



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

**PELĖS PRIONINIO BALTYMO 144 STOP MUTANTO GENO
KONSTRAVIMAS IR RAIŠKA, REKOMBINANTINIO BALTYMO
GRYNINIMAS IR JO AGREGACIJOS TYRIMAI**

**CONSTRUCTION OF MOUSE PRION PROTEIN 144 STOP MUTANT
GENE, EXPRESION AND PURIFICATION OF THE RECOMBINANT
PROTEIN AND ITS AGGREGATION STUDIES**

Andrius Sakalauskas

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2017

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Andrius Sakalauskas

(Vardas, pavardė)

2017-05-29

(Data)

Andrius Sakalauskas

**PELĖS PRIONINIO BALTYMO 144 STOP MUTANTO GENO
KONSTRAVIMAS IR RAIŠKA, REKOMBINANTINIO BALTYMO
GRYNINIMAS IR JO AGREGACIJOS TYRIMAI**

**CONSTRUCTION OF MOUSE PRION PROTEIN 144 STOP MUTANT
GENE, EXPRESION AND PURIFICATION OF THE RECOMBINANT
PROTEIN AND ITS AGGREGATION STUDIES**

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas *VYTAUTAS SMIRNOVAS*

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

[Signature]

(Parašas)

2017 05 29

(Data)

Konsultantas *BRUNAS SNEDEIKIS*

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

[Signature]

(Parašas)

2017.05.29

(Data)

Konsultantas *Rūta Guškiene*

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

[Signature]

(Parašas)

2017 05 31

(Data)

Vilnius, 2017

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO

UŽDUOTIS

2016-10-10 Nr. 33

Vilnius

Studentui **Andriui Sakalauskui**

Baigiamojo darbo tema: **Pelės prioninio baltymo 144 stop mutanto geno konstravimas ir raiška, rekombinantinio baltymo gryninimas ir jo agregacijos tyrimai**

patvirtinta 2016 m. lapkričio 30 d. dekanų potvarkiu Nr. 397fm

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2017 m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Įvesti W144STOP mutaciją į moPrP23-230 geną, pasigaminti rekombinantinio baltymo, stebėti rekombinantinio baltymo agregacijos kinetiką.

Baigiamojo bakalauro darbo konsultantai: doktorantas, jaunesnysis mokslo darbuotojas Tomas Šneideris, dr. Rūta Gruškienė.

Vadovas

.....
(Parašas)

dr. Vytautas Smirnovas

Konsultantas

.....
(Parašas)

Tomas Šneideris

Konsultantas

.....
(Parašas)

dr. Rūta Gruškienė

Užduotį gavau

.....

.....
(Parašas)

.....
(Vardas, pavardė)

.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-.....-.....

Pirmosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos bakalauro baigiamasis darbas 3

Pavadinimas **Pelės prioninio baltymo 144 stop mutanto geno konstravimas ir raiška, rekombinantinio baltymo gryninimas ir jo agregacijos tyrimai**

Autorius **Andrius Sakalauskas**

Vadovas **Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Amiloidai - baltyminės kilmės ne natyvios struktūros dariniai, randami organuose ir audiniuose. Šie baltymai yra siejami su patologiniais veiksniais, sukeliančiais neurodegeneratyvines ligas, tokias kaip transmisinės spongiforminės encefalopatijos (prionų ligos). Vienas iš praktiškai sutinkamų šios ligos pavyzdžių yra Gerstmann-Straussler-Scheinker liga, kurią sukelia įvairios prioninio baltymo mutacijos. Baigiamajame darbe buvo tirta pelės prioninio baltymo W144STOP (moPrP23-143) mutacija. Atlikti šio baltymo agregacijos tyrimai.

Įvesta W144STOP mutacija į prioninį baltymą koduojantį geną ir gautas moPrP23-143 konstruktas;

Gauta moPrP23-143 baltymo raiška E. coli ląstelėse;

Išgryninus metalų chelatinės giminingumo chromatografijos metodu iš viso gauta $229,1 \pm 0,1$ mg rekombinantinio moPrP23-143 baltymo;

Atlikti moPrP23-143 de novo agregacijos bei inicijuotos agregacijos tyrimai skirtinguose buferiniuose tirpaluose parodė, kad baltymas gali sudaryti fibrilinius agregatus esant 0 M ir 0,5 M GuHCl koncentracijoms. Atliktas 0 M GuHCl formuotų fibrilių stabilumo tyrimas. Iš gautų rezultatų buvo pasirinktos optimalios inicijuotos agregacijos sąlygos tolimesniems tyrimams;

Inicijuota moPrP23-230, moPrP89-230 agregacija su moPrP23-143 nukleacijos branduoliais bei išnagrinėti pokyčiai atsiradę šios agregacijos metu.

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

Darbo apimtis 41 p. teksto be priedų, 28 paveikslai, 8 lentelės, 52 bibliografinis šaltinis. Atskirai pridedamų darbo priedų nėra.

Prasminiai žodžiai: Pelės prioninis baltymas, pelės prioninio baltymo mutantas, fibriliniai agregatai, gryninimas, agregacija, inicijuota agregacija.

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

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

Bachelor Degree Studies **Bioengineering** study programme Bachelor Graduation Thesis 3

Title **Construction of Mouse Prion Protein 144 Stop Mutant Gene, Expression and Purification of the Recombinant Protein and its Aggregation Studies**

Author **Andrius Sakalauskas**

Academic supervisor **Vytautas Smirnovas**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Amyloids are proteinaceous, non-native structure derivatives that are found in organs and tissues. These proteins are linked to the pathological factors which cause neurodegenerative diseases such as transmissible spongiform encephalopathy (prion diseases). One example of the disease is Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, which is caused by different mutations of prion protein. The Bachelor's work covers the experimental aggregation work of mouse prion protein W144STOP (moPrP23-143) mutant.

Mutation of W144STOP was generated by performing targeted mutagenesis; the construct of moPrP23-143 was generated.

The moPrP23-143 was expressed in *E. coli* cells.

Using IMAC, recombinant protein was purified (total amount of 229.1 ± 0.1 mg).

De novo and seed-induced aggregation studies of moPrP23-143 were conducted in different buffer solutions, the results showed that moPrP23-143 form fibril aggregates without and with 0.5 M of GuHCl. Stability of fibrils, formed without GuHCl, was examined.

Cross-seeding of moPrP23-230 and moPrP89-230 using moPrP23-143 fibrils were performed.

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

Thesis consist of 41 p. Text without appendixes, 28 picture, 8 tables, 52 bibliographical entries.

Keywords: Mouse prion protein, mutant of mouse prion protein, fibril aggregates, purification, aggregation, seed-induced aggregation.

