegeneracinė liga pasaulyje. Deja, šios ligos gydymo nėra ir mirštama praėjus 10–15 metų nuo ligos gydymo pradžios. Pagrindinė ligos priežastis yra CAG kodono pagausėjimas baltymo hantingtono (htt) gene. CAG koduoja aminorūgštį glutaminą, taip gaunamas nenormaliai didelis poliglutamininis domenai, kuris yra nestabilus ir skatina baltymų agregaciją smegenų srityje. Hantingtono ligos molekulinis mechanizmas nėra visai išaiškintas. Manoma, kad gali būti keli ligos patologijos keliai, o pirmuoju htt agregacijos žingsniu yra laikoma baltymo pirmojo egzono fragmentų susidarymas citoplazmoje. Tad šiuo metu hantingtono pirmasis egzonas yra vienas pagrindinių objektų, tyrinėjant ligos patologiją.

Darbo metu atlikta rekombinantinio hantingtono pirmojo egzono, sulieto su glutationo S-transferaze (GST), raiška *E. coli* BL(21) Star™ (DE3) kompetentinėse ląstelėse. GST baltymas reikalingas tikslinio peptido (hantingtono pirmojo egzono), kuris yra linkęs agreguoti, sudarydamas amiloidines fibriles, stabilumui palaikyti. Baltymo gryninimui naudota afininė nikelio chelatinė chromatografija bei gelfiltracija. Tikslinio peptido atskyrimui buvo atliekamas proteolitinis karpymas HRV 3C proteaze arba tripsinu. Norint išvengti nespecifinės tripsinizacijos, fermentinė reakcija buvo stebima masių spektrometrinės analizės būdu, nustatant peptidų susidarymo priklausomybę nuo fermentinės reakcijos laiko.

Darbo metu buvo išgrynintas rekombinantinis hantingtono egzonas pirmasis, sulietas su GST. Tikslinis peptidas atskirtas vykdant proteolitinį karpymą tripsinu. Kadangi fermentas gali karchyti nespecifiškai, masių spektrometrinės analizės pagalba parinktos optimaliausios reakcijos sąlygos.

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

Darbo apimtis 47 p. teksto be priedų, 23 paveikslai, 8 lentelės, 53 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: agregacija, glutaminas, gryninimas, hantingtono pirmasis egzonas, Hantingtono liga, tripsinas.

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

ISBN ISSN
Copies No.
Date-....-....

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master Graduation Thesis 4

Title: **Huntingtin Exon 1 Purification**

Author **Fausta Labanauskaitė**

Academic supervisor dr. **Vytautas Smirnovas**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Huntington's disease is the most common inherited neurodegenerative disease in the world. Unfortunately, there is no treatment for this disease, and death usually occurs 10–15 years after onset. The main cause of the disease is increase of CAG repeats in the *htt* gene. CAG encodes the amino acid glutamine and as a result the protein contains abnormal increase of glutamines (polyQ), which are unstable and promote protein aggregation in the brain. Huntington's disease molecular mechanism is not fully understood. It is believed that there may be multiple disease pathways, and the first aggregation step is considered to be formation of exon 1 fragments in the cell cytoplasm. Today huntingtin exon 1 is one of the main objects in the disease pathology research.

During this work recombinant huntingtin exon 1 fused to glutathione S-transferase (GST) was expressed in *E. coli* BL (21) Star™ (DE3) cell strain. GST protein is necessary for the stability of target protein – huntingtin exon 1 – which is prone to aggregate and form amyloid fibrils. For protein purification nickel chelate affinity chromatography and gel filtration was used. Target peptide separation was carried out by proteolytic cleavage using HRV 3C protease or trypsin. To avoid unspecific tryptic digestion, optimal reaction conditions were chosen using mass spectrometric analysis

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

Thesis consist of: 47 p. text without appendixes, 23 pictures, 8 tables, 53 bibliographical entries.

Keywords: aggregation, glutamine, purification huntingtin exon 1, Huntington's disease, trypsin.

Vilniaus Gedimino technikos universiteto
egzaminų sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei
gynimo organizavimo tvarkos aprašo 2011–2012
m. m.
2 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Fausta Labanauskaitė, 20102198

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, Bifm-14

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2016 m. birželio 02 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Hantingino pirmojo egzono gryninimas“ patvirtintas 2015 m. lapkričio 06 d. dekanų potvarkiu Nr. 390fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: dr. Vaida Buivydienė, lekt. Ričardas Mališauskas. Mano darbo vadovas dr. Vytautas Smirnovas

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs (usi).

(Parašas)

Fausta Labanauskaitė
(Vardas ir pavardė)

Turinys

ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Su poliglutaminėmis sekomis susijusios ligos.....	11
1.1.1. Spinocerebralinės ataksijos (SCA).....	12
1.1.2. <i>Haw River</i> sindromas (DRPLA).....	12
1.1.3. Kenedžio sindromas (SBMA)	12
1.2. Hantingtono liga (HD)	12
1.3. Baltymas hantingtinas	13
1.3.1. Baltymo hantingtinio funkcijos	15
1.4. Baltymų amiloidinė agregacija	17
1.4.1. Amiloidinių fibrilių charakteristika.....	17
1.4.2. Baltymo hantingtinio agregacija.....	18
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	21
2.1. Medžiagos	21
2.1.1. Reagentai	21
2.1.2. Sorbentai.....	21
2.1.3. Kompetentinės ląstelės	22
2.1.4. Konstruktas.....	22
2.1.5. Mitybinės terpės	22
2.1.6. Laboratorinė įranga	23
2.2. Metodai	23
2.3. Baltymų ekspresija.....	23
2.4. Baltymų gryninimas.....	24
2.4.1. Biomasės ardymas	24
2.4.2. Giminingumo chromatografija	24
2.4.3. Dializė	25

2.4.4.	Gelfiltracija.....	25
2.4.5.	Baltymų sukoncentravimas	26
2.5.	Baltymo proteolitinis karpymas	26
2.5.1.	HRV 3C proteazė	26
2.5.2.	Tripsinas	27
2.6.	Peptidų analizė masių spektrometrijos būdu	27
2.6.1.	Duomenų analizė	28
2.7.	Elektroforezė.....	29
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	31
3.1.	Baltymų ekspresija.....	31
3.2.	Afininė chromatografija.....	31
3.3.	Dializė/gelfiltracija	33
3.4.	Baltymo proteolitinis karpymas	34
3.4.1.	HRV 3C proteazė	34
3.4.2.	Tripsinas	35
3.5.	Masių spektrometrinė analizė	36
	IŠVADOS	41
	NAUDOTA LITERATŪRA.....	42

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AA/BAA – akrilamidas/bisakrilamidas

APS – amonio persulfatas

BDNF – *angl.* brain-derived neurotrophic factor

CAG – citozinas-adeninas-guaninas

CNS – centrinė nervų sistema

DTT – ditionitritolis

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

FMSF – fenilmetanosulfonilfluoridas

HD – Hantingtono liga

HEAT – Hantingtonas, Elongacijos faktorius 3, fosfatazės 2A subvienetas PR65/A ir lipidų kinazė Tor1

Htt – hantingtonas

LB – *LuriaBroth*

NDS – natrio dodecilsulfatas

NTA – nitrotriacto rūgštis

PoliP – poliprolinai

PoliQ – poliglutaminai

SCA1 – spinocerebralinė ataksija 1

SCA17 – spinocerebralinė ataksija 17

SCA2 – spinocerebralinė ataksija 2

SCA6 – spinocerebralinė ataksija 6

SCA7 – spinocerebralinė ataksija 7

TEMED – tetrametiletilenodiaminas

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas

IVADAS

Baltymų neteisingas susilankstymas (angl. *misfolding*) ir agregacija siejami su daugeliu neurodegeneratyvinių ligų. Baltymų neteisingo susilankstymo pagrindinės priežastys yra pavienių aminorūgščių pakitimas ar pasikartojančių amino rūgščių pagausėjimas. Pastarojo proceso geriausias pavyzdys – poliglutaminų (poliQ) pagausėjimas, kuris yra atsakingas mažiausiai už devynias neurodegeneratyvines ligas, įskaitant ir Hantingtono ligą (HD) (Kayatekin et al., 2014). Su poliglutaminėmis sekomis susijusios ligos tarpusavyje turi nemažai panašumų: ligos trukmė 15–20 metų, ligos progresavimas priklauso nuo poliQ domeno dydžio, mutantinio baltymo agregatų kaupimasis sukelia neurodegeneraciją specifiniuose smegenų regionuose (Fan et al., 2014). HD yra labiausiai pasitaikanti paveldima neurodegeneracinė liga. Deja, gydymo šiai niokojančiai ligai nėra (Arrasate et al., 2012).

Hantingtono, kaip kitų poliglutamininių ligų, taip pat Alzheimerio ar Parkinsono ligų atvejais, simptomai dažniausiai pasireiškia vidutinio ir vyresnio amžiaus žmonėms, nepaisant to, kad asmenys ligas sukeliančias mutacijas turi nuo pat gimimo. Tai gali reikšti, kad ankstyvame amžiuje toksiškumas įvairiais mechanizmais yra slopinamas, tačiau galiausiai organizmas pasiduoda ligos progresavimui (Golas et al., 2016). Hantingtono ligos molekulinis mechanizmas nėra visai išaiškintas. Manoma, kad gali būti keli ligos patologijos keliai, o pirmuoju *htt* agregacijos žingsniu yra laikoma baltymo pirmojo egzono fragmentų susidarymas citoplazmoje. Tad šiuo metu hantingtino pirmasis egzonas yra vienas pagrindinių objektų, tyrinėjant ligos patologiją

Šio darbo tikslas – išgryninti baltymo hantingtino pirmąjį egzoną.

Darbui keliami uždaviniai

1. Naudojant chromatografinius metodus, išgryninti GST-*htt*-ex1-19Q baltymą.
2. Atlikti baltymo proteolitinį karpymą, tiksliniam peptidui atskirti.
3. Atlikti peptidų analizę masių spektrometrijos metodu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Su poliglutamininėmis sekomis susijusios ligos

Šiuo metu yra žinomos 9 poliglutamininės ligos (1 lentelė): spinocerebralinė ataksija 1 (SCA1), spinocerebralinė ataksija 2 (SCA2), spinocerebralinė ataksija 6 (SCA6), spinocerebralinė ataksija 7 (SCA7), spinocerebralinė ataksija 17 (SCA17), Machado–Džozefo liga (MJD/SCA3), Hantingtono liga (HD), *Haw River* sindromas (DRPLA), Kenedžio sindromas (SBMA). Glutamininių ligų sergamumas – 1–10 iš 1 000 000 žmonių (Fan et al., 2014; Gomez-Sicilia et al., 2015; Mcfarland et al., 2011). PoliQ ligų pagrindinė priežastis yra trinukleotidocitozinas – adeninas – guaninas (CAG) pagausėjimas tikslinio baltymo gene. CAG trinukleotidas koduoja aminorūgštį glutaminą, todėl suformuojamas poliglutamininis domenas (poliQ) (Fan et al., 2014). Baltymai, turintys ilgas poliQ sekas, yra nestabilūs ir linkę agreguoti, sudarydami beta klostyto struktūros fibriles – amiloidus (Fan et al., 2014; Li et al., 2016). Tokių baltymų kaupimasis gali pakenkti mitochondrijų veiklai, šaperonams, ubikvitinoproteosomų sistemai. Taigi, didelį glutaminų kiekį turinčių baltymų kaupimas galiausiai sukelia neuronų veiklos sutrikimus ir degeneraciją (Fan et al., 2014).

1 lentelė. Ligos, siejamos su poliglutamininių sekų pagausėjimu, aptinkami mutavę gerai ir įvekspresuojami baltymai (Fan et al., 2014; Mcfarland et al., 2011)

Sutrikimas	Lokusas	Transkriptas (bp)	Baltymas	PoliQ dydis (a.r.)		
				Normalus	Patologinis	
Kenedžio sindromas (SBMA)	Xq11-q12	4314	Androgeno receptorius	920 a.r.	6–36	38–62
Hantingtono liga (HD)	4p16.3	13481	Hantingtinis	3144 a.r.	6–35	36–121
Spinocerebralinė ataksija 1 (SCA1)	6p23	10636	Ataksinas 1	815 a.r.	6–39	41–83
HawRiver sindromas (DRPLA)	12p13	4367	Atrofinas 1	1190 a.r.	3–38	49–88
Machado-Džozefo liga (MJD/SCA3)	14q24	6932	Ataksinas 3	361 a.r.	12–40	62–86
Spinocerebralinė ataksija 2 (SCA2)	12q24	4712	Ataksinas 2	1313 a.r.	14–32	34–77
Spinocerebralinė ataksija 6 (SCA6)	19p13	8641	α-1a kalcio kanalas	2266 a.r.	4–18	21–30
Spinocerebralinė ataksija 7 (SCA7)	3p21-p12	7247	Ataksinas 7	892 a.r.	7–18	38–200
Spinocerebralinė ataksija 17 (SCA17)	6q27	1876	TATA-bloką rišantis baltymas	339 a.r.	25–43	45–63

Nepaisant pataloginių skirtumų, ligų progresavimas yra glaudžiai siejamas su glutaminų skaičiumi. Kuo šis domenas baltyme didesnis, tuo anksčiau liga diagnozuojama ir stipriau

progresuoja. Be to, visais atvejais yra aptinkamos ilgias poliQ sekas turinčių baltymų agregatų sankaupos (Kayatekin et al., 2014).

1.1.1. Spinocerebralinės ataksijos (SCA)

SCA (1, 2, 3, 6, 7, 17) yra paveldimi autosominiai dominantiniai sutrikimai, veikiantys centrinę nervų sistemą (CNS). Baltyminiai amiloidiniai agregatai randami smegenėlių *Purkinj* ląstelėse bei smegenų žievės neuronuose. Šiomis ligomis serga tiek vyrai, tiek moterys. Pagrindiniai ligų simptomai yra prasta kojų, rankų ir akių judesių koordinacija, kalbos sutrikimai, sunkumai vaikščioti, sugriebti, laikyti daiktus ir pan. Šiomis ligomis serga maždaug 1–4 žmonės iš 100000. Liga paplitusi Taivano, Japonijos, Kaukazo etninėse grupėse (Fan et al., 2014; Gövert et al., 2013).

1.1.2. *Haw River* sindromas (DRPLA)

Tai retas paveldimas autosominis dominantinis neurodegeneratyvinis sutrikimas. Sergančiųjų amžius svyruoja nuo 1 iki 62 metų, o vidurkis yra maždaug 30 metų. Priklausomai nuo sergančiųjų amžiaus, kinta ir klinikiniai simptomai. Suaugusiems pagrindiniai ligos požymiai yra ataksija, choreoatetozė, demencija. Vaikams – intelektinio vystymosi nykimas, elgesio pokyčiai, mioklonusas, epilepsija. Ši liga labiausiai paplitus Japonijoje, sergamumas – 1 iš 200000 žmonių. Baltymų amiloidiniai agregatai pagrįde kaupiasi smegenų kamieno bei baltojoje smegenų medžiagoje (Fan et al., 2014; Gövert et al., 2013; McFarland et al., 2011).

1.1.3. Kenedžio sindromas (SBMA)

Tai retas, sekinantis, neurodegeneracinis sutrikimas. Sergamumas yra 1–2 žmonės iš 100000, didžiausias paplitimas Suomijoje. Ligonų amžius dažniausiai varijuoja tarp 30 ir 60 metų. Pagrindiniai simptomai yra raumenų silpnumas, atrofija, stuburo ir smegenų kamieno motorinių neuronų degeneracija. Dažnai susiduriama su burnos raumenų atrofija. Amiloidinių agregatų sankaupos aptinkamos smegenėlėse, bei įvairiose stuburo smegenų dalyse (Fan et al., 2014; McFarland et al., 2011).