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Andrius Sakalauskas, 20133862

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIf-13

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA**

2017 m. gegužės 29 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Pelės prioninio baltymo 144 stop mutanto geno konstravimas ir raiška, rekombinantinio baltymo gryninimas ir jo agregacijos tyrimai“ patvirtintas 2016 m. lapkričio 28 d. dekanų potvarkiu Nr. 397fm, 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. Rūta Gruškienė, Tomas Šneideris. Mano darbo vadovas dr. Rūta Gruškienė.

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



(Parašas)

Andrius Sakalauskas

(Vardas ir pavardė)

TURINYS

ĮVADAS.....	10
LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1 Ląstelinio prioninio baltymo struktūra (<i>PrP^C</i>).....	11
1.2 Prioninės ligos	12
1.2.1 Gerstmann-Sträussler-Scheinker liga	12
1.3 PrP ^{Sc} struktūros modeliai	13
1.4 PrP23-144.....	14
1.4.1 moPrP23-143.....	15
1.5 MoPrP23-143 infektyvumas <i>in vivo</i>	16
1.6 Amiloidinių baltymų agregacija.....	18
1.6.1 Tioflavinas T	18
1.6.2 Amiloidinių fibrilių susidarymas bei jos kinetika	18
1.7 Infektyvių prionų gamyba <i>in vitro</i>	20
MEDŽIAGOS IR METODAI	21
2.1 Aparatūra, medžiagos.....	21
2.1.1 Reagentai	21
2.1.2 Laboratorinė įranga.....	21
2.1.3 Buferiniai tirpalai.....	22
2.1.4 Sorbentai.....	23
2.1.5 Kompetentinės ląstelės	23
2.1.6 Konstruktas.....	23
2.1.7 Mitybinės terpės	23
2.1.8 Oligonukleotidų pradmenys	24
2.2 Metodai.....	24
2.2.1 Polimerinė grandininė reakcija.....	24
2.2.2 Nukleorūgščių elektroforezės gelio paruošimo eiga	25
2.2.3 Plazmidės transformacija į bakterijų kamienus	25
2.2.4 Baltymų elektroforezė	25
2.2.5 Baltymo gryninimas	26
2.2.6 Išgryninto baltymo paruošimas liofilizacijai	27
2.2.7 Baltymo paruošimas eksperimentams	27
2.2.8 De novo baltymo agregacijos tyrimai.....	27
2.2.9 Inicijuotas baltymo agregacija.....	28
2.2.10 Fibrilinių agregatų stabilumo tyrimai	28

2.2.11 Baltymų struktūros tyrimai FTIR spektroskopu.....	29
2.2.12 Atominės jėgos mikroskopija.....	29
2.2.13 Kinetinių duomenų apdorojimas.....	29
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	30
3.1 Rekombinantinio moPrP23-143 kryptinga mutagenezė.....	30
3.2 Rekombinantinio moPrP23-143 raiška ir gryninimas.....	31
3.2.1 Rekombinantinio moPrP23-143 raiška.....	31
3.2.2 Rekombinantinio moPrP23-143 gryninimas.....	31
3.3 Rekombinantinio moPrP23-143 agregacijos tyrimai.....	33
3.3.1 <i>De novo</i> agregacijos tyrimai.....	33
3.3.2 Inicijuotos agregacijos kinetiniai tyrimai.....	34
3.3.3 Fibrilinių agregatų nustatymas AJM.....	37
3.4 Rekombinantinio moPrP23-143 agregatų stabilumo tyrimai.....	38
3.5 Rekombinantinių moPrP89-230 ir moPrP23-230 inicijuota agregacija.....	38
3.5.1 Fibrilinių agregatų susidariusių persėjimų metu nustatymas AJM.....	40
3.5.2 Fibrilinių agregatų struktūros palyginimas FTIR metodu.....	41
IŠVADOS.....	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	44

Santrumpų sąrašas

- AA - akrilamidas
- AIM – autoinduktyvi mitybinė
- AJM – atominės jėgos mikroskopas
- APS – Amonio persulfatas
- BAA –bisakrilamidas
- CJD – Creutzfeldto-Jakobso liga
- FTIR – Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių
- GPI – glikozilfosfatidilinozitolis
- GSS – Gertmanno-Strausslerio-Scheinkerio sindromas
- GuHCl – guanidino hidrochloridas
- LB – Luria broth augimo terpė
- moPrP23-143 – pelės prioninio baltymo W144Stop mutantas
- moPrP23-230 – pelės prioninis baltymas
- moPrP89-230 – pelės prioninio baltymo N-galo mutantas
- NDS – Natrio dodecilsulfatas
- NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė
- PGR – polimerinė grandininė reakcija
- PK – proteinazė K
- PRNP – prioninį baltymą koduojantis genas
- PrP^C – ląstelinis prioninis baltymas
- PrP^{Sc} – patologinės formos prioninis baltymas, „skrepi“ forma
- S.O.C – optimali mitybinė terpė
- TEMED – N,N,N'N'-tetrametiletilendiaminas
- TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
- TSE – transmisinės spongiforminės encefalopatijos
- W144STOP/Y145STOP – peptidinėje grandinėje 144/145 pozicijoje tiroziną\triptofaną koduojantis kodonas pakeistas į stop kodoną

ĮVADAS

Amiloidai – baltyminės kilmės nenatyvios struktūros dariniai randami organuose ir audiniuose. Šių netirpių, fibriles formuojančių baltymų agregatai pasižymi dominuojančia antrine β -klosčių struktūra. Šie baltymai yra siejami su patologiniais veiksniais sukeliančiais amiloidozę (Rambaran et al. 2008). Vienas iš praktiškai sutinkamų amiloidozės pavyzdžių yra transmisinės spongiforminės encefalopatijos (*angl* - transmissible spongiform encephalopathy) kitaip dar vadinamos prionų ligomis. Tai plati grupė apimanti įvairias ligas iš kurių žinomiausios yra Kuru liga, galvijų kempinligė, avių skrepi, lėtinis elnių ir briedžių išsekimas, Creutzfeldt-Jakob liga, mirtina paveldimoji nemiga (*angl* – fatal familial insomnia), ir Gerstmann-Straussler-Scheinker (*toliau* - GSS) sindromas (Kundu et al. 2003).

Viena iš labiausiai intriguojančių su liga susijusių mutacijų yra žmogaus prioninio baltymo 145 pozicijoje esančio tiroziną koduojančio kodono pasikeitimas į stop kodoną. Ši mutacija lemia GSS ligą, kurios simptomas yra prioninio baltymo fibrilinių agregatų sankaupos smegenyse (Kundu et al. 2003).

Šiuo metu apie GSS ligą sukiantį prioninio baltymo mutantą yra mažai žinoma. Eksperimentiniais tyrimais įrodyta, kad *in vivo* prionas yra infektyvus (Choi et al. 2016). Tačiau agreguojant pilno ilgio prioninį baltymą *in vitro*, gaunami neinfektyvūs fibriliniai agregatai. Ištyrus prioninio baltymo 144 stop mutantą ir jo agregacijos savybes *in vitro*, būtų galima atsakyti į klausimą, ar šis mutantas galėtų infekuoti pilno ilgio pelės prioninį baltymą, paversdamas jį infektyviu. *In vitro* sąlygomis sugebėjus gauti pilno ilgio infektyvų pelės prioninį baltymą, būtų galima ištirti šio baltymo struktūrą, identifikuoti agregacijos veiksnius.

Darbo tikslas – sukonstruoti ir išgryninti pelės prioninio baltymo 144 stop mutantą bei ištirti jo agregaciją.

Darbo uždaviniai:

1. Genų inžinerijos metodais sukonstruoti pelės prioninio baltymo geno W144STOP mutantą (*toliau* – moPrP23-143);
2. Atlikti moPrP23-143 sintezę *E. coli* ląstelėse;
3. Išgryninti tikslinį baltymą;
4. Atlikti moPrP23-143 agregacijos tyrimus bei patikrinti agregatų poveikį pilno ilgio pelės prioniniam, bei moPrP89-230 baltymui.

LITERATŪROS APŽVALGA

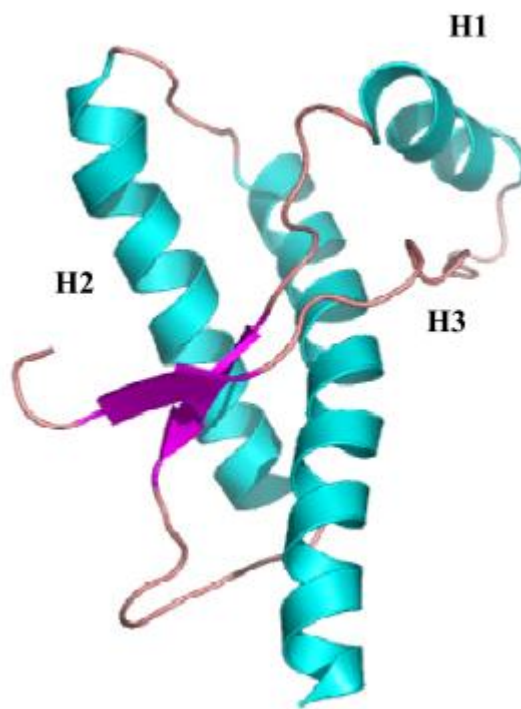
1.1 Ląstelinio prioninio baltymo struktūra (*PrP^C*)

Prioninis baltymas yra randamas gyvūnų karalystės rūšyse. Tarprūšinis prioninių baltymų panašumas tarp žinduolių yra 90 % aminorūgščių sekos. Žmogaus ląstelinis prioninis baltymas yra sudarytas iš 253 aminorūgščių. Pirmos 22 N-galo ir paskutinės 23 C-galo aminorūgštys koduoja signalines baltymo sekas. Be signalinių sekų yra 209 aminorūgštys sudarančios pilnai funkcionuojantį baltymą (**1 pav.**) (Surewicz et al. 2013). Prioninis baltymas yra sintetinamas daugelyje audinių, bet didžiausi prioninio baltymo kiekiai yra randami centrinėje nervų sistemoje (Westergard et al. 2007). N-galo signalinė seka yra nukerpama po to, kai baltymas pernešamas per endoplazminio tinklo membraną. Hidrofobinė C-galo signalinė seka yra pašalinama transamidinimo reakcijos metu, vietoje jos prijungiant glikozil-fosfatidilinozitolio (GPI) inkarą ties 231 aminorūgštimi (van Rheede et al. 2003). Kitos potransliacinės modifikacijos – disulfidinės jungties susidarymas tarp Cys179 ir Cys214, bei N-glikozilinimas prie Asn181 ir Asn197 aminorūgščių.



1 pav. Schematinis žmogaus PrP^C struktūros atvaizdavimas (pritaikyta iš (Surewicz et al. 2013)).

Pirmo paveikslėlio schemas galuose paminėtos N ir C galo signalinės sekos (vėliau vietoje C-galo signalinės sekos prijungiamas GPI inkaras). N-galo srityje penki oktapeptidų atsikartojimai yra pavaizduoti raudonos spalvos atspalviais. Pirmasis iš atsikartojimų yra „pseudoatsikartojimas“ kuriame trūksta histidino aminorūgšties, kiti keturi yra identiškos PHGGGGWGQ sekos atsikartojimai. Šie oktapeptidiniai atsikartojimai geba prisirišti vario jonus (pavaizduota linkiais grafike). Penktasis regionas, kuris prisiriša varį yra paryškintas mėlynai. Hidrofobinis polindrominės sekos regionas paryškintas violetine spalva. C-galo domeno srityje antrinę struktūrą sudaro trys α spirales ir viena β klostė (**pav. 2**). Disulfidinis tiltelis pavaizduotas geltona linija, o glikozilintos vietos pavaizduotos prijungtomis angliavandenių grupėmis.



2 pav. Prioninio baltymo 3D struktūra. Skirtingi antrinės struktūros elementai yra sužymėti (H1,H2,H3), atitinkamai α spirales domenai (pritaikyta iš (Colacino et al. 2006)).

1.2 Prioninės ligos

Prionų ligos arba kitaip transmisinės spongiforminės encefalopatijos (TSE) yra mirtinos neurodegeneratyvinės centrinės nervų sistemos ligos. Jos charakterizuojamos kaip ilgo inkubacinio periodo ligos, kurių metu atsiranda nenormalaus prioninio baltymo PrP^{Sc} sankaupos, spongiozė, gliozė ir neuronų praradimai (Sarah E. Lloyd et al. 2013; Aguzzi et al. 2009; Riesner 2003). Žmonėse skirtingos šių ligų formos yra apibūdinamos kaip: spontaniškos – Creutzfeldt-Jakob liga (CJD), mirtina nemiga (sFI), kintanti proteazėms jautri prionopatija (VPSPr); genetiškos (mutacijos arba genetiniai įterpimai į prioninio baltymo geną, kuris randamas dvidešimtoje chromosomoje (Kitamoto, T.; Iizuka, R.; Tateishi 1993)) – genetiškos CJD, mirtina paveldimoji nemiga (FFI), Gerstmann-Sträussler-Scheinker liga (GSS); infekcinės – naujo varianto CJD, jatrogeninė CJD bei kuru liga (Weissmann 2004; Abid et al. 2006).