1.2. Hantingtono liga (HD)

HD yra retas, paveldimas autosominis dominantinis, laipsniškai progresuojantis neurodegeneratyvinis sutrikimas (Ellrichmann et al., 2013; Fomby et al., 2011; Ha et al., 2012). Diagnozė istoriškai buvo nustatoma remiantis psichikos pasikeitimais, motorikos sutrikimais ir teigiama šeimos ligų istorija. Daugiau nei po 100 metų buvo atrasta genetinė mutacija, sukianti Hantingtono ligą. 1993 metais konsorciumas paskelbė nestabilaus tripleto pagausėjimo IT15 (angl. *interesting transcript #15*) gene atradimą. Vėliau šis genas pavadintas hantingtono (htt)

genų, kuris neturi jokių homologų genome. Tad šiomis dienomis HD gali būti diagnozuojama DNR sekvenavimo metu, ieškant CAG kodono pagausėjimo hantingtino gene, kuris aptinkamas ketvirtoje chromosomoje (Finkbeiner, 2011; Kaplan et al., 2012).

Htt genas susideda iš 67 egzonų ir užima 180 kb genomines DNR. Paskutiniame egzone esančio netransliuojamo regiono skirtingas poliadenilinimas leidžia susidaryti dviems skirtingiems transkriptams, kurie tarpusavyje skiriasi 3 kb. Abu transkriptai yra ekspresuojami įvairiose ląstelėse ir audiniuose, nors ilgesnysis labiau vyrauja smegenų neuronuose. Nestabilus CAG trinukleotido pagausėjimas aptinkamas pirmajame htt geno egzone ir sukelia Hantingtono ligą. Htt geno homologai yra aptikti pelėje, žiurkėje, Fugu žuvelyje, zebražuvėje, vaisinėje muselėje, mini kiaulėje, vandens varlėje, jūros vėžyje. Išskirtinis htt geno bruožas yra mejozinis nestabilumas. Vienos šeimos nariai dažniausiai neturi tos pačios poliQ sekos ilgio. Šis domenas mejozės metu kinta maždaug 85 % paveldėjimo atvejų, dažniausiai pastebimas poliQ domeno didėjimas. Normalus genas turi 6–35 CAG pasikartojimus, o žmogus turintis virš 40 CAG pasikartojimų neišvengiamai susirgs HD (Arrasate et al., 2012; Ellrichmann et al., 2013; McFarland et al., 2011; Myers, 2007).

Sergamumas Hantingtono liga pasaulyje yra 5–10 žmonių iš 100000. Liga paplitus šiaurės ir pietų Amerikoje, Europoje, Centrinėje Azijoje. Didžiausias žinomas HD pacientų tankis yra Zulia valstijoje, Venesueloje (Kaplan et al., 2012). Vidutinis simptomų pasireiškimo amžius yra 30–50 metų. Kai kuriais atvejais liga gali pasireikšti ir anksčiau, iki 20 metų, o tai sukelia jaunų žmonių elgesio sutrikimus ir sunkumus mokantis mokykloje. Klinikinė HD diagnozė nustatoma remiantis chorėja, kuri palapsniui išplinta į visus raumenis, taip pat kitais judėjimo sutrikimais, tarp kurių yra distonija, bradikinezija, sutrikusi koordinacija. Vėliau šiuos simptomus papildo elgesio ar psichikos pasikeitimai, dirglumas, demencija (Fan et al., 2014; Nance, 2012; Shang et al., 2012).

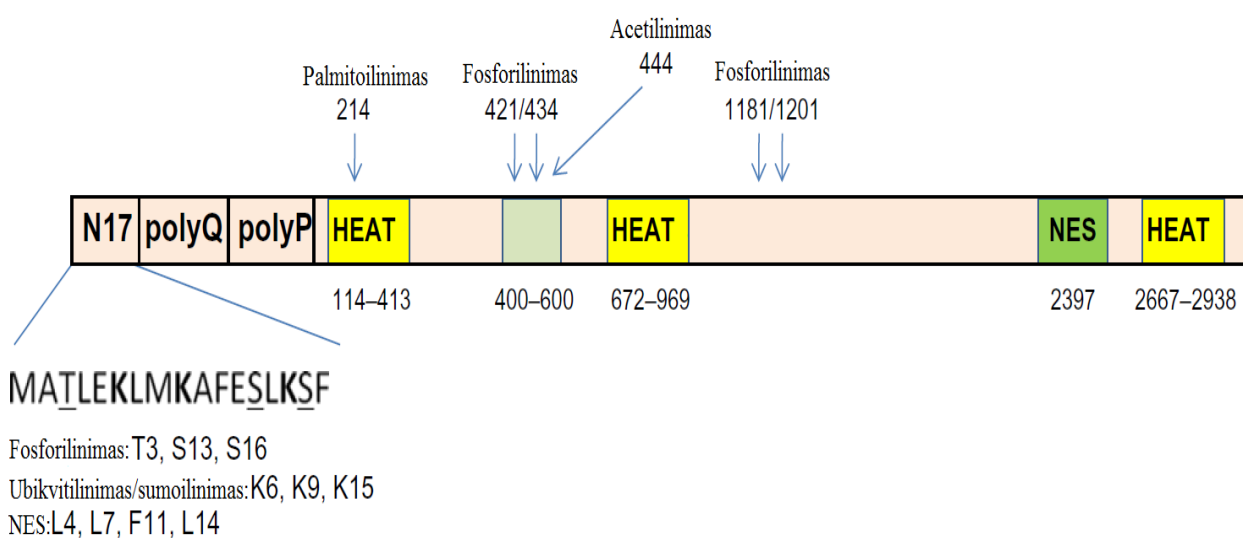
1.3. Baltymas hantingtinas

Htt genas koduoja baltymą hantingtiną, kuris yra maždaug 3114 aminorūgščių ilgio, apie 350 kDa molekulinės masės. Tyrimai parodė, kad poliQ seka, esanti htt baltyme, siejama su nervų reguliavimo funkcija, tačiau ji nereikalinga pagrindinėms baltymo funkcijoms (McFarland et al., 2011; Zheng et al., 2012). Šalia poliQ esanti seka dar gali būti vadinama poliprolino (poliP) domenu, kuris, kaip manoma, padeda išlaikyti baltymą tirpiu (1 pav.). PoliP domenas taip pat siejamas su baltymais, kurie sąveikauja su pernašos pūslelėmis (Schulte et al., 2011).

Htt turi 16 HEAT (Hantingtinas, Elongacijos faktorius 3, fosfatazės 2A subvienetas PR65/A) ir lipidų kinazė Tor1) domenus (Schulte et al., 2011). HEAT domenas yra maždaug 50 aminorūgščių ilgio, turi dvi antilygiagrečias alfa spirales formuojančias segtuką, kuris paprastai

dalyvauja baltymo-baltymo sąveikoje. HEAT domenai sudaro 3 klasterius (1 pav.). Biologinė šių domenų reikšmė htt baltyme nėra pilnai žinoma (Li et al., 2006; Ratovitski et al., 2012).

Hantingino baltyme gausu proteolitinio kirpimo vietų, kurios generuoja didelius kiekius N-galo fragmentų. Spėjamos htt proteazės: kaspazės, kalpainas, aspartoendopeptidazės, matriksometaloproteazės. Kaspazė3 *in vitro* kerpa ties 513 ir 552 a.r., kaspazė 2 ties 552 a.r., kaspazė 6 kerpa ties 586 aminorūgštimi. Dvi spėjamos kalpaino kirpimo vietos yra ties 469 ir 536 aminorūgštimi. Matriksometaloproteazė MMP-10 kerpa ties 402 aminorūgštimi. Mutavusios proteazių kirpimo vietos padaro baltymą labiau toksišką tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Tad manoma, kad pilno ilgio hantingino baltymo proteolitinis skaldymas yra svarbus HD patogenezės pradžia (Sousa et al., 2013; Zheng et al., 2012).



1 pav. Baltymo hantingino schematinis vaizdas. N17 regionas turi daug potransliacinių modifikacijų, tokių kaip fosforilinimas ar ubikvitilnimas. Už N17 regiono seka poliQ ir poliP regionai. Pastarojo funkcija pilnai nežinoma. Aminorūgščių sekoje tarp 400 ir 600 a.r. aptinkama aktyvi proteolitinio karpymo zona. Baltymas turi 16 HEAT domenų, susiskirsčiusių į tris grupes. C-galas turi NES seką, kuri gali lemti pilno ilgio htt buvimą citoplazmoje. Kita leucinais turtinga NES gali egzistuoti N17 regione (pritaikyta iš Zheng et al., 2012)

Htt turi nemažai potransliacinių modifikacijų. Baltymas yra ubikvitilnimas, fosforilinamas, acetilnimas, sumoilnimas, palmitoilinamas. Tai gali reguliuoti baltymo stabilumą, lokalizaciją ir funkcijas. Trys N-galo lizinai (K6, K9 ir K15) yra sumoilinami arba ubikvitilniami. Ubikvitilnimo tikslas – degradacija. Tuo tarpu sumoilinimas gali skatinti polyQkatalizuojamą neurodegeneraciją. N-gale taip pat gausu fosforilinimo vietų. Trečio treoninofosforilinimas gali turėti įtakos httagregacijai ir toksiškumui. Buvo pastebėta, kad IkappaBkinazės kompleksas fosforilinahtt ties 13 ir 16 serinais, kurie skatina gretimų lizinių modifikaciją, o tai apsaugo baltymą nuo agregacijos. PoliQ sekos pailgėjimas gali sumažinti httfosforilinimą, o tai lemia didesnę tikimybę baltymui mutuoti. Kitos fosforilinimo vietos: S421,

S434, S1181, S1201. Httacetilinimas ties 444 lizinu yra reikalingas baltymo degradacijai makroautofagijos būdu. Baltymo palmitoilinimas (HIP14 pagalba) C214 vietoje gali keisti agregaciją. PoliQ sekos pailgėjimas slopina HIP14 sąveiką su htt, taip sumažinamas baltymo palmitoilinimas, padaugėja baltymo tarpinių formų, skatinamas neurotoksiškumas(1 pav.)(Golas et al., 2016; Zheng et al., 2012).

Manoma, kad baltymas gali judėti tarp branduolio ir citoplazmos (Schulte et al., 2011). Laukinio tipo htt paprastai aptinkamas citoplazmoje, o mutavęs baltymas kaupiasi branduolyje, ypač sukarpyto baltymo N-galo fragmentai. Baltymo C-galas turi pernašos į branduolį seką (NES). Kita potenciali NES egzistuoja N-galo 17 aminorūgščių sekoje (N17 regionas) (1pav.). Seka sąveikauja su branduolio porų baltymais, kurie dalyvauja baltymų pernašoje iš branduolio į citoplazmą (Sousa et al., 2013; Zheng et al., 2012). N-galo domenai formuoja amfipatinės alfa spiralinės membranos domeną, kuris grįžtamai sąveikauja su endoplazminiu tinklu, endosomomis ir autofaginėmis pūslelėmis. Įvykus mutacijai, pastebimas baltymo kaupimasis branduolyje ir ląstelių toksiškumas(Schulte et al., 2011).

1.3.1. Baltymo hantingtino funkcijos

Ląstelės viduje htt yra siejamas su daugeliu organėlių, įskaitant branduolį, plazminę membraną, autofagines pūsleles, endoplazminį tinklą, endosomas, Goldžio aparatą, mitochondrijas(Zheng et al., 2012). Tai gali atspindėti atraminių baltymų funkciją, kuri susijusi su kompleksų sudarymu. Baltymas taip pat randamas aksonų procesuose ir sinapsėje, kur sąveikauja su mikrovamzdeliais, klattrinu dengtomis pūslelėmis, kaveolėmis, sinaptosomomis(Schulte et al., 2011).

Buvo pastebėta, kad htt turi įtakos embriono vystymuisi. Sumažinus šio baltymo sistezę, atsiranda neigiamas poveikis neurogenezei. Be to, htt yra reikalingas reguliuojant smegenų skysčio gamybą ir neuronų kalcio signalinius kelius. Httkompleksas su HIP1 yra svarbus kraujodaros metu. Baltymas dalyvauja BDNF turinčių pūslelių pernašoje aksonuose, o mutavęs baltymas suardo šį transportą. Hantingtino baltymas gali turėti įtakos transkripcijai, sąveikauti su transkripcijos faktoriais, koaktyvatoriais, korepresoriais ir taip paveikti transkripcijos faktorių veiklą. Be to, yra įrodymų, kad htt padeda palaikyti branduolio struktūrą (Mcfarland et al., 2011).

1.3.1.1. Sąveika su baltymais

Kaip spėjama, dėl pasikartojančių HEAT domenų, htt gali sąveikauti su daugybę skirtingų baltymų, lemiančių natyvaus ir mutavusio baltymo funkcijas. Baltymai gali jungtis tiek prie N-galo, tiek prie C-galo. Atsižvelgiant į tai, kad dauguma šių baltymų būna sintetiniai smegenyse,

htt sąveika su kai kuriais baltymais gali sukelti neurodegeneraciją ir Huntingtono ligos patologiją (Crick et al., 2013; Mcfarland et al., 2011; Sittler et al., 1998).

1.3.1.2. Sąveika su DNR

Hantingino baltymas netiesiogiai jungdamasis prie DNR gali dalyvauti transkripcijoje. Jis sąveikauja su įvairiais transkripcijos faktoriais ir transkripcijos reguliaciniais baltymais: CA150/TCERG1, TATA bloko jungiamieji baltymai (TBP), TAFII130, CtBP, mSin3A, NcoR, p53, CBP. Taip pat, htt gali jungtis su kitais baltymais, kurie sąveikauja su transkripcijos faktoriais, pavyzdžiui, optineurinu. Esant Huntingtono ligai, htt gali sąveikauti su DNR *in vivo* ir kontroliuoti smegenų veiklą. Naudojant pelės smegenų R6/2 ligos mechanizmą, chromatinoinmunoprecipitacijos (ChIP) metodu buvo parodyta sąveika su DNR. Nors naudojant šį metodą negalima atskirti tiesioginės arba netiesioginės sąveikos tarp htt ir DNR, kitų eksperimentų metu buvo parodyta, jog nesant pašalinių baltymų htt sąveikauja su DNR *in vitro* (Li et al., 2002; Mcfarland et al., 2011; Zheng et al., 2012).

1.3.1.3. Sąveika su membranomis ir pūslelėmis

Htt turi ne vieną vaidmenį ląstelės membranineje pernašoje. Hantinginas yra reikalingas aiškioje baltymų sekrecijos stadijoje: transportui iš endoplazminio tinklo į Goldžio aparatą, taip pat sekrecinių pūslelių sintezei ląstelės paviršiuje. Htt gali būti reikalingas formuojant egzocitozines pūsleles *trans*-Goldžio aparate ir jų pernašai iš Goldžio į plazminę membraną. Dineinas yra susijęs su pernaša tarp endoplazminio tinklo ir Goldžio komplekso, o kinezinas – su pernaša į plazminę membraną. Hantinginas su dineinu ir kinezinu sąveikauja per HAP1 (angl. *Huntingtin-associated protein*) ir tiesiogiai rišasi prie dineino tarpinės grandinės. Taip jis gali funkcionuoti kaip sekrecijos veiksnys, skatinantis pūslelių susijungimą su citoskeleto vamzdeliais ar veikiantis kaip molekulinis motorinių baltymų jungiklis prie mikrovamzdelių (Brandstaetter et al., 2014; Rüb et al., 2015).