1.2.1 Gerstmann-Sträussler-Scheinker liga

GSS yra lėtai progresuojanti paveldima centrinės nervų sistemos dominantinė neurodegeneratyvinė liga. Tikrąjį ligos paplitimą sunku apibrėžti, bet teigiama, kad apytiksliai 5 iš 100 000 000 žmonių serga GSS (Liberski 2012). Liga detalai aprašyta Gerstmanno 1928 m., o vėliau Gerstmanno, Sträusslerio bei Scheinkerio 1936 metais išleistas straipsnis, kurio leidėjų vardais ir buvo pavadintas šis sindromas. Gerstmannas 1928 metais savo straipsnyje paminėjo

savitą refleksą, kai pacientui ištiesus abi rankas į priekį priešais krūtinę, jo galva visada pasisukdavo į vieną pusę, bet sukryžiuvus rankas galva žiūrėdavo tiesiai (Liberski et al. 2012).

GSS ligos metu pastebimos didelės amiloidinių fibrilių sankaupos smegenėlėse. Šią ligą sukelia įvairios prioninio baltymo mutacijos. Pirmoji iš mutacijų buvo nustatyta ties 102 kodonu, po to atrastos kitos ties 105, 117, 131, 145, 187, 198, 202, 212, 217 ir 232 kodonais (Liberski 2012).

Šiame darbe nagrinėjama 145 kodono taškinė mutacija, kurioje tirozino aminorūgštį koduojantis kodonas (TAT) pakeičiamas į stop kodoną (TAG). Ši mutacija pirmą kartą literatūroje paminėta 1993 metais, straipsnyje minimas pacientas turintis unikalius klinikinius ir patologinius požymius. Moteris pasižymėjo atminties praradimu, progresuojančia demencija, disorientacija ir sumažėjusiu gebėjimu bendrauti (Kitamoto, T.; Iizuka, R.; Tateishi 1993).

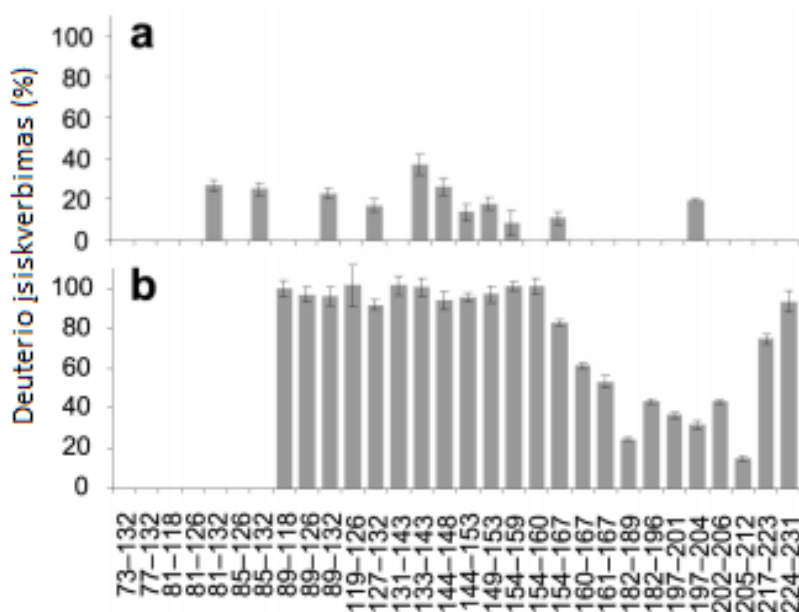
1.3 PrP^{Sc} struktūros modeliai

Prionų ligos yra mirtini žinduolių neurodegeneraciniai sutrikimai. Šių neįprastų ligų patogeniškumas susijęs su baltymo konformaciniais pokyčiais. Ląstelinis prioninis baltymas (PrP^C) konformacinių persitvarkymų metu pasikeičia į nenormalų „skrepi“ (*angl* – scrapie) prioninį baltymą (PrP^{Sc}). Toks būsenos perėjimas lemia padidėjusį β-kolstinių elementų kiekį ir visišką α-spiralinės struktūros sumažėjimą. PrP^{Sc} dalinai atsparus cheminiams ir terminiams veiksniams, bei proteolizei (van Rheede et al. 2003; Aguzzi et al. 2004; Eghiaian et al. 2004).

Šiuo metu infektyvaus PrP^{Sc} struktūra nėra iki galo apibrėžta ir vis dar tirama, o paplitę struktūriniai modeliai daugiausiai apibrėžia rekombinantinio prioninio baltymo (rPrP) amiloidinių agregatų struktūrą (Grovetman et al. 2014). Vieni iš pirmųjų PrP^{Sc} tyrimų parodė, kad infektyvus prioninis baltymas, priešingai nei ląstelinis, turi regioną atsparų karpymui proteinaze K (PK) – sukarpomas N-galas ir lieka PK atsparus branduolys vadinamas PrP27-30 (McKinley et al. 1983; Requena et al. 2014; Leske et al. 2017).

Pirmieji infektyvaus prioninio baltymo struktūros tyrimai buvo atlikti 1993 metais. Apskritiminio dichroizmo metodu nustatyta, kad PrP^{Sc} sudaro ~20 % α spiralinės ir ~34 % β klostės (Safar et al. 1993). Tais pačiais metais pasitelkiant FTIR analizės metodą buvo nustatyta kitokia PrP^{Sc} struktūros α spiralių ir β klostelių kompozicija, atitinkamai – 30 % ir 43 % (Cohen et al. 1993). Remiantis naujesniais tyrimais buvo parodyti skirtumai tarp rekombinantinio prioninio baltymo amiloidinių fibrilių ir PrP^{Sc}. EPR tyrimu nustatyta, kad rekombinantinio baltymo fibrilės turi β klostes nuo 162 aminorūgšties, kurios tęsiasi iki pat galinių aminorūgščių C gale, o PrP^{Sc} β klostės prasideda jau nuo 89 (Surewicz et al. 2013). 2012 metais Smirnovas su

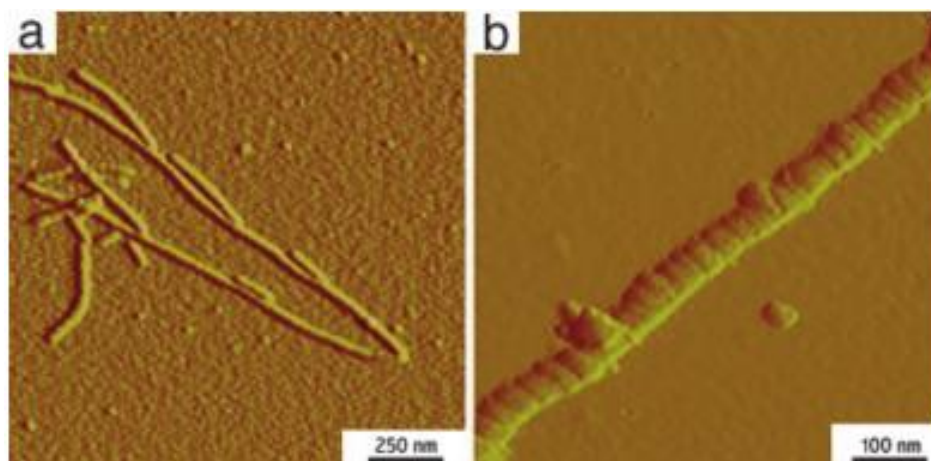
kolegomis pasitelkdami vandenilio-deuterio pasikeitimo greičio tyrimus su masių spektroskopu (**3 pav.**) įrodė, kad PK atsparus PrP^{Sc} domenas prasideda nuo 80-90 aminorūgščių iki pat C-galo yra sudarytas iš β klosčių, kurias jungia erdviniai aminorūgščių linkiai ir kilpos (Smirnovas et al. 2011).



3 pav. Deuterio-vandenilio pasikeitimo grafikai per 240 val. a – PrP^{Sc} gautas iš laukinio tipo pelės užkrėstos 22L kamieno PrP^{Sc}. b – amiloidinės fibrilės suformuotos iš rekombinantinio prioninio baltymo 89-231 (pritaikyta iš (Smirnovas et al. 2011)).

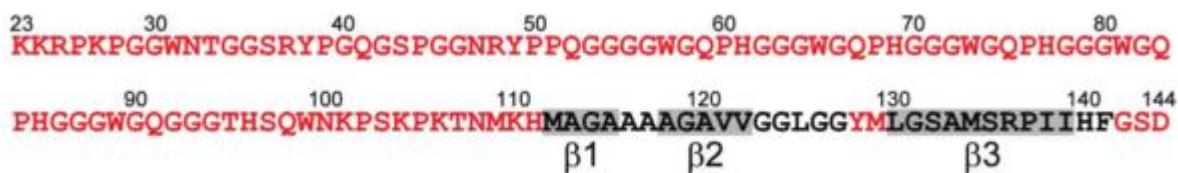
1.4 PrP23-144

Prioninio baltymo Y145Stop mutantas (PrP23-144), kuris yra vienas iš GSS ligos sukėlėjų geba formuoti amiloidinius agregatus *in vitro*. 2003 metais Kundu su kolegomis atominės jėgos mikroskopu (*angl.* - Atomic Force Microscopy (AFM)) pavaizdavo šio mutanto suformuotus amiloidinius agregatus (**4 pav.**) (Kundu et al. 2003). Vėliau naudojantis kietos fazės branduolių magnetinių rezonansu (*angl.* - Solid State Nuclear Magnetic Resonance (SSBMR)) buvo nustatyta šių fibrilinių agregatų erdvinė struktūra.



4 pav. huPrP23-144 amiloidinių agregatų vaizdai. a - huPrP23-144 fibrilės; b - padidinta huPrP23-144 fibrilė (pritaikyta iš (Kundu et al. 2003)).

Pasirodo, jog šio baltymo fibrilinių agregatų N galo seka yra bestruktūre, o vienintelė aptikta struktūra yra β klostytas regionas nuo ~110 iki pat C-galinės aminorūgšties (**5 pav.**) (Helmus et al. 2010).



5 pav. huPrP23-144 aminorūgščių seka. Remiantis branduolinio magnetinio rezonanso (BMR) spektroskopijos rezultatais nustatyti pilkais stačiakampiais pažymėti β -klostyti regionai (pritaikyta iš (Helmus et al. 2010)).

Šio mutanto tyrimų svarba iškelta 2004 metais, kai Vanik'as su kolegomis ištyrė PrP23-144 tarprūšinį barjerą tarp žmogaus, pelės, sirijos žiurkėno. Šie mokslininkai iškėlė idėją, jog ląstelinio PrP vertimas į PrP^{Sc} gali būti atliekamas *in vitro* panaudojant PrP23-144 (Vanik et al. 2004).

1.4.1 moPrP23-143

Pelės modeliai yra vieni iš mėgstamiausių genetikams. Kol moksliniai atradimai vystosi, pelės mokslininkams gali pasiūlyti daugelį privalumų, ypač prionų ligų tyrimuose. Žmogaus ir pelių neurodegeneratyvinių ligų patologija yra labai panaši. Abiejų rūšių genomai yra pakankamai panašūs, todėl tiriant pelių neurodegeneratyvinių ligų požymius galima būtų modeliuoti žmogaus ligų modelius, ypač kai žmonių ir pelių biocheminiai keliai ir ląstelių mechanizmai sutampa (Sarah E Lloyd et al. 2013).

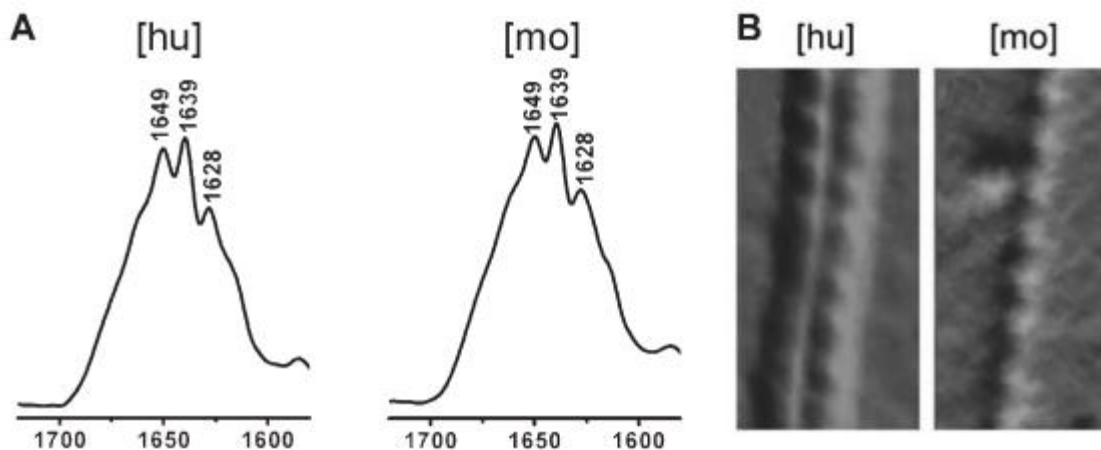
Nors tarprūšiniai prioniniai baltymai yra labai panašūs tarpusavyje tiek aminorūgščių sekomis, tiek struktūra, svarbu apibrėžti minimalius skirtumus, kurie turi įtakos tarprūšiniam

barjerui, bei savitai agregacijos kinetikai. Pelės prioninio baltymo mutantas moPrP23-143, literatūroje aprašomas kaip moPrP23-144, dėl šio mutanto palyginimo su žmogaus prioninio baltymo mutantu 23-144. Šie skirtingų rūšių prioninio baltymo mutantai skiriasi ne tik 8 aminorūgštimis, bet ir aminorūgščių kiekiu (**6 pav.**) (Vanik et al. 2004; Jones et al. 2005).