Neuroninėse ląstelėse pernašos atstumas tarp endoplazminio tinklo, Goldžio aparato ir plazminės membranos yra labai didelis. Nedidelis sutrikimas pernašoje gali sukelti didelius defektus baltymų sekrecijoje, o tai gali prisidėti prie ligos patologijos. Manoma, kad neuronų membranine pernaša vyksta tuo pačiu principu, kaip ir paprastose ląstelėse, bet nervinių ląstelių morfologija šiuos procesus padaro sudėtingesnius (Brandstaetter et al., 2014). Nepaisant sudėtingos dendrito formos ir ilgo aksono, sąveikaudamas su įvairiais endocitoziniais/pernašos baltymais, tokiais kaip α -adaptinas, HIP1, HIP14, HAP1, HAP40, PACSIN1, SH3GL3, klatrinu ar dinaminu, htt gali dalyvauti ilgo ir trumpo nuotolio aksono transporte ir pūslelių pernešime (Suopanki et al., 2006).

1.3.1.4. Vaidmuo apoptozėje

Manoma, kad baltymas gali turėti antiapoptotinių savybių. Neuronuose sintetinant pilno ilgio htt, apsaugo juos nuo apoptozės, o baltymo funkcijos praradimas daro neuroną jautresnį apoptozei. Molekulinis antiapoptotinės funkcijos mechanizmas nėra pilnai žinomas. Pirmas galimas mechanizmas teigia, kad htt gali susijungti ir užkirsti kelią proapoptotinio Hip1-HIPPI komplekso susidarymui. Kitas galimas mechanizmas teigia, jog htt gali tiesiogiai blokuoti kaspazių 3 ir 9 aktyvaciją (Rangone et al., 2004; Suopanki et al., 2006).

1.3.1.5. Vaidmuo autofagijoje

Autofagija yra lizosominės degradacijos būdas. Manoma, kad htt gali atlikti autofaginių baltymų funkciją. Buvo atrasta, kad htt C-galo domenai gali sąveikauti su autofagijoje dalyvaujančios kinazės kompleksu, receptoriniais baltymais ir pačioje autofagijoje dalyvaujančiais baltymais. Teigiama, kad htt gali atlikti atraminio baltymo funkciją selektyvioje makroautofagijoje ar mikroautofagijoje. Htt mutanto ekspresija ir natyvaus baltymo netekimas siejamas su aksoniniu pūslelių, mitochondrijų ir autofagosomų pernašos sutrikimu *in vitro* ir *in vivo*. Tas pats sutrikimas matomas netekus autofagijoje dalyvaujančių baltymų (Ochaba et al., 2014; Schulte et al., 2011).

1.4. Baltymųamiloidinėagregacija

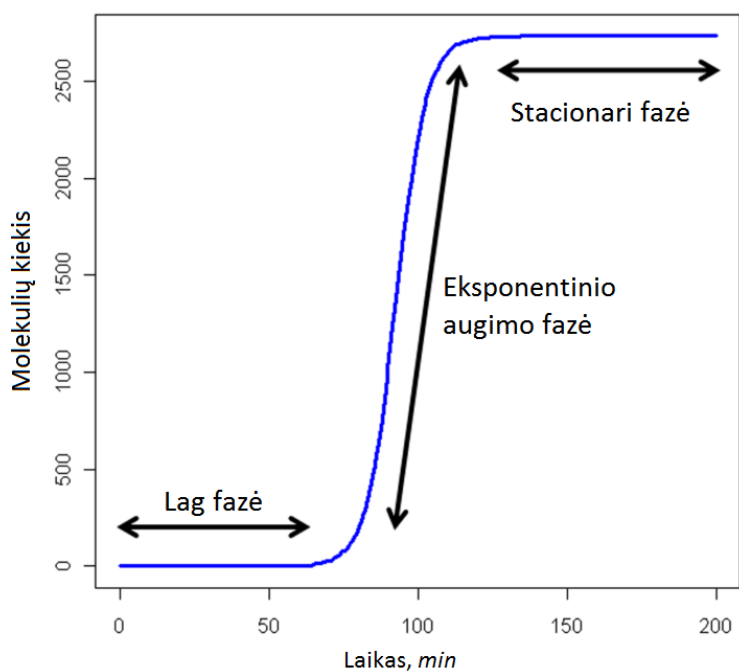
1.4.1. Amiloidiniųfibrilių charakteristika

Neurodegeneracinės ligos, kaip Alzheimerio, Hantingtono ar Parkinsono, yra siejamos su amiloidiniųfibrilių formavimusi. Nepaisant ligų skirtumų, visi amiloidiniai agregatai pasižymi panašia morfologija – sudaryti iš pasikartojančių β -klosčių, išsidėsčiusių statmenai fibrilės ašiai, yra ne šakotos struktūros, maždaug 10 nm pločio ir 0,1–10 μ m ilgio. Pavienės amiloidinėsfibrilės gali jungtis tarpusavyje, sudarydamos didesnes sankaupas (2 pav.)(Chiti et al., 2006; Sinha et al., 2001; Sipe et al., 2000; Zhang et al., 2009).

Amiloidiniųfibrilių formavimasis yra fizinis procesas, kurio metu nenatūralios formos baltymo molekulės sąveikauja tarpusavyje ir sudaro linijinius, biologiškai neaktyvius agregatus. Procesas siejamas su baltymų oligomerų susidarymu, branduolių susidarymu, linijinių agregatų ilgėjimu bei linijinių agregatų sulipimu į didesnes sankaupas, tačiau skiriami trys pagrindiniai agregacijos žingsniai: branduolių formavimas, fibrilių ilgėjimas (elongacija), stambesnių agregatų susidarymas(Mauro et al., 2007; Nielsen et al., 2001; Wetzel, 2006).

Tipinis amiloidogenezės procesas prasideda *lag* faze, kurios metu formuojasi branduoliai, o amiloidų virtimas fibrilėmis nėra pakankamai žymus, kad būtų aptinkamas. Šioje fazėje

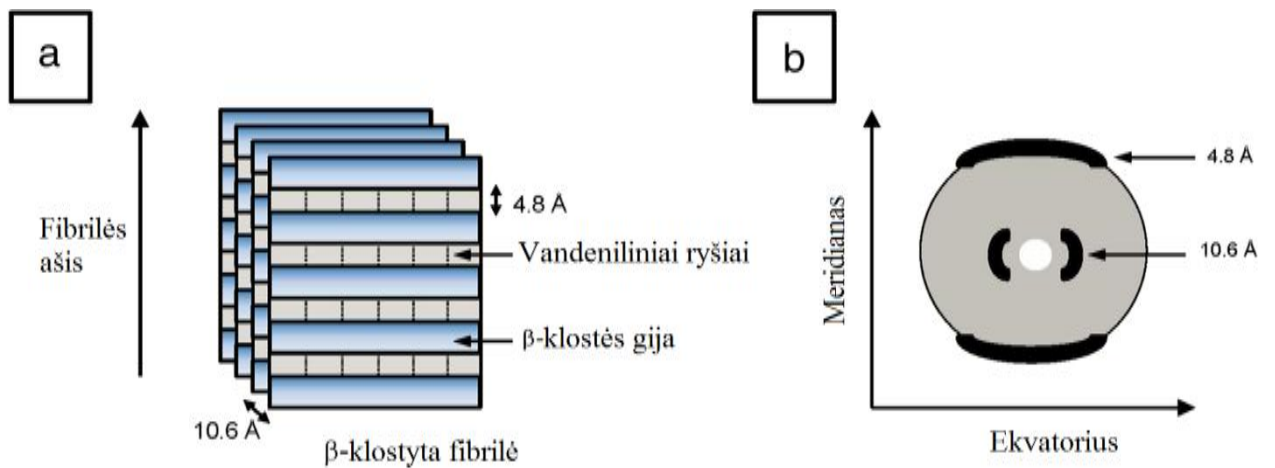
branduolių susidarymu yra laikomas kelių monomerų susijungimas į organizuotą struktūrą – fibrilių pirmtaką. Po to monomerams besijungiant prie branduolių, procesas perauga į elongaciją, kurioje greitai didėja fibrilių koncentracija. Elongacijos fazėje bet kokie agregatai, didesni už branduolį, virsta fibrile. Jai besiformuojant, galai atlieka branduolių vaidmenį ir reakcija vyksta tol, kol tirpale nebelieka monomerų – visas baltymas pavirsta į fibrilinius agregatus(2 pav.) (Lee et al., 2007; Lin et al., 2008; Milto et al., 2013).



2 pav. Tipinė agregacijos kinetikos kreivė. *Lag* fazėje agregacijos procesas yra labai lėtas, vyksta branduolių susidarymas. Kai tik pasiekiami kritinė branduolių koncentracija, procesas perauga į elongaciją, kurios metu matomas eksponentinis agregatų koncentracijos augimas. Tirpale nebelikus baltymo monomerų, agregacijos procesas nusistovi (stacionari fazė) (pritaikyta iš Proctor et al., 2010)

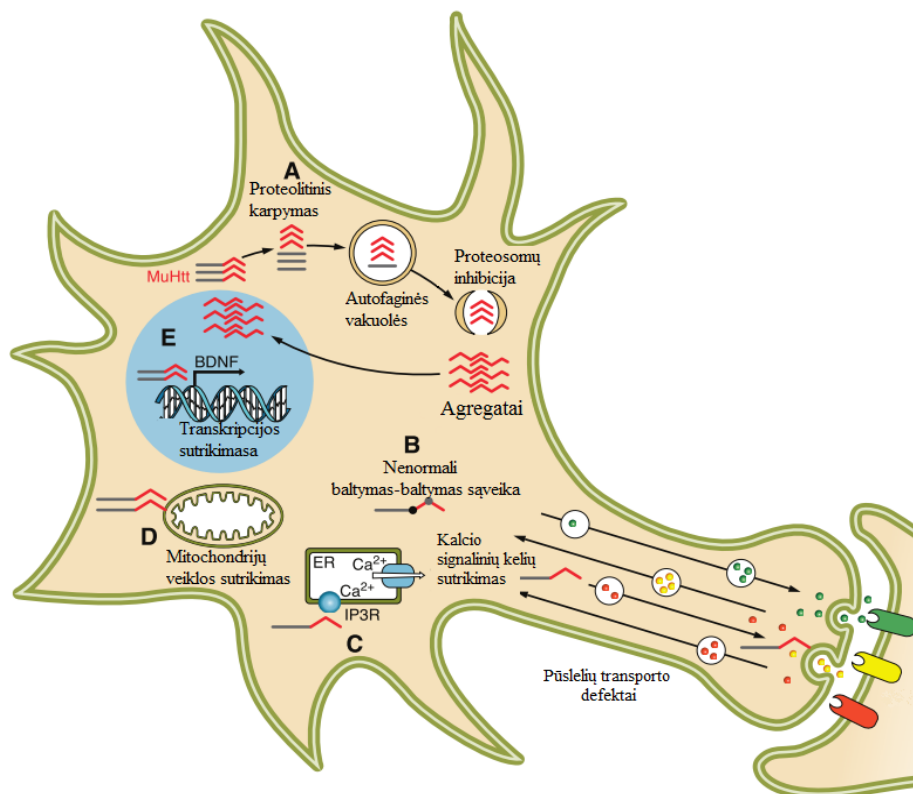
1.4.2. Baltymo hantingtinoagregacija

Poliglutamininis domenai yra netirpus vandenyje. Gan anksti buvo pasiūlyta, kad poliQ pagausėjimas sukelia baltymų agregaciją neuronuose. Taip pat buvo pastebėta, kad Huntingtono liga, ir kitos poliQ ligos, pasižymi baltymų agregatais centrinės nervų sistemos neuronuose. Tad yra priimta teigti, kad poliQ agregatai, turintys beta-klostytą struktūrą, yra amiloidinės fibrilės. Pagal tarptautinės amiloidozės draugijos teigimą, amiloidai yra apibūdinami charakteringu Rentgeno difrakcijos vaizdu, žinomu kaip „cross-beta“, ir Kongo raudonojo dažo jungimusi. Htt agregatai atitinka abu šiuos kriterijus (3 pav.) (Hoffner et al., 2014; Poirier et al., 2002).



3 pav. Schematinis β -kolstyų struktūrų vaizdas poliQ agregatuose. a) Klasikinis beta klostytu amiloidinių fibrilių vaizdavimas su atstumais tarp kloščių ir gijų. b) Tipinis amiloidinių fibrilių Rentgeno difrakcijos vaizdas ir matomi atstumai (pritaikyta iš Hoffner et al., 2014)

Hantingtono ligos molekulinis mechanizmas nėra iki galo išaiškintas. Manoma, kad gali būti keli ligos patologijos keliai, kurie tarpusavyje glaudžiai susiję (4 pav.).



4 pav. Manomas Hantingtono ligos mechanizmas (pritaikyta iš Zuccato et al., 2010)

Pirmuoju htt agregacijos žingsniu yra laikoma baltymo N-galo fragmentų susidarymas citoplazmoje (4 pav. A) (Arndt et al., 2015; Barbaro et al., 2015). Mutavęs baltymas citoplazmoje gali būti sukarpytas proteazių. Bandant ląstelei pašalinti toksiškus hantingtono peptidus, fragmentai yra ubiquitilinami ir siunčiami į proteosomas degradacijai. Tačiau HD metu jos

tampa mažiau efektyvios, nes netekus natyvaus htt baltymo sąvybėmis, sutrinka auofagijos mechanizmas. Taip citoplazmoje didėja N-galo fragmentų koncentracija, kurie turi dideles poliQ sekas ir yra linkę agreguoti. Šie fragmentai sąveikauja su įvairiais baltymais, taip trikdydami normalią jų veiklą (4 pav. B), taip sutrinka kalcio signaliniai keliai (4 pav. C) bei mitochondrijų veikla (4 pav. C) (Hoffner et al., 2014; Zuccato et al., 2010).

Yra nustatyta, kad mutavusio baltymo amiloidiniai agregatai kaupiasi branduolyje. Tai gali sutrikdyti normalią genų transkripciją (4 pav. E). Hantingtinas skatina BDNF (angl. *brain-derived neurotrophic factor*) baltymo raišką. Tad HD metu ji yra sutrikusi, o tai skatina smegenų degeneraciją. Dar viena žinoma htt funkcija – dalyvavimas pūslelių transporte. Manoma, kad HD metu N-galo fragmentai taip gali slopinti neuromediatorių pernašą bei patys tokiu keliu plisti į kitus neuronus (4 pav. F) (Hoffner et al., 2014; Zuccato et al., 2010).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

2 lentelė. Naudotos medžiagos ir jų gamintojai

Gamintojas	Medžiagos
<i>Acros Organics</i>	amonio chloridas 99,6 % amonio persulfatas 99,5 % dinatriohidrofosfatas 99 % dinatrio sulfatas 99 % glicerolis 99 % karbamidas (urėja) 99,5 % natrio chloridas (ypač švarus)
<i>Carl Roth Gmb H+Co</i>	agar-agaras ampicilino natrio druska 99 % ditiotreitolis (DTT) 99 % fenilmetanosulfonilfluoridas (FMSF) 99 % guanidino hidrochloridas 99,7 % kalio dihidrofosfatas 99 % <i>LuriaBroth</i> (LB) mitybinė terpė trincinas 99 % tris(hidroksimetil)aminometanas (TRIS) 99 %
<i>Fisher Scientific</i>	akrilamidas/bisakrilamidas 37,5:1 dekstrozė etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) 99 % imidazolas 99 % kalio chloridas laktozė magnio chloridas 99 % magnio sulfatas 99,5 % molekulinės masės žymuo „ <i>PageRulerBroad Range</i> “ molekulinės masės žymuo „ <i>UnstainedProtein</i> “ natrio dihidrofosfatas 99 % natrio dodecilsulfatas (NDS) 99 % poliakrilamido gelių dažas „ <i>EZ Run BP 2620-1</i> “; tetrametiletlenodiaminas (TEMED) triptonas
<i>Oxoid</i>	mielių ekstraktas
<i>Sigma</i>	tripsinas

2.1.2. Sorbentai

GE Healthcare: „*IMAC Sepharose*™ 6 Fast Flow“; „*Superdex*™ 200“

Ataušinus iki kambario temperatūros, pridėdama Mg druskų, gliukozės ir steriliai nufiltruojama.