		55	56	72	80	97	109	112	138	139	143							
hu	K-G	G	---	G	---	G	---	S	---	M	---	M	---	I	I	---	S	D
mo	K-	T	---	S	---	S	---	N	---	L	---	V	---	M	I	---	N	D
Sha	K-G	T	---	G	---	G	---	N	---	M	---	M	---	M	M	---	N	D
		23																144

6 pav. Žmogaus (hu), pelės (mo) ir sirijos žiurkėno (Sha) PrP aminorūgščių palyginimas ir skirtumai 23-144 sekoje (Pritaikyta iš (Jones et al. 2005)).

Nors žmogaus ir pelės prioninio baltymo mutantai nėra visiškai identiški, jų formuojami fibriliniai agregatai remiantis, Furje transformacijos infrafaudonųjų (FTIR) bangų spektrometriniais duomenimis, sutampa (**7 pav.**) (Jones et al. 2005).

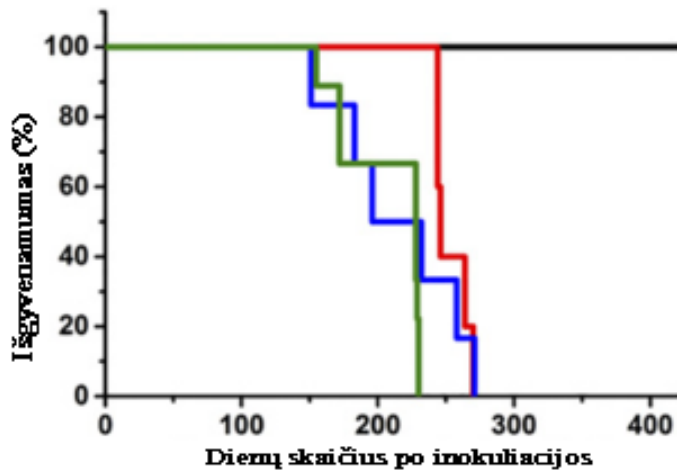


7 pav. Žmogaus ir pelės prioninio baltymo Y145Stop mutantų palyginimas. A – FTIR spektrų palyginimas kairėje huPrP23-144 amiloidinių agregatų spektras, dešinėje moPrP23-143 amiloidinių agregatų spektras. B – atominės jėgos mikroskopo vaizdai, kairėje huPrP23-144 amiloidinis agregatas, dešinėje moPrP23-143 amiloidinis agregatas (pritaikyta iš (Jones et al. 2005)).

Kadangi žmogaus ir pelės prioninio baltymo Y145Stop/W144Stop mutantų FTIR spektras parodo, kad struktūriškai abiejų baltymų β klostyti regionai sutampa, buvo atlikti jų amiloidinių agregatų morfologijos tyrimai, kurie neparodė didelių morfologinių skirtumų (**7 pav. B**)

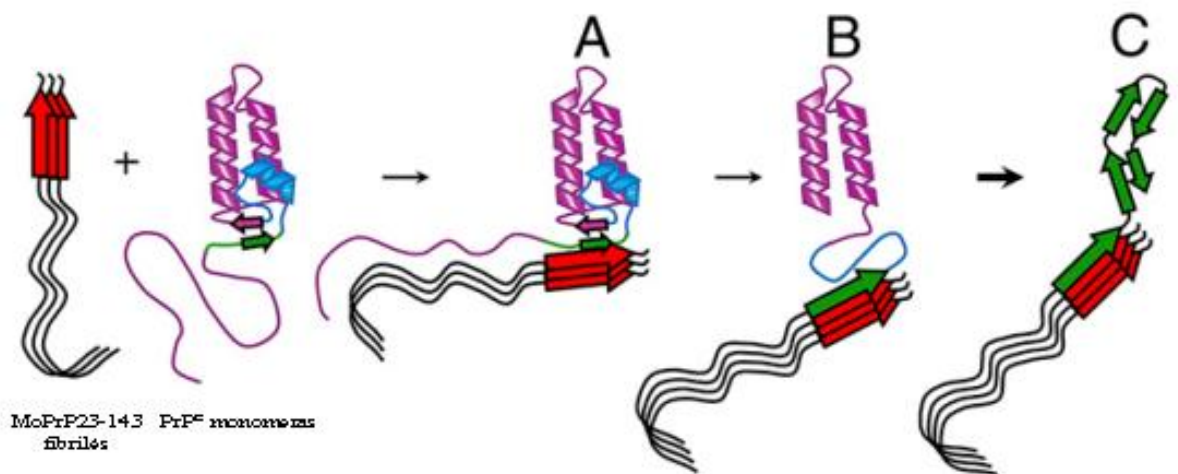
1.5 MoPrP23-143 infektyvumas *in vivo*

Norint įsitikinti ar moPrP23-143 yra infektyvus *in vivo* buvo paimtos dviejų tipų pelės – laukinio tipo ir tga20 mutantai. Šioms pelėms suleidus moPrP23-143 baltymo agregatų buvo stebimas jų išgyvenamumas (**8 pav.**). 100 % pelių mirė nuo šio baltymo poveikio jų organizmui (Choi et al. 2016).



8 pav. Išgyvenamumo priklausomybė nuo dienų skaičiaus po baltymo suleidimo. Raudona kreivė rodo sveikų pelių išgyvenamumą, kai joms buvo suleista moPrP23-143 fibrilinių agregatų PBS tirpale, mėlyna – sveikoms pelėms suleistas prieš tai eksperimente mirusių užkrėstų pelių smegenų homogenizatas, žalia – sveikoms pelėms suleistas antros generacijos eksperimente mirusių pelių smegenų homogenizatas (Pritaikyta iš (Choi et al. 2016)).