- **ZYM-5052 autoinduktyvumybė:** terpės ruošimo protokolas aprašytas (Studier, 2005) literatūros šaltinyje.

2.1.6. Laboratorinė įranga

- Autoklavas „AHS-75N” (Raypa).
- Centrifugos: „Sprout Mini“ su F-45-18-11-Kit rotoriumi (Eppendorf), „HiCen SR“ su AF 6.500, AF 8.50.2 ir AS 4.500 rotoriais (HeroLab).
- Chromatografinė sistema „Äkta Purifier“ (GE Healthcare).
- Chromatografinės kolonėlės: „XK 26/20”, „Tricorn 10/300“ (GE Healthcare); „POROSHELL 300SB-C8“ (Agilent).
- Elektroforezės aparatas „Minigel-Twin“ su „PS 300 T“ srovės šaltiniu (Biometra).
- Homogenizatorius *Potter-Elvehjem* (Sigma–Aldrich).
- Koncentratoriai „Amicon® Ultra–15“, kurių pralaidumas yra 10 kDa (Fisher Scientific).
- Magnetinės maišyklės: „ARE“ (VelpS científica), „VARIOMAG Maxi Direct“ (Fisher Scientific).
- pH metras „Orion Dual Star pH/ISE“ (Fisher Scientific).
- Spektrofotometras „UV-1800” (Shimadzu Scientific).
- Sūkurinė maišyklė „Classic Vortex Mixer“ (Velp Scientifica).
- Svarstyklės: „PCB 1000–2“ (Kern & Sohn), „TP-214“ (Denver Instruments).
- Termostatas „IB-15G“ (Fisher Scientific).
- Termostatinė purtyklė: „KS 4000i“ (IKA), „MHR 23“ (Ditabis).
- Ultragarsinis homogenizatorius „Sonopuls HD 3100“ (Bandelin).
- Vakuuminė filtravimo sistema (Sigma–Aldrich).
- Vandens valymo sistema „Simplicity UV system“ (Millipore).

2.2. Metodai

2.3. Baltymų ekspresija

Plazmidė pGEX-6P, turinti GST-htt-ex1-19Q baltymą koduojantį geną, temperatūrinio šoko transformacijos metodu transformuojama į kompetentines *E. coli* BL(21) Star™ (DE3) ląsteles. Transformuotos ląstelės užsėjamos ant *Petril* ekštelių su agarizuota *Luria Broth* (LB) terpe, kurioje yra 100 mg/L ampicilino, ir auginamos per naktį 37 °C temperatūroje. Į 100 mL LB mitybinės terpės, kurioje yra 100 mg/L ampicilino, špateliu užsėjama viena kolonija nuo

Petri lėkštelės ir auginama per naktį 37 °C temperatūroje, purtant (220 aps/min) (naktinė kultūra). Kitą dieną į kolbas su 400 mL ZYM-5052 autoinduktyvios terpės (dieninė kultūra), kurioje yra 100 mg/L ampicilino, užsėjama po 1 mL naktinės kultūros. Ląstelių kultūra auginama 37 °C temperatūroje 24 valandas, purtant (220 aps/min). Vėliau biomasė centrifuguojama 30 min. 4 °C temperatūroje 5000 x g, supernatantas nupilamas, o biomasė užšaldoma -80 °C temperatūroje iki tolimesnio gryninimo etapo.

2.4. Baltymų gryninimas

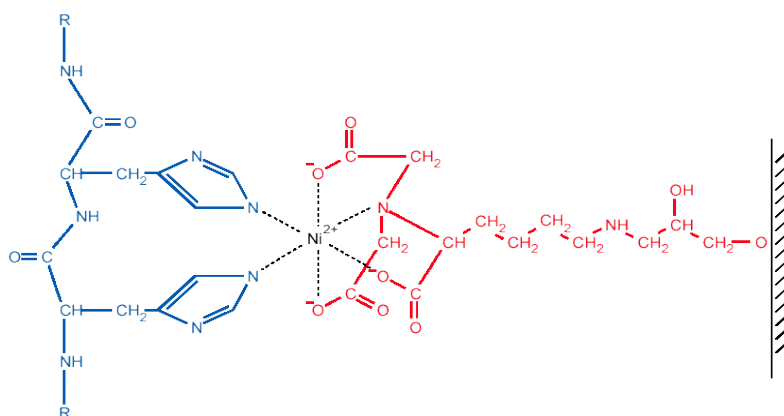
Baltymų gryninio metodika buvo sudaryta naudojantis literatūros šaltiniais (Bennett et al., 2002; Bugg et al., 2012; Fodale et al., 2014; Li et al., 2002; W. Li et al., 2006; Nucifora et al., 2012; Scherzinger et al., 1999).

2.4.1. Biomasės ardymas

Užšaldyta biomasė atšildoma, užpilama 100 mL buferinio tirpalo **A** ir homogenizuojama *Potter–Elvehjem* homogenizatoriumi. Vėliau ant ledo 10 min ardoma ultragarsu 70 % galios darbiniais ciklais, kas 60 s darant 60 s pertraukas. Suardyta biomasė centrifuguojama 10 min, 4 °C temperatūroje 17000 aps/min. Kadangi tiksliniai baltymai ekspresuojami tirpūs, po centrifugavimo jie lieka supernatante.

2.4.2. Giminingumo chromatografija

Gautas baltyminis mišinys praskiedžiamas buferiniu tirpalu **A** iki 150 mL ir sumaišomas su nikelio jonais pakrautu sorbentu *SepharoseTM 6 Fast Flow* (4 °C, 80 aps/min, 2 val.). Tikslinis baltymas specifiskai rišasi prie sorbento per histidininę uodegą (6 pav.). Taip paruoštu sorbentu pakraunama kolona (sedimentacijos būdu). Baltymų gryninimas vykdomas *Äkta Purifier* chromatografinėje sistemoje. Buferiniu tirpalu **A** atplaunami specifiskai neprisirišę baltymai. Tikslinio baltymo elucija vykdoma sudarant laiptinį gradientą buferiniu tirpalu **B**.



6 pav. Sąveika tarp histidiniais gausios baltymo uodegos ir nikelio jono, kuris koordinaciniu ryšiu jungiasi su sorbentoligandu NTA (nitrotriacto rūgštis) (pritaikyta iš Rowinska-Zyrek et al., 2013)

Siekiant didesnio šiukšlių atskyrimo, buvo išbandyti 5 skirtingi buferinių tirpalų variantai ir pasirinktas tas, kuris padeda atskirti didesnę šiukšlių kiekį (3 lentelė).

3 lentelė. Buferinių tirpalų variantai, naudoti giminingumo chromatografijoje

Variantas	Buferinių tirpalų sudėtis
1	A 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM FMSF, pH 7,4
	B 500 mM imidazolo, 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM FMSF, pH 7,4
2	A 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8
	B 500 mM imidazolo, 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM FMSF, pH 8
3	A 5 mM imidazolo, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM FMSF, pH 8
	B 500 mM imidazolo, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM FMSF, pH 8
4	A 5 mM imidazolo, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM FMSF, pH 9
	B 500 mM imidazolo, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM FMSF, pH 9
5	A 10 mM imidazolo, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM FMSF, 0,25 mM DTT, pH 8
	B 250 mM imidazolo, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM FMSF, 0,25 mM DTT, pH 8

Baltymų eliucija vykdoma imidazolo druskų gradientu. Tikslinio baltymo frakcijos apjungiamos tolimesniems etapams.

2.4.3. Dializė

Apjungtos baltymo frakcijos supilamos į dializės žarną. Baltymas dializuojamas buferiniame tirpale **C** (4 lentelė) 4 °C temperatūroje, esant 80 aps/min, tris kartus pakeičiant po du litrus buferinio tirpalo kas tris valandas. Po dializės baltymas nufiltruojamas naudojant 0,22 µm porų dydžio filtrą.

Dializės metu buvo išbandyti 5 buferiniai tirpalai (3 lentelė). Tačiau negavus teigiamų rezultatų, buvo atsisakyta šio metodo.

4 lentelė. Dializėje naudotų buferinių tirpalų variantai

Variantas	Buferinių tirpalų sudėtis
1	PBS, pH 7,4
2	100 mM fosfatinis buferis, pH 8
3	50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8
4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM FMSF, 1 mM EDTA, pH 8
5	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM FMSF, 0,25 DTT, pH 8

2.4.4. Gelfiltracija

Esant nestabiliam baltymui, labai svarbu procesų trukmė. Greitam buferio pakeitimui gali būti naudojama gelfiltracija. Tam baltymas per užnešimo kilpą užnešamas ant chromatografinės kolonėlės *Tricorn 10/300*, kuri yra pakrauta *Superdex 75* sorbentu. Eliucija yra vykdoma 1 mL/min greičiu, leidžiant buferinį tirpalą **D** (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM FMSF, 0,25

DTT, pH 8). Šis burefinis tirpalas pasirinktas tam, kad būtų patogų baltymo tirpalą naudoti tolimesniuose etapuose. Baltymo frakcijos apjungiamos kartu.

Baltymo koncentracija nustatoma išmatuojant baltymo tirpalo absorbciją esant 280 nm bangos ilgiui ir apskaičiuojant pagal formulę:

$$C (\text{Mol/l}) = A/\varepsilon * l \quad (1)$$

kur A – baltymo tirpalo optinis tankis ($\lambda = 280 \text{ nm}$), ε – baltymo ekstinkcijos koeficientas ($47580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l – optinio kelio ilgis (1 cm).

2.4.5. Baltymų sukonzentravimas

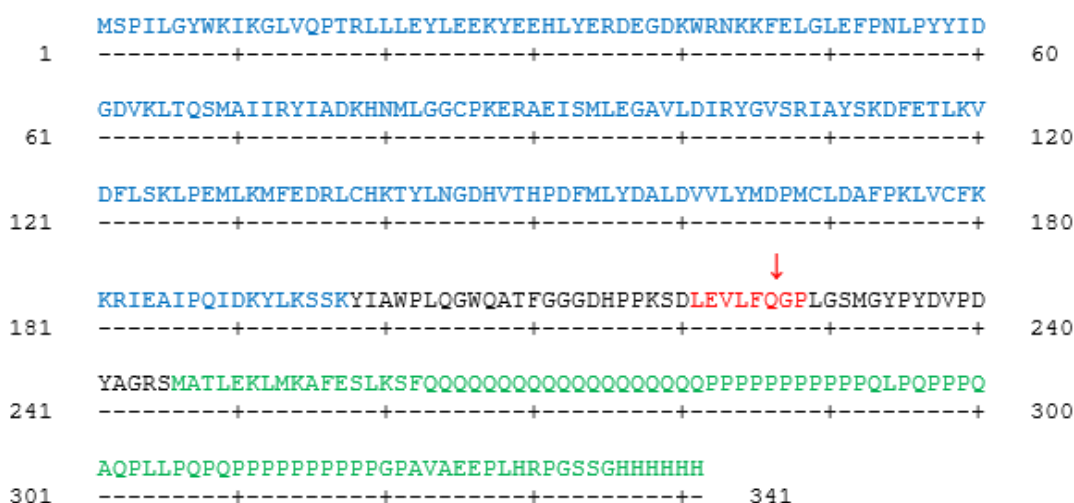
Kadangi darbo metu gaunasi dideli baltymo tūriai su mažomis koncentracijomis, vykdomas baltymų sukonzentravimas. Baltymo tirpalas koncentruojamas su 10 kDa pralaidumo centrifuginiais koncentratoriais (centrifuguojama $4 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje prie $4000 \times g$), stengiamasi pasiekti $0,5 \text{ mg/mL}$ koncentraciją.

Baltymų sukonzentravimo metu matoma didelė baltymų agregacija, tad nuspręsta atsisakyti šio etapo.

2.5. Baltymo proteolitinis karpymas

2.5.1. HRV 3C proteazė

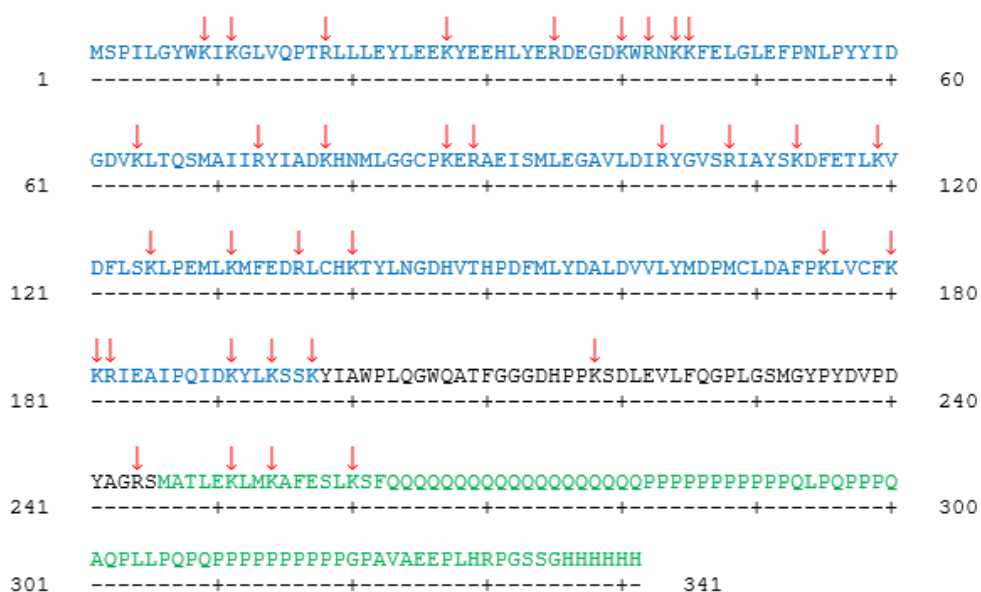
Išgrynintas baltymas turi HRV 3C proteazės kirpimo vietą (7 pav.). Glutathiono S-transferazės (GST) baltymo nukirpimui vykdoma fermentinė reakcija, kurios metu 1 vnt. fermento karmo $0,1 \text{ mg}$ baltymo.



7 pav. GST-htt-ex1-19Q baltymo seka. Mėlynai pažymėtas GST baltymas. Žaliai – hantingino pirmasis egzonas. Raudonai – HRV 3C proteazės atpažinimo seka. Raudona strėlė žymi vietą, ties kuria kerpa proteazė.

2.5.2. Tripsinas

Remiantis literatūros šaltiniais (Scherzinger et al., 1997; Sittler et al., 1998), baltymo hidrolizei nuspręsta naudoti tripsiną. Tripsinas yra serino proteazė, kuri baltymo sekoje hidrolizuoja peptidinį ryšį šalia lizino ar arginino aminorūgščių (nebent šios aminorūgštys yra šalia prolino). Naudojant PeptideCutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/) įrankiu buvo sudarytas baltymo tripsinizacijos žemėlapis (8 pav.). Matoma, kad tripsinas tikslinio peptido sekoje peptidinį ryšį hidrolizuoja tik trijose vietose, taip nukirpdamas tik 15 aminorūgščių, o pagrindinis poliQ domenas lieka.



8 pav. GST-htt-ex1-19Q baltymo tripsinizacijos žemėlapis. Mėlynai pažymėtas GST baltymas. Žaliai – hantingino pirmasis egzonas. Raudonos strėlės žymi vietas, ties kuriomis kerpa tripsinas

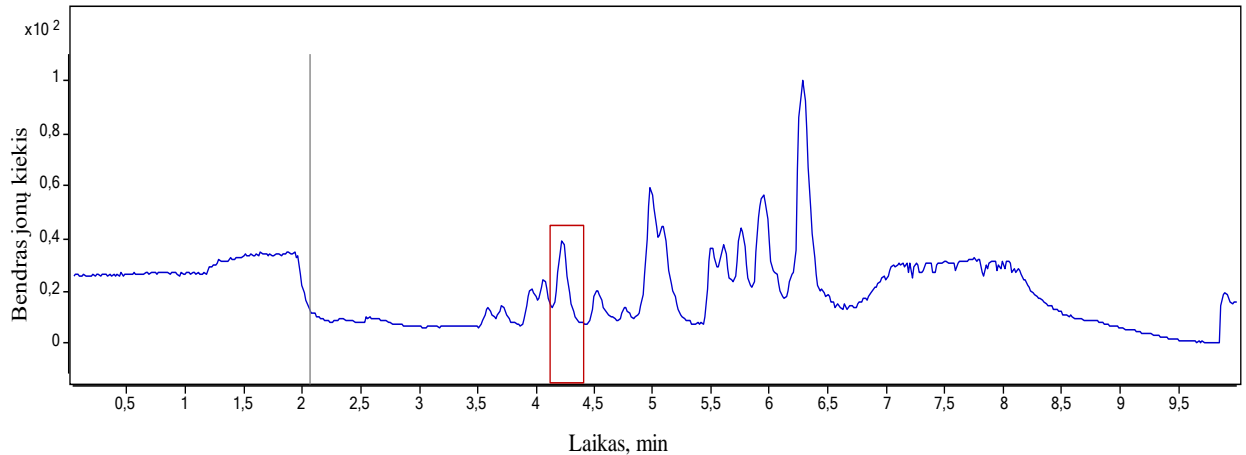
Fermentinei reakcijai tripsinas su baltymu maišomas santykiu 1:10, t.y., 1 mg tripsino hidrolizuos 10 mg tikslinio baltymo. Reakcija vykdoma 37 °C temperatūroje, pridėdant 2 mM CaCl₂. Baltymo tripsinizacija buvo stebima imant mėginius kas 15 min, o fermentinė reakcija stabdoma pridėdant elektroforezės užnešimo dažo ir mėginius iš karto iškaitinus 98 °C temperatūroje.

2.6. Peptidų analizė masių spektrometrijos būdu

Peptidų analizei naudojamas *Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF* masių spektroskopas, sujungtas su aukšto slėgio chromatografine sistema. Peptidų frakcionavimui naudota *Agilent Poroshell 300SB-C8* atvirkščių fazių chromatografinė kolonėlė. Tripsinizacijos metu kas 15 min stabdoma fermentinė reakcija pridėdant 6 M guanidino ir kiekvienas mėginys analizuojamas masių spektrometrijos būdu. Taip galime stabėti kada atsiranda tikslinis peptidas ir parinkti tinkamiausią tripsinizacijos laiką, kol neprasidėjo nespecifinis tripsino karpymas.

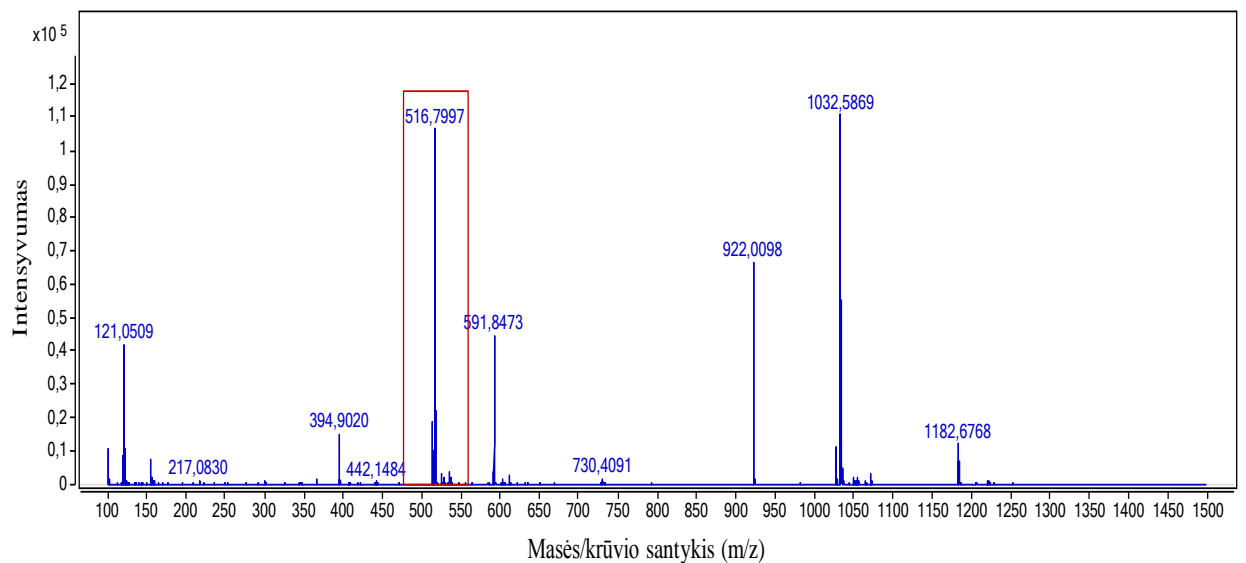
2.6.1. Duomenų analizė

Masių spektrų analizė buvo atliekama *Agilent MassHunter Qualitative Analysis* kompiuterine programa. Kiekvienam mėginiui yra gaunama chromatograma (9 pav.), kurios kiekvienas pikas turi savo atitinkamą masių spektrą (10 pav.). Visos chromatogramos smailės buvo analizuojamos atskirai.



9 pav. Masių spektrometrijos chromatogramos pavyzdys. Raudonai apibraukta viena analizuojama smailė.

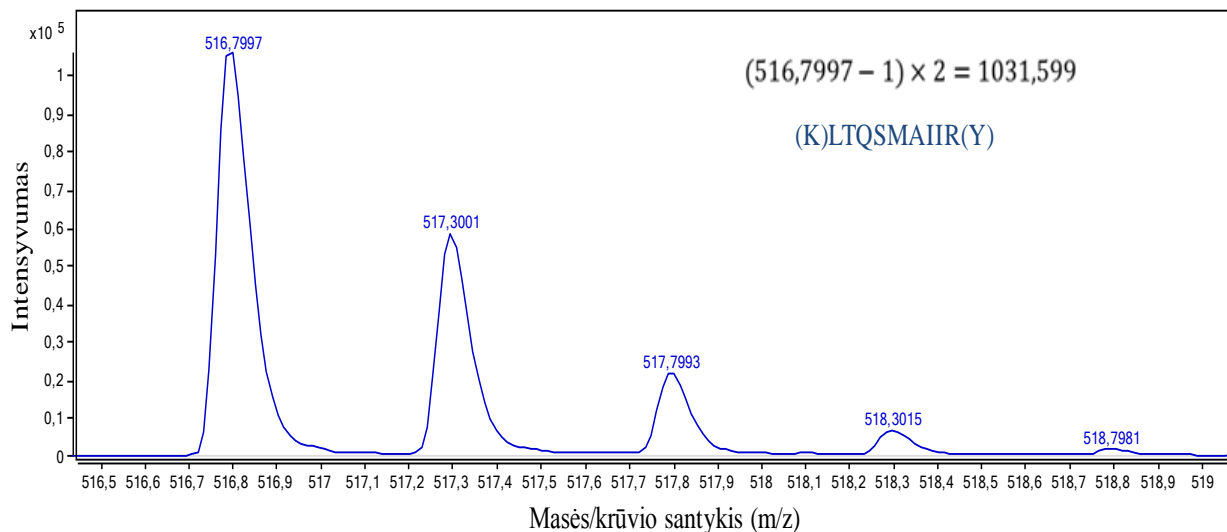
Chromatogramoje pasižymėjus tam tikrą smailę (9 pav.), gaunamas jos masių spektras (10 pav.).



10 pav. Masių spektras, atitinkantis 9 paveikle raudonai apibrauktą chromatogramos smailę.

Kadangi tripsinizacijos metu susidaro nedideli peptidai, kurie gali chromatogramoje persidengti, jų masės skaičiuojamos rankiniu būdu. Kiekviena masių spektro smailė yra prisiartinama (11 pav.) ir nustatomas peptido jonizacijos laipsnis. Gamtoje egzistuoja skirtingi cheminių elementų izotopai ir jų kiekis atsispindi masių spektre. Kelios smailės, matomos 11 pav. atsiranda dėl izotopų pasiskirstymo. Jonizacijos laipsnis yra atvirkščiai proporcingas žingsniui tarp šių smailių, tad 11 paveiksle matomo spektro jonizacijos laipsnis būtų $1/(517,3-$

$516,8)=2$. Žinant masės/krūvio santykį bei jonizacijos laipsnį, apskaičiuojama peptido monoizotopinė masė (11 pav.). Tokia procedūra atliekama su visomis masių spektro smailėmis visoje chromatogramoje.



11 pav. Priartintas 10 paveiksle raudonai apibraukta masių spektro smailė. Pateikiamas monoizotopinės masės skaičiavimo pavyzdys, bei identifikuotas peptidas.

Apskaičiavus monoizotopines peptidų mases, jie identifikuojami naudojantis FindPept įrankiu (<http://web.expasy.org/findpept>).

2.7. Elektroforezė

NDS-PAAG elektroforezės geliai ruošiami pagal žemiau pateiktą lentelę (5 lentelė). Pirmiausia ruošiamas 12 % gelis, jį sumaišius, mišinys pilamas tarp dviejų stiklinių elektroforezės plokštelių, ant viršaus užpilama dejonizuoto vandens. Po 40 min., kai gelis pilnai polimerizuojasi, ruošiamas 4 % gelis. Nusiurbus vandenį nuo skiriamąjo gelio, pilamas koncentruojamojo gelio mišinys ant viršaus ir įstatomos „šukos“ (meginių šulinėliams). Geliui sustingus, po 30 min elektroforezės plokštelės įstatomos i elektroforezės aparatą. Aparato talpyklos užpildomos elektroforezės buferiu. Elektroforezės metu palaikoma 30 mA srovė su 300 V įtamos riba. Pasibaigus procesui, gelis išimamas iš stiklinių plokštelių, skalaujamas dejonizuotu vandeniu. Praplovus gelį, jis dažomas poliakrilamido gelių dažu, po to paliekamas dejonizuotame vandenyje išryškėti.

5 lentelė. NDS-PAAG elektroforezės gelių sudėtis

Skiriamasis 12 % gelis		Koncentruojamasis 4 % gelis	
H ₂ O	2,55 mL	H ₂ O	1,27 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,53 mL	1,5 M Tris-HCl pH 6,8	500 µL
40% AA/BAA	1,83 mL	40% AA/BAA	201 µL
10% NDS	61 µL	10% NDS	20 µL
10% APS	30,5 µL	10% APS	10 µL
TEMED	3,65 µL	TEMED	2 µL

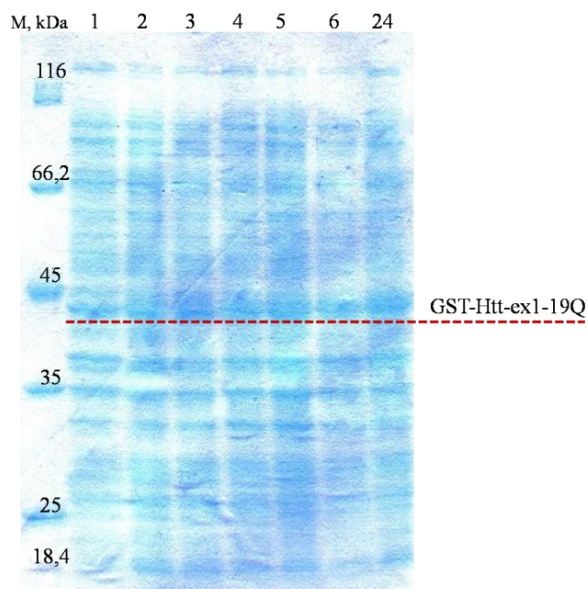
Mažų peptidų elektroforetiniam skirstymui NDS-PAAG elektroforezė netinka. Tam yra naudojama didesnės raiškos Tricino-NDS-PAAG elektroforezės metodas, kurio protokolas yra pateikiamas literatūros šaltinyje (Schägger, 2006).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Baltymų ekspresija

Plazmidė pGEX-6P, su įklonuotu baltymo GST-htt-ex1-19Q genu, sėkmingai transformuota į kompetentines *E. coli* BL21 Star™ (DE3) ląsteles. Gauti transformantai auginti auto-indukcinėje ZYM-5052 terpėje. Ši terpė pasirinkta dėl savo kaštų ir didesnės biomasės išėigos. Auginant ląsteles ZYM-5052 mitybinėje terpėje gaunama iki 4 kartų daugiau biomasės, lyginant su biomase, auginama Luria Broth mitybinėje terpėje (Studier, 2005).

Rekombinantinio GST-htt-ex1-19Q raiška patikrinta paėmus mėginius iš auginamos kultūros ir atlikus jų analizę NDS-PAAG elektroforezės metodu (12 pav.).



12 pav. GST-htt-ex1-19Q baltymo raiška transformantuose. Skaičiai 1–24 nurodo, kiek valandų praėjus po dieninės kultūros užsėjimo buvo paimtas mėginys. M – molekulinės masės žymuo

Naudojantis ProtParam įrankiu (<http://web.expasy.org/protparam/>) apskaičiuota teorinė tikslinio baltymo molekulinė masė – 39069,80 Da. Tuomet remiantis 12 pav. nustatyta, kad baltymo ekspresija ląstelėse vyksta. Elektroforegamoje matoma baltymo juostelė žemiau nei 45 kDa molekulinės masės žymuo. Kadangi baltymo raiškos lygis auga kartu su kultūros auginimo laiku, visi transformantai buvo auginami 24 valandas po dieninės kultūros užsėjimo.