Yra pasiūlytas hipotezė, kuri teigia, kad moPrP23-143 β klostinis aminorūgščių segmentas prisijungia prie analogiškoje vietoje esančio PrP^C aminorūgščių segmento, taip inicijuojant pilno ilgio prioninio baltymo virsmą į infektyvų (**9 pav.**)

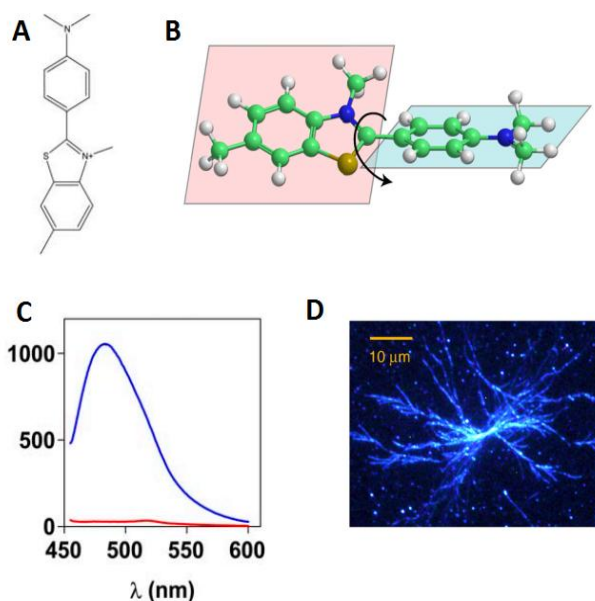


9 pav. Hipotetinis PrP^C virtimo patogeniniu, pasitelkiant moPrP23-143 fibrilinius agregatus, mechanizmas. A – PrP^C aminorūgščių ~112-139 segmentas prisijungia prie moPrP23-143 β klostės (~112-139 aminorūgščių). B – fibrilių iniciuota PrP^C ~112-139 aminorūgščių segmento monomero virstimas į β struktūrą. C – kitų β klosčių susidarymas (Pritaikyta iš (Choi et al. 2016)).

1.6 Amiloidinių baltymų agregacija

1.6.1 Tioflavinas T

Vienas iš pirmųjų metodų skirtų detektuoti amiloidines fibriles buvo aprašytas 1853m. Tuomet Virchow'ui nesveikus organus paveikus jodu ir sieros rūgštimi dalis audinių nusidažė juoda spalva. XX a. pradžioje ir viduryje, audinių pramonėje buvo naudojamas tamsiai purpurinės spalvos dažas – Kongo raudonasis. 1959 metais Vassar ir Culling pademonstravo iki šiol naudojamą dažą amiloidinių fibrilių detekcijai. Tai benzotiazolo dažas - Tioflavinas-T (*ThT*) (Biancalana et al. 2010). Prisijungus prie amiloidinių agregatų ThT sažadinimo maksimumas pakinta nuo 385 nm iki 450 nm, o emisijos nuo 445 nm iki 479-482 nm. ThT fluorescencija priklauso tik nuo dažo kiekio prisijungusio prie amiloidinių fibrilių (LeVine 1993; Amdursky et al. 2012; Sabate et al. 2013). Pati ThT molekulė susideda iš dviejų benzilamino ir benziltiazolo žiedų (10 pav. A), kurie atitinkamai erdvėje sukasi vienas prieš kitą (10 pav. B). Esant amiloidinėms fibrilėms, ThT prisiriša prie jų (Bolognesi et al. 2010)(Khurana et al. 2005). Tokiu atveju ThT žiedų sukimasis erdvėje sustoja sužadintoje būsenoje, o fluorescencija daug kartų padidėja (10 pav. C).



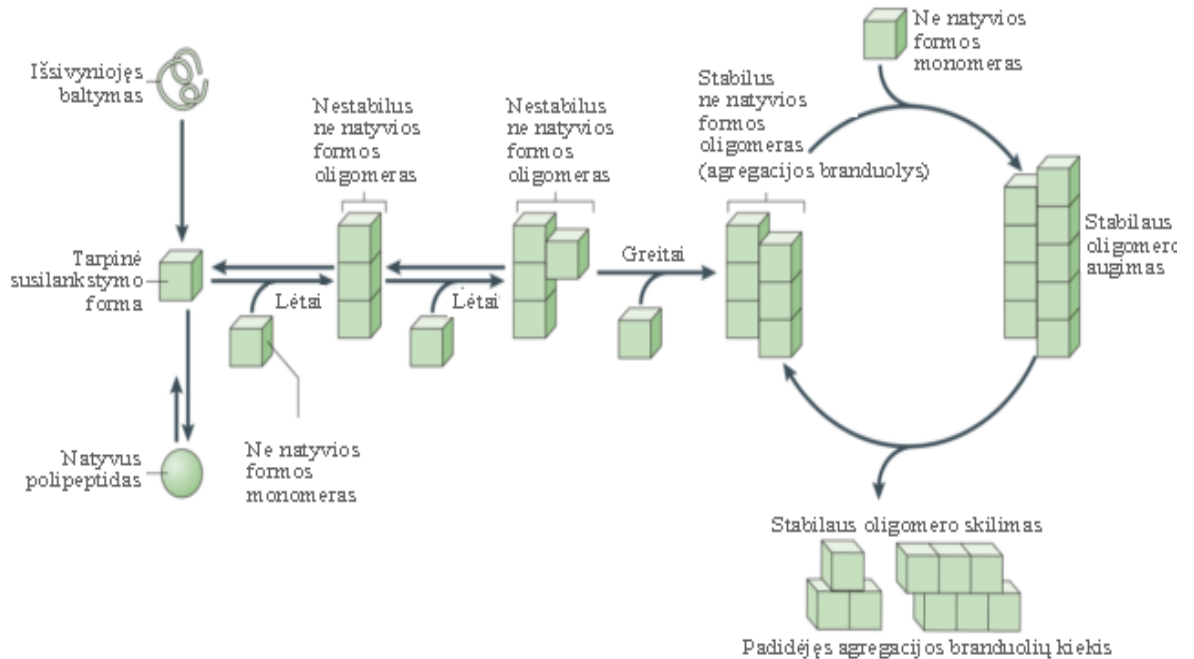
10 pav. A – ThT molekulė, kuri sudaryta iš benzilamino ir benziltiazolo žiedų. B – pavaizduotos dvi plokštumos, kurios sukasi erdvėje. C – ThT fluorescencijos spektras, raudonai pavaizduota kreivė, kai tirpale nėra amiloidinių agregatų, o mėlyna kreivė – esant amiloidiniams agregatams. D – vidinės fluorescencijos atspindžio mikroskopijos atvaizdas, kur ThT yra prisijungęs prie gliukagono fibrilių (Pritaikyta iš (Lindgren et al. 2005; Biancalana et al. 2010)).

1.6.2 Amiloidinių fibrilių susidarymas bei jos kinetika

PrP^{Sc} pasižymi savybe agreguoti į amiloidinius agregatus (Walker 2016). Nors patogeniškumo sukėlėjas išlieka kontraversiškas, daugiausiai įrodymų yra grindžiami

„baltyminio infektyvumo“ (*angl* – „protein-only“) hipoteze, pagal kurią PrP^{Sc} yra infektyvus priono patogenas (Jones et al. 2005).

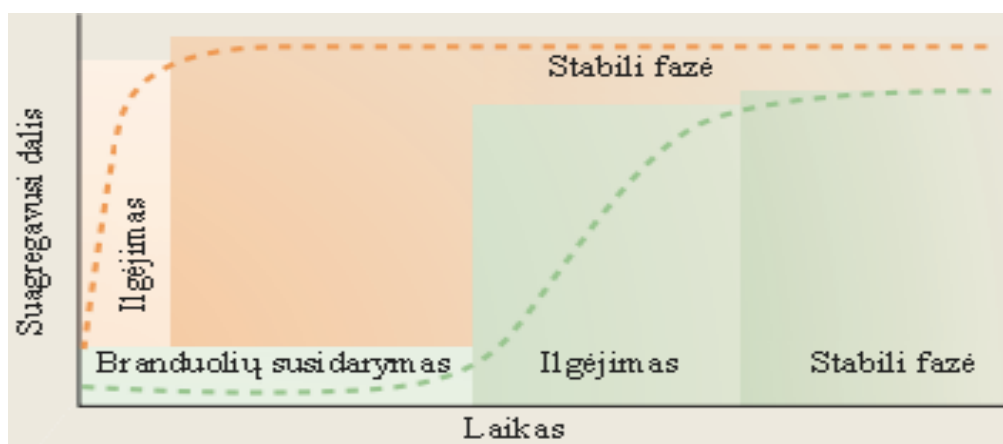
Bendrą fibrilinių agregatų formavimosi mechanizmą pasiūlė Brundin su kolegomis (**11 pav.**).



11 pav. Baltymų agregacijos į amiloidines fibriles mechanizmas (pritaikyta iš (Brundin et al. 2010)).

Naujai susintetintų polipeptidinių grandinių susilankstymas į natyvią konformaciją ir natyvių baltymų išsilankstymas vyksta per tarpinę susilankstymo formą. Dalis tarpinio susilankstymo formų geba savime asocijuoti nestabilų nenatyvios oligomerinės formos darinius, kurie skiriasi struktūriškai nuo natyvios formos (Chiti et al. 2006). Šių oligomerų stabilumas didėja dėl papildomų tarpmolekulinių sąveikų su kitais ne natyvios formos oligomerais per papildomus sąveikos taškus. Galutinė mechanizmo stadija yra tada, kai susiformuoja stabilus ne natyvios formos oligomeras. Tokie oligomerai veikia kaip agregacijos branduoliai iš abiejų galų gebėdami prijungti nenatyvius monomeras, kuriems prisijungus vyksta stabilaus oligomero augimas. Dėl skirtingų priežasčių, oligomerai gali skilti – taip didėja agregacijos branduolių kiekis (Brundin et al. 2010; Hasegawa et al. 2017; Iljina et al. 2016).

Amiloidinių agregatų susidarymo kinetika gali būti eksperimentiškai stebima realiu laiku naudojant fluorescentinį dažą ThT, jų kinetinės kreivės pavaizduotos (**12 pav.**)



12 pav. Amiloidinių fibrilių susidarymo kinetikos kreivės (Pritaikyta iš (Brundin et al. 2010)).

Žalia kreivė – „spontaninė“ agregacija, stabilių oligomerų susidarymas yra termodinamiškai nepalankus, todėl branduolių susidarymas yra savotiška „lag“ fazė, kurios metu nestabilūs ne natyvios formos oligomeriniai dariniai formuoja nukleacijos branduolius. Ilgėjimo fazė yra eksponentiška, dėl agregacijos branduolių savybės jungtis monomerus, bei šių branduolių skilimo į mažesnius branduolius. Rusva kreivė – baltymo inicijuota agregacija, kai į natyvių monomerų mišinį yra pridėdama „sėklos“ (nukleacijos branduolių). Tokiu atveju baltymų virsmas į fibrilinius agregatus prasideda eksponentinio ilgėjimo fazėje (Fraser 2014; Biancalana et al. 2010; Brundin et al. 2010; Gillam et al. 2013; Hudson et al. 2009).

1.7 Infektyvių prionų gamyba *in vitro*

Netinkamai sulankstomų baltymų ciklinė amplifikacija (angl. – protein misfolding cyclic amplification (PMCA)) yra metodika, kuri leidžia infektyvaus PrP^{Sc} gavimą iš PrP^C *in vitro*. Kadangi rekombinantinio prioninio baltymo amiloidiniai agregatai nėra infektyvus, įvairiems tyrimams reikalingas PrP^{Sc} yra gaunamas pasitelkiant PMCA (Barria et al. 2012). Šio metodo esmė, kad patologinis baltymas PrP^{Sc} veikia kaip „sėkla“ ir indukuoja ląstelinio prioninio baltymo vartimą infektyviu. PrP^{Sc} yra gaunamas iš gyvūno, sergančio kempinlige, smegenų homogenizato ir sumaišomas su ląstelinio prioninio baltymu iš sveiko organizmo smegenų homogenizato (Soto 2011). Inkubacija yra pakartojama kelis kartus, mėginio dalį ardant ultragarsu ir vėl įdedant į sveiko organizmo smegenų homogenizato mišinį, kuriame yra PrP^C. Taip yra gaunami infektyvūs prionai (Zhang et al. 2013; Morales et al. 2014; Barria et al. 2009).

Deja, rekombinantinį prioninį baltymą paveikus PrP^{Sc} nesusidaro PrP^{Sc} (Yuan et al. 2013). Jeigu būtų galima gauti infektyvų rekombinantinį baltymą *in vitro* atsirastų optimizuota PMCA alternatyva, kurią naudojant galima būtų atlikti infektyvaus prioninio baltymo struktūros tyrimus.

MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Aparatūra, medžiagos

2.1.1 Reagentai

AB Vilniaus degtinė: (96 %) vandeninis etanolio tirpalas;

Acros Organics: acto rūštis (99,5 %); amonio chloridas (99,6 %); amonio persulfatas (99 %); dinatrio hidrofosfatas (99 %); druskos rūgštis tirpalas vandenyje (37 %); glicerolis (99 %); guanidino hidrokloridas (98 %); natrio chloridas; natrio sulfatas (99 %); natrio šarmo tirpalas vandenyje (50 %); nikelio chloridas (98 %); trichloracto