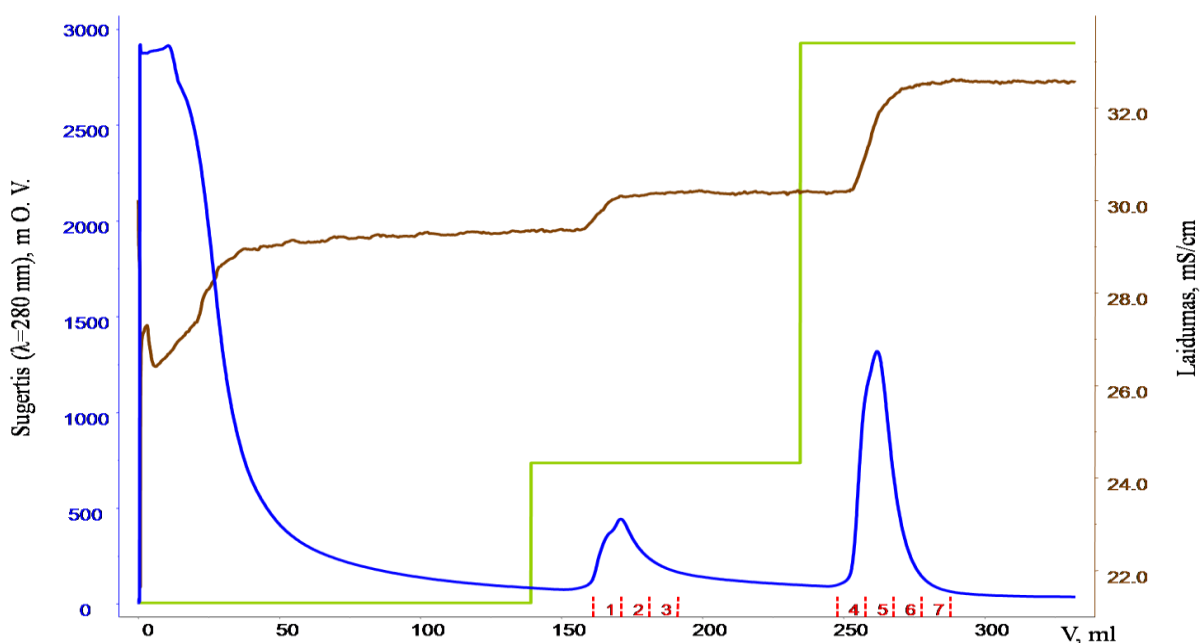
3.2. Afininė chromatografija

GST-htt-ex1-19Q baltymas C-gale turi 6 histidinių uodegėlę, kuri yra naudojama baltymų gryninimui. Nikelio jonais pakrautas sorbentas koordinaciniu ryšiu jungiasi prie baltymo

histidininės uodegos. Tokiu būdu nuo tikslinio baltymo galima pašalinti didžiąją dalį nespecifinių baltymų.

Glutathiono S-transferazė, kuri yra prijungta prie tikslinio peptido N-galo, dėl savo stipraus jungimosi su glutationu taip pat dažnai yra naudojama baltymų gryninime. Glutathiono sefrozės sorbentas labai specifiškai riša GST baltymą, taip gaunamas efektyvus vieno etapo baltymo gryninimas. Tačiau šis sorbentas yra žimiai brangesnis už IMAC sefrozės sorbentą, be to yra sunkiai regeneruojamas. Tad, atsižvelgiant į laboratorijos resursus, GST-htt-ex1-19Q baltymo gryninimui pasirinktas : „IMAC SepharoseTM 6 FastFlow“ sorbentas.

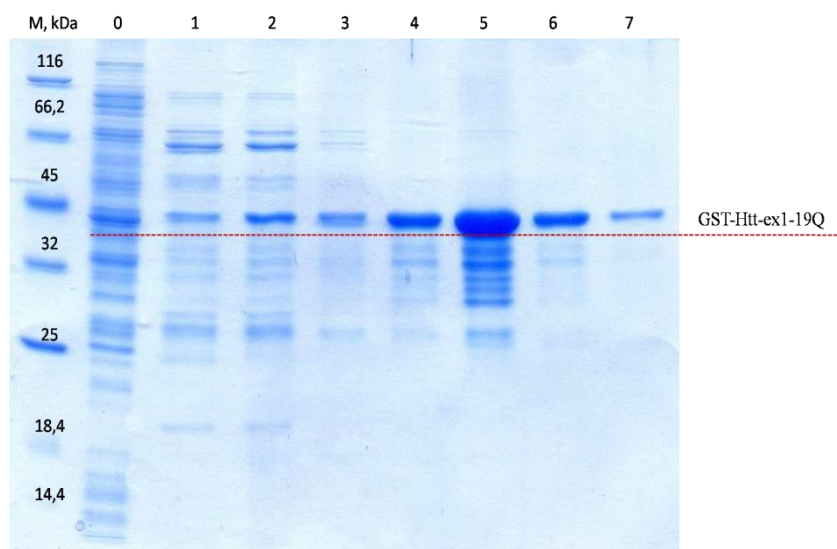
Baltymo gryninimas buvo vykdomas afininės nikelio chelatinės chromatografijos metodu. Baltymų elucija vykdoma sudarant laiptinį imidazolo druskų gradientą (13 pav.).



13 pav. Rekombinantinio GST-htt-ex1-19Q afininės chromatografijos chromatograma. Mėlyna linija – sugertis ($\lambda = 280$). Žalia linija – sudaromas imidazolo druskų gradientas. Ruda linija – laidumas (mS/cm). Raudonos punktyrinės linijos žymi surenkamų baltymų frakcijas.

Nespecifinių baltymų elucija vykdoma esant 25 % gradientui (70 mM imidazolo), o tikslinio baltymo elucija vykdoma esant 100 % gradientui (250 mM imidazolo). Iš visų frakcijų paimti mėginiai patikrinami NDS-PAAG elektroforezės metodu (14 pav.). Remiantis gauta elektroforegrama, tikslinio baltymo frakcijos apjungiamos tolimesniam procesui.

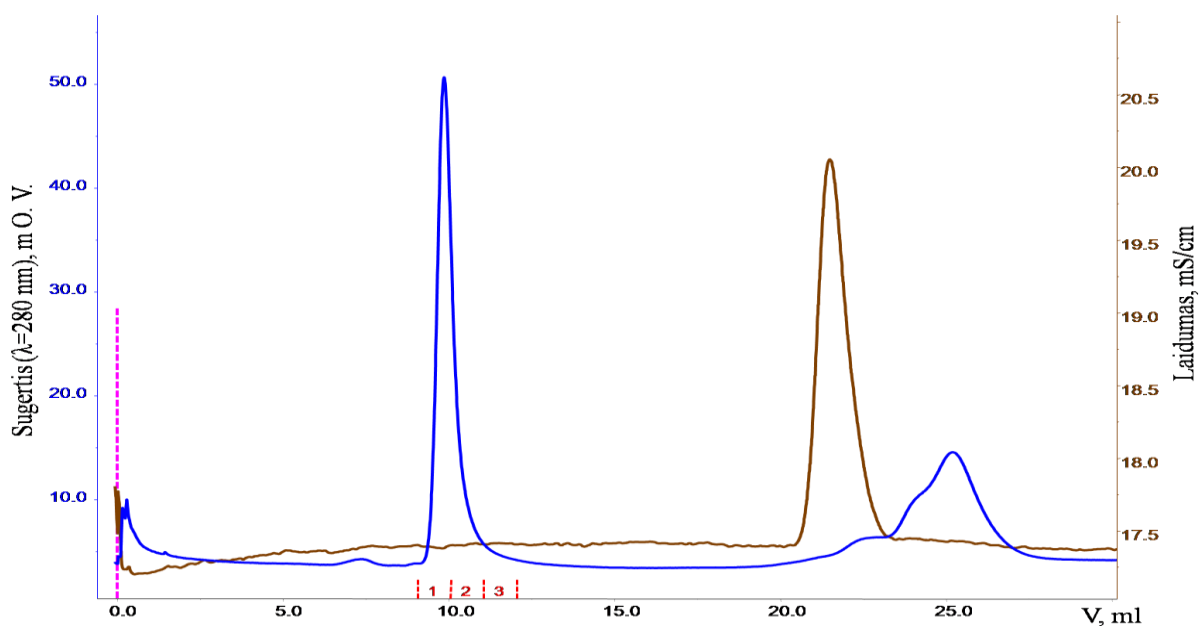
14 pav. pateiktoje elektroforegamoje matyti, kad tikslinis baltymas nėra visiškai grynas, matomos priemaišos. Atlikus didelį kiekį eksperimentų keičiant gryninimo sąlygas (2 lentelė), padaryta išvada jog baltymas gali būti neatsparus *E. coli* ląstelių proteazėms. Taip susidaro mažesni baltymo fragmentai, kurie specifiškai rišasi prie sorbento ir eliuoja su didele imidazolo druskų koncentracija.



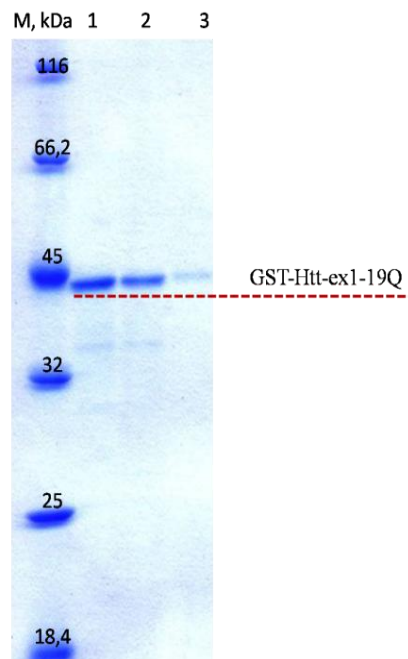
14 pav. Afininės chromatografijos metu surinktų baltymų frakcijų elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo. 0 – baltymų tirpalas prieš sumaišant su sorbentu. 1–3 – nespecifinių baltymų frakcijos, eliuotos 25 % gradientu. 4–7 – tikslinio baltymo frakcijos.

3.3. Dializė/gelfiltracija

Kadangi gautas baltymų tirpalas turi didelę imidazolo koncentraciją, baltymą reikia dializuoti. Darbo metu dializė buvo nesėkminga. Visais atvejais buvo netenkama beveik viso baltymo, koncentracija sumažėdavo apie 10 kartų. Dėl didelių baltymo nuostolių šio proceso buvo atsisakyta, o greitam buferio pakeitimui pasirinktas gelfiltracijos metodas (15 pav.). Surinktos baltymo frakcijos analizuojamos NDS-PAAG elektroforezės metodu (16 pav.). Įsitikinta, kad surenkamas tikslinis baltymas.



15 pav. Rekombinantinio GST-htt-ex1-19Q gelfiltracijos chromatograma. Mėlyna linija – sugertis ($\lambda = 280$). Ruda linija – laidumas (mS/cm). Raudonos punktyrinės linijos žymi surenkamų baltymų frakcijas. Rausva punktyrinė linija žymi baltymo injekcijos į sistemą laiką



16 pav. Gelfiltracijos metodo baltymo frakcijų elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo. 1–3 – atitinka surinktas frakcijas

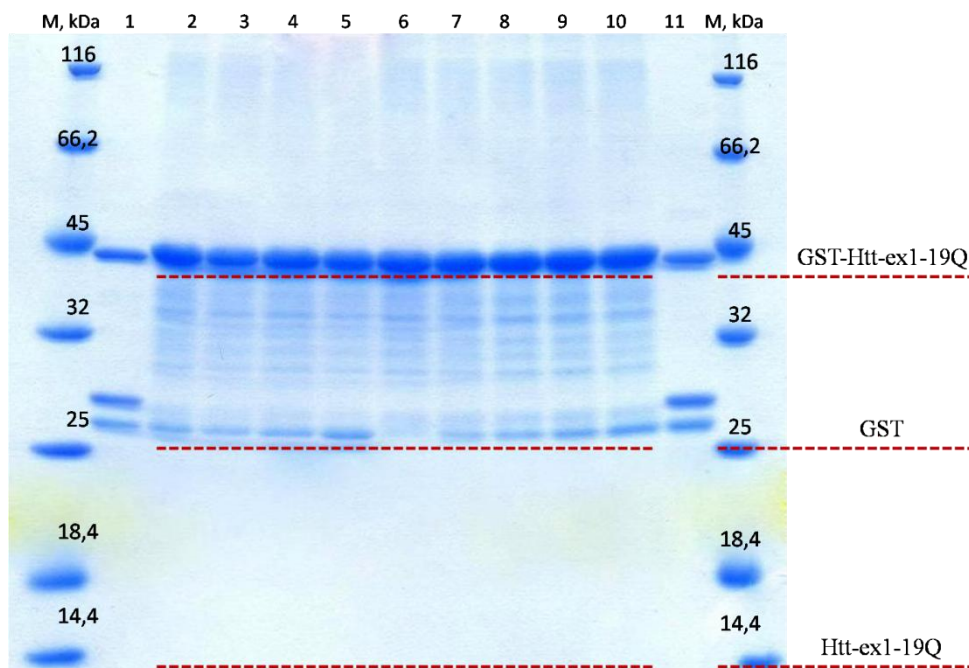
Kadangi afininės chromatografijos metu gaunasi dideli baltym tūriai, gelfiltracijos metodas kartojamas kelis kartus iš eilės, kol dializuojamas visas tikslinis baltymas.

Galiausiai apskaičiuojama tiksli gauto baltymo koncentracija, kuri reikalinga tolimesniems procesams.

3.4. Baltymo proteolitinis karpymas

3.4.1. HRV 3C proteazė

Ekspirimentų metu buvo išbandytos 28 skirtingos sąlygos, keičiant buferinį tirpalą, fermento/substrato santykį, inkubacijos laiką ir temperatūrą. Darbo metu nepavyko pamatyti proteazės aktyvumo ir gauti tikslinį peptidą (17 pav.).

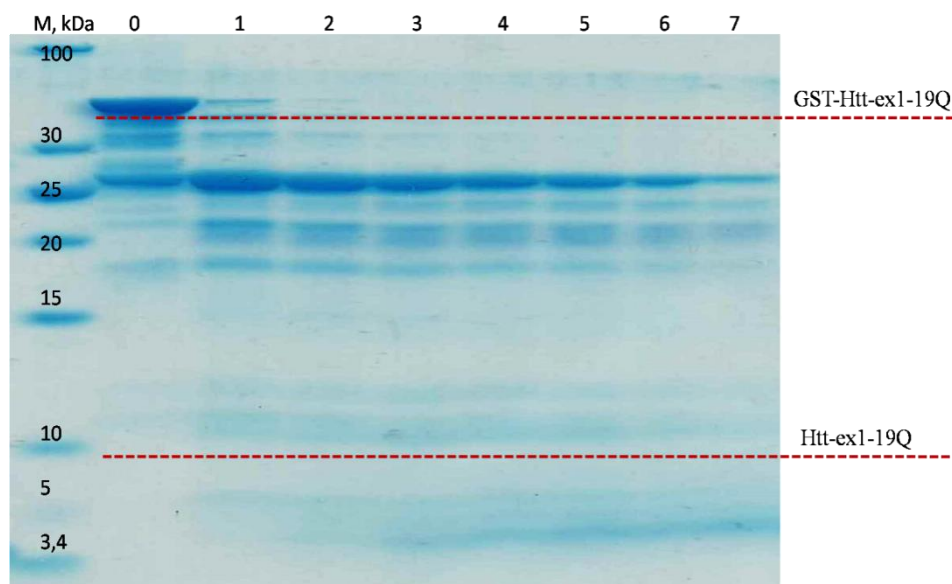


17 pav. HRV 3C proteazės fermentinių reakcijų elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo. 1,11 – dviejų skirtingų HRV 3C komercinių rinkinių teigiamos kontrolės. 2–5 – pirmojo HRV 3C komercinio rinkinio vykdomos reakcijos: 2) 1/1 (fermento/substrato santykis), 37 °C, 16 val. 3) 1/2, 37 °C, 16 val. 4) 1/1, 4 °C, 16 val. 5) 1/2, 4 °C, 16 val. 6 – neigiama kontrolė. 7–10 – lygiagrečiai vykdomos reakcijos su antrąja proteaze.

Visų pirma, po neigiamų rezultatų manyta, kad galbūt proteazė neteko savo aktyvumo. Tačiau atlikus eksperimentus su nauja proteaze, gauti tokie patys rezultatai. 17 paveiksle matoma, kad fermentai tikslinio baltymo nehidrolizuoja arba hidrolizuoja labai mažus kiekius, kuriuos sunku elektroforezės metu užfiksuoti bei naudoti tolimesniems procesams. Tad nuspręsta šiam eksperimentui ieškoti alternatyvos.

3.4.2. Tripsinas

Išnagrinėjus literatūrą (Poirier et al., 2002; Scherzinger et al., 1997, 1999; Sittler et al., 1998), kaip alternatyva HRV 3C proteazei, pasirinktas tripsinas – specifiskai kerpantis po lizinų ir argininų, kurių nėra mums dominančioje baltymo dalyje. Kadangi tripsinas gali karpyti ir nespecifiškai, pagrindinis tikslas buvo rasti optimaliausias tripsinizacijos sąlygas. Fermentinės reakcijos metu mėginiai buvo imami kas 15 minučių ir analizuojami Tricino NDS-PAAG elektroforezės metodu (18 pav.)



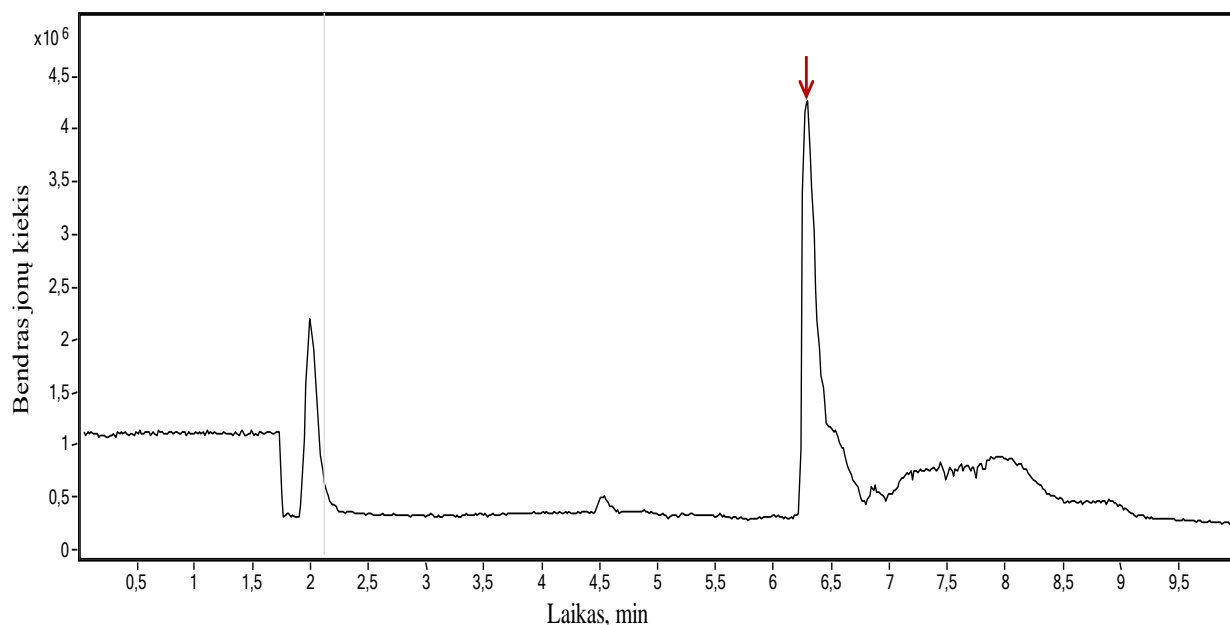
18 pav. Tripsino fermentinės reakcijos mėginių elektroforegrama. M – molekulinės masės žymuo. 0 – neigiama kontrolė (baltymo mėginys prieš fermentinę reakciją). 1–7 – mėginiai imti po 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 min atitinkamai.

ProtParam įrankiu (<http://web.expasy.org/protparam/>) buvo apskaičiuota teorinė tikslinio peptido masė – 8950,80 Da. Kadangi tripsinizacijos metu susidaro daug mažų peptidų, kurie greitai difunduoja iš gelio, elektroforegrama gaunama blanki. Tačiau ties 10 kDa molekulinio žymeniu matomas patamsėjimas. Manoma, kad ten turėtų būti tikslinis peptidas.

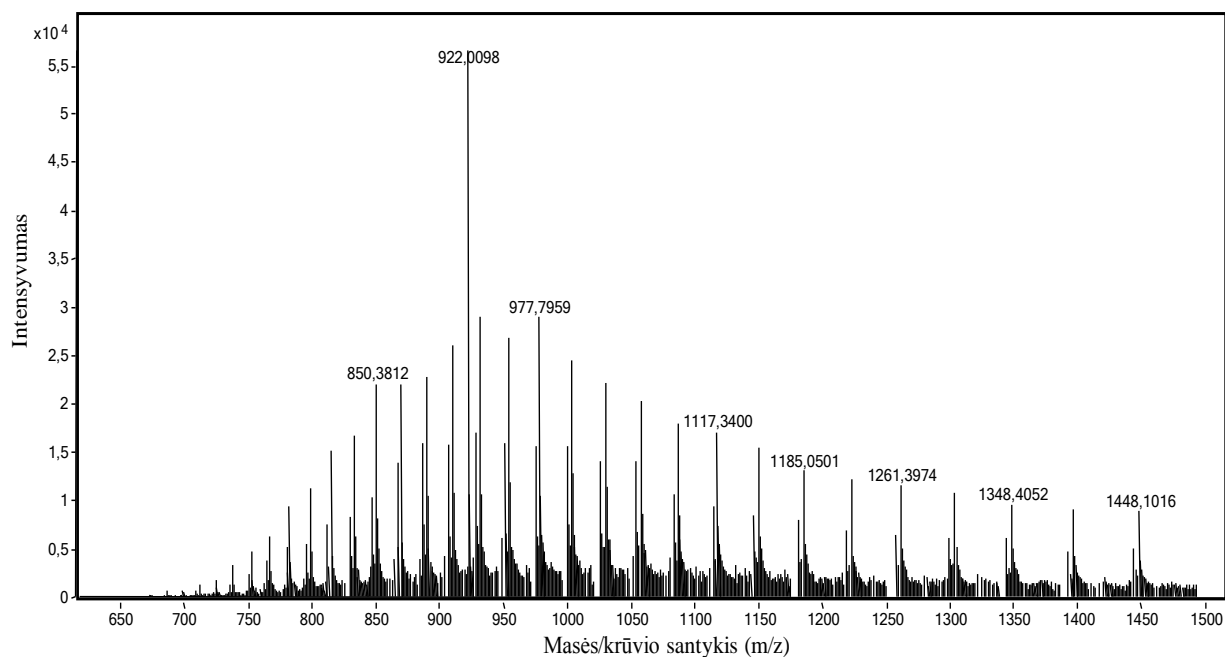
3.5. Masių spektrometrinė analizė

Norint pilnai įsitikinti, kad reikiamas peptidas tikrai gaunamas, bei tiksliai nustatyti tinkamiausią fermentinės reakcijos laiką, buvo atliekama tripsinizacijos metu susidariusių peptidų analizė masių spektrometrijos metodu.

Visų pirma, buvo nustatyta baltymo GST-htt-ex1-19Q masė – 39069,92 Da (apskaičiuota teorinė masė 39069,80 Da). Žemiau pateikta baltymo masių spektrometrijos chromatograma (19 pav.) bei masių spektras (20 pav.).

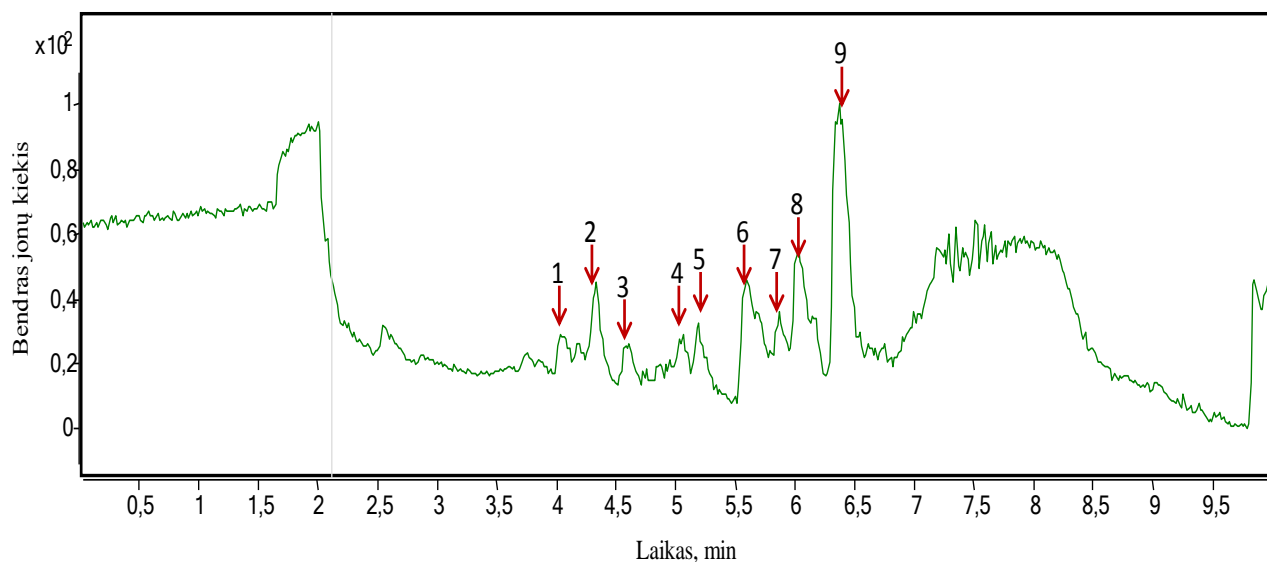


19 pav. Baltymo GST-htt-ex1-19Q masių spektrometrijos chromatograma. Raudona strėlė žymi tikslinio baltymo smaile, kuri naudota skaičiavimams.



20 pav. Baltymo GST-htt-ex1-19Q masių spektras.

Vėliau masių spektrometrijos metodu išanalizuoti 8 fermentinės reakcijos mėginiai, kai reakcija vyko 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 bei 120 minučių. Žemiau pateikiama trijų mėginių (15, 60, 120 min) analizės rezultatai.



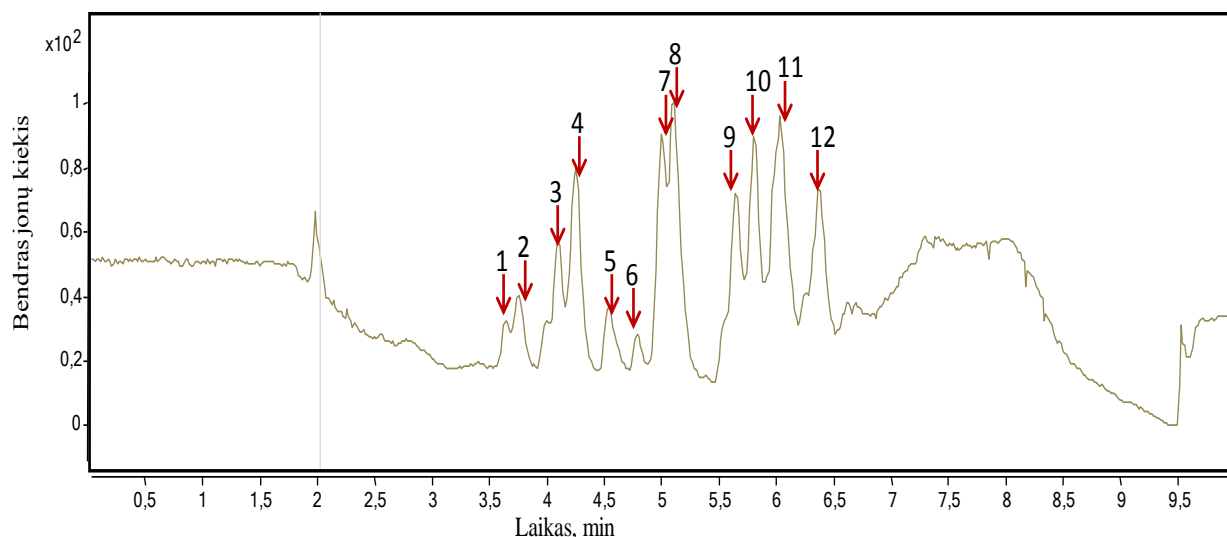
21 pav. 15 min tripsinizacijos reakcijos mėginio masių spektrometrinės analizės chromatograma. Raudonos sunumeruotos strėlės žymi analizuojamas smailes.

Po 15 minučių nuo fermentinės reakcijos pradžios baltymas jau yra gan apkarpytas, tačiau tikslinio peptido dar nebuvo galima aptikti. Išanalizuotų peptidų sąrašas pateikiamas 6 lentelėje. Lentelėje esančių peptidų numeracija atitinka chromatogramoje sunumeruotas smailes.

6 lentelė. 15 min tripsinizacijos reakcijos mėginio masių spektrometrinės analizės identifikuoti peptidai

Nr.	Monoizotopinė masė, Da	Aminorūgščių seka
1	1545,75±0,01	(R)YIADKHNMLGGCPK(E)
2	1031,59±0,01	(K)LTQSMAIIR(Y)
3	4029,12±0,01	(P)LLPQPQPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPGSSGHHHHHH
4	1093,57±0,01	MSPILGYWK(I)
5	1440,76±0,01	(K)DFETLKVDFLSK(L)
6	3154,54±0,01	(R)LLLEYLEEKYEEHL YERDEGDKWR(N)
7	2325,14±0,01	(K)YIAWPLQGWQATFGGGDHPPK(S)
8	2356,22±0,01	(M)LGGCPKERA EISMLEGAVLDIR(Y)
9	28328,52±0,01	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHL YERDEGDKWRNKKF ELGLEFPNLPYYIDGDV KLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERA EISM LEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKT YLNGDHSVTHPDFM LYDALDVVL YMDPMCLDAFPKLVCFKKRIE AIP QIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLV FQGPLGSMG YPYDVPDYAGR(S)

Darbo metu buvo nustatyta, kad tinkamiausias fermentinės reakcijos laikas yra 60 min. 22 paveiksle pateikiama masių spektrometrinės analizės chromatograma.



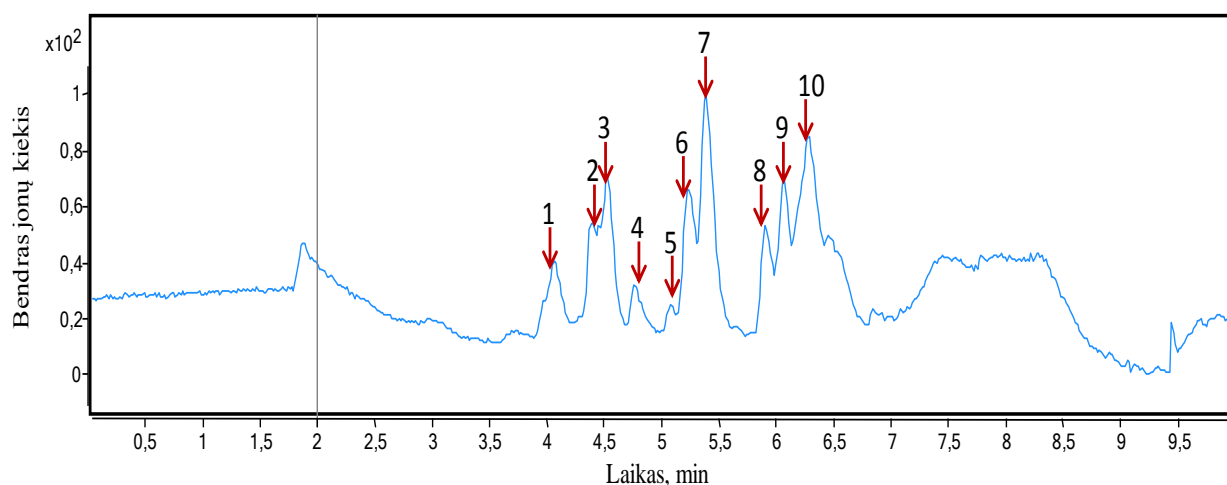
22 pav. 60 min tripsinizacijos reakcijos mėginio masių spektrometrinės analizės chromatograma. Raudonos sunumeruotos strėlės žymi analizuojamas smailes.

22 paveiksle 7 smailė atitinka tikslinį hantingtino pirmojo egzono peptidą. Remiantis visais gautais duomenimis, šioje chromatogramoje tikslinio peptido smailė, bei masių spektras yra intensyviausi. 7 lentelėje pateikiami 60 min tripsinizacijos metu susidariusių peptidų sąrašas.

7 lentelė. 60 min tripsinizacijos reakcijos mėginio masių spektrometrinės analizės identifikuoti peptidai

Nr.	Monoizotopinė masė, Da	Aminorūgščių seka
1	608,34±0,01	(K)LVCFK(K)
2	707,89±0,01	(K)VDFLSK(L)
3	729,41±0,01	(K)LPEMLK(M)
4	1031,58±0,01	(K)LTQSMAIIR(Y)
5	4029,09±0,01	(P)LLPQPQPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPGSSGHHHHHH
6	962,52±0,01	(M)SPILGYWK(I)
7	8951,17±0,01	(K)SFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPQLPQPPQQAQ PLLPQPQPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPGSSGHHHH H
8	1148,63±0,01	(R)LLLEYLEEK(Y)
9	1515,81±0,01	(R)AEISMLEGAVLDIR(Y)
10	2325,15±0,01	(K)YIAWPLQGWQATFGGDHPPK(S)
11	2845,35±0,02	(K)SDLEVLFGPLGSMGYPDVDPDYAGR(S)
12	4058,87±0,02	(K)TYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPK(L)

Viso fermentinė reakcija buvo vykdoma 2 valandas. 23 paveikle pateikiamas galutinio fermentinės reakcijos taško masių spektrometrinės analizės chromatograma.



23 pav. 120 min tripsinizacijos reakcijos mėginio masių spektrometrinės analizės chromatograma. Raudonos sunumeruotos strėlės žymi analizuojamas smailes.

Manoma, kad šiame laiko taške jau gali būti prasidėjęs nespecifinis tripsino karpymas, kadangi tikslinsi peptidas nebeaptinkamas. Identifikuoti peptidai pateikti 8 lentelėje.

8 lentelė. 120 min tripsinizacijos reakcijos mėginio masių spektrometrinės analizės identifikuoti peptidai

Nr.	Monoizotopinė masė, Da	Aminorūgščių seka
1	707,39±0,01	(K)VDFLSK(L)
2	729,41±0,01	(K)LPEMLK(M)
3	1181,67±0,01	(K)RIEAIPQIDK(Y)
4	4029,13±0,01	(P)LLPQPQPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPGSSGHHHHHH
5	962,52±0,01	(M)SPILGYWK(I)
6	1440,76±0,01	(K)DFETLKVDFLSK(L)
7	1148,64±0,02	(R)LLLEYLEEK(Y)
8	2268,14±0,01	(R)LLLEYLEEKYEEHLYER(D)
9	2325,15±0,02	(K)YIAWPLQGWQATFGGGDHPP K(S)
10	2356,20±0,03	(K)KFELGLEFPNLPYYIDGDVK(L)

Ne visų chromatogramų smailes atspindėjo po vieną peptidą, daug kur buvo matomas peptidų persidengimas. Tačiau rezultatuose pateikiama tik po vieną intensyviausiai matomą peptidą kiekvienoje chromatogramų smailėje.

Taigi, galima daryti išvadą, kad parinkus tinkamas fermentinės reakcijos sąlygas ir tinkamą laiką, galima išvengti tripsino nespecifinio karpymo ir gauti siekiamus rezultatus.

IŠVADOS

1. Baigiamojo darbo metu išgrynintas hantingtino pirmasis egzonas, sulietas su glutationo S-transferaze.
2. GST atskyrimas nuo tikslinio baltymo naudojant HRV 3C proteazę nebuvo sėkmingas.
3. Atlikus peptidų masių spektrometrinę analizę nustatyta, kad optimalus tikslinio baltymo atskyrimo nuo GST (kai tripsino – tikslinio baltymo santykis yra 1:10) laikas yra 60 min.

NAUDOTA LITERATŪRA

Arndt, J. R., Kondalaji, S. G., Maurer, M. M., Parker, A., Legleiter, J., Valentine, S. J. 2015. Huntingtin N-Terminal Monomeric and Multimeric Structures Destabilized by Covalent Modification of Heteroatomic Residues. *Biochemistry*, vol. 54, p. 4285–4296.

Arrasate, M., Finkbeiner, S. 2012. Protein aggregates in Huntington's disease. *Experimental Neurology*, vol. 238, p. 1–11.

Barbaro, B. A., Lukacsovich, T., Agrawal, N., Burke, J., Bornemann, D. J., Purcell, J. M., Marsh, J. L. 2015. Comparative study of naturally occurring Huntingtin fragments in *Drosophila* points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, vol. 24, p. 913–925.

Bennett, M. J., Huey-Tubman, K. E., Herr, A. B., West, A. P., Ross, S. a, Bjorkman, P. J. 2002. A linear lattice model for polyglutamine in CAG-expansion diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, p. 11634–11639.

Brandstaetter, H., Kruppa, A. J., Buss, F. 2014. Huntingtin is required for ER-to-Golgi transport and for secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Disease Models & Mechanisms*, vol. 7, p. 1335–40.

Bugg, C. W., Isas, J. M., Fischer, T., Patterson, P. H., Langen, R. 2012. Structural features and domain organization of huntingtin fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, p. 31739–31746.

Chiti, F., Dobson, C. M. 2006. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 75, p. 333–366.

Crick, S. L., Ruff, K. M., Garai, K., Frieden, C., Pappu, R. V. 2013. Unmasking the roles of N- and C-terminal flanking sequences from exon 1 of huntingtin as modulators of polyglutamine aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, p. 20075–80.

Ellrichmann, G., Reick, C., Saft, C., Linker, R. a. 2013. Review Article The Role of the Immune System in Huntington's Disease. *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2013, p. 1–24.

Fan, H., Ho, L., Chi, C., Chen, S., Peng, G., Chan, T., Harn, H. 2014. Review Polyglutamine (PolyQ) Diseases: Genetics to Treatments. *Cell Transplantation*, vol. 23, p. 441–458.

Finkbeiner, S. 2011. Huntington's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3, p. 1–24.

- Fodale, V., Kegulian, N. C., Verani, M., Cariulo, C., Azzollini, L., Petricca, L., ... Caricasole, A. 2014. Polyglutamine- and Temperature-dependent conformational rigidity in mutant huntingtin revealed by immunoassays and circular dichroism spectroscopy. *PLoS ONE*, vol. 9, p. 1–31.
- Fomby, P., Cherlin, A. J. 2011. Clinical predictors of driving status in Huntington disease. *Movement Disorders*, vol. 72, p. 181–204.
- Gomez-Sicilia, Angel, Sikora, M., Cieplak, M., Carrian-Vazquez, M. 2015. An Exploration of the Universe of Polyglutamine Structures. *PLoS Computational Biology*, vol. 11, p. 1–17.
- Golas, M. M., Sander, B. 2016. Use of human stem cells in Huntington disease modeling and translational research. *Experimental Neurology*, vol. 16, p. 18–54.
- Gövert, F., Schneider, S. A. 2013. Huntington's disease and Huntington's disease-like syndromes. *Current Opinion in Neurology*, vol. 26, p. 420–427.
- Ha, A. D., Fung, V. S. C. 2012. Huntington's disease. *Current Opinion in Neurology*, vol. 25, p. 491–498.
- Hoffner, G., Djian, P. 2014. Polyglutamine Aggregation in Huntington Disease: Does Structure Determine Toxicity? *Molecular Neurobiology*, vol. 52, p. 1297–1314.
- Kayatekin, C., Matlack, K. E. S., Hesse, W. R., Guan, Y., Chakrabortee, S., Russ, J., Lindquist, S. 2014. Prion-like proteins sequester and suppress the toxicity of huntingtin exon 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, p. 12085–12090.
- Kaplan, A., Stockwell, B. R. 2012. Therapeutic approaches to preventing cell death in Huntington disease. *Progress in Neurobiology*, vol. 99, p. 262–280.
- Lee, C.-C., Nayak, A., Sethuraman, A., Belfort, G., McRae, G. J. 2007. A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophysical Journal*, vol. 92, p. 3448–3458.
- Li, C., Nagel, J., Androulakis, S., Song, J., Buckle, A. M. 2016. PolyQ 2.0: an improved version of PolyQ, a database of human polyglutamine proteins. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, vol. 2016, p. 1–8.
- Li, H., Cheng, A. L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H., Li, X.-J. 2002. Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, p. 1277–87.
- Li, W., Serpell, L. C., Carter, W. J., Rubinsztein, D. C., Huntington, J. A. 2006. Expression and characterization of full-length human huntingtin, an elongated HEAT repeat protein. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, p. 15916–15922.
- Lin, M.-S., Chen, L., Tsai, H., Wang, S. S.-S., Chang, Y., Higuchi, A., Chen, Y. 2008. Investigation of the mechanism of beta-amyloid fibril formation by kinetic and

thermodynamic analyses. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, vol. 24, p. 5802–8.

Marques Sousa, C., Humbert, S. 2013. Huntingtin: here, there, everywhere! *Journal of Huntington's Disease*, vol. 2, p. 395–403.

Mauro, M., Craparo, E. F., Podesto, A., Bulone, D., Carrota, R., Martorana, V., San Biagio, P. L. 2007. Kinetics of Different Processes in Human Insulin Amyloid Formation. *Journal of Molecular Biology*, vol. 366, p. 258–274.

Mcfarland, K. N., Cha, J.-H. J. 2011. *Molecular biology of Huntington's disease. Hyperkinetic Movement Disorders* (1st ed., Vol. 100). Elsevier B.V.

Milto, K., Botyriute, A., Smirnovas, V. 2013. Amyloid-Like Fibril Elongation Follows Michaelis-Menten Kinetics. *PLoS ONE*, vol. 8, p. 8–11.

Myers, R. H. 2007. Huntington's disease. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, vol. 1, p. 255–262.

Nance, M. A. 2012. Therapy in huntington's disease: Where are we? *Current Neurology and Neuroscience Reports*, vol. 12, p. 359–366.

Nielsen, L., Frokjaer, S., Brange, J., Uversky, V. N., Fink, A. L. 2001. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry*, vol. 40, p. 8397–8409.

Nucifora, L. G., Burke, K. A., Feng, X., Arbez, N., Zhu, S., Miller, J., ... Poiriera, M. A. 2012. Identification of novel potentially toxic oligomers formed in vitro from mammalian-derived expanded huntingtin exon-1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, p. 16017–16028.

Ochaba, J., Lukacsovich, T., Csikos, G., Zheng, S., Margulis, J., Salazar, L., ... Steffan, J. S. 2014. Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, p. 16889–94.

Poirier, M. A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., Ross, C. A. 2002. Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, p. 41032–41037.

Proctor, C. J., Tangeman, P. J., Ardley, H. C. 2010. Modelling the role of UCH-L1 on protein aggregation in age-related neurodegeneration. *PLoS ONE*, vol. 5, p. 15–27

Rangone, H., Humbert, S., Saudou, F. 2004. Huntington's disease: How does huntingtin, an anti-apoptotic protein, become toxic? *Pathologie Biologie*, vol. 52, p. 338–342.

Ratovitski, T., Chighladze, E., Arbez, N., Boronina, T., Herbrich, S., Cole, R. N., Ross, C. A. 2012. Huntingtin protein interactions altered by polyglutamine expansion as determined by quantitative proteomic analysis. *Cell Cycle*, vol. 11, p. 2006–2021.

Rüb, U., Vonsattel, J. P. G., Heinsen, H., Korf, H.-W. 2015. The Neuropathology of Huntington's Disease: Classical Findings, Recent Developments and Correlation to Functional Neuroanatomy, vol. 217, p. 91–100.

Schägger, H. 2006. Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols*, vol. 1, p. 16–22.

Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Wanker, E. E. 1997. Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-Like Protein Aggregates In Vitro and In Vivo. *Cell*, vol. 90, p. 549–558.

Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Wanker, E. E. 1999. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, p. 4604–4619.

Schulte, J., Littleton, J. T. 2011. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Current Trends in Neurology*, vol. 5, p. 65–78.

Shang, H., Danek, A., Landwehrmeyer, B., Burgunder, J.-M. 2012. Huntington's disease: new aspects on phenotype and genotype. *Parkinsonism & Related Disorders*, vol. 18, p. S107–S109.

Sinha, N., Tsai, C., Nussinov, R. 2001. A proposed structural model for amyloid fibril elongation: domain swapping forms an interdigitating beta-structure polymer. *Protein Engineering*, vol. 14, p. 93–103.

Sipe, J. D., Cohen, A. S. 2000. Review: History of the Amyloid Fibril. *Journal of Structural Biology*, vol. 130, p. 88–98.

Sittler, A., Walter, S., Wedemeyer, N., Hasenbank, R., Scherzinger, E., Eickhoff, H., Wanker, E. E. 1998. SH3GL3 associates with the huntingtin exon-1 protein and promotes the formation of polyglu-containing protein aggregates. *Molecular Cell*, vol. 2, p. 427–436.

Studier, F. W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, vol. 41, p. 207–234.

Suopanki, J., Gotz, C., Lutsch, G., Schiller, J., Harjes, P., Herrmann, A., Wanker, E. E. 2006. Interaction of huntingtin fragments with brain membranes - Clues to early dysfunction in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, vol. 96, p. 870–884.

Wetzel, R. 2006. Kinetics and thermodynamics of amyloid fibril assembly. *Accounts of Chemical Research*, vol. 39, p. 671–679.

Zhang, J., Muthukumar, M. 2009. Simulations of nucleation and elongation of amyloid fibrils. *Journal of Chemical Physics*, vol. 130, p. 1–17.

Zheng, Z., Diamond, M. I. 2012. *Huntington disease and the huntingtin protein*. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 107). Elsevier Inc.

Zuccato, C., Valenza, M., Cattaneo, E. 2010. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington ' s Disease. *Physiological Reviews*, vol. 90, p. 905–981.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju baigiamojo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui už suteiktas žinias, naudingus patarimus bei pastabas baigiamojo magistro darbo metu. Taip pat dėkoju dr. Christoph Röhlein iš Posdamo universiteto Biochemijos ir biologijos instituto, kuris maloniai sutiko padovanoti pGEX plazmidę su įklonuotu GST-htt-ex1-19Q baltymą koduojančiu genu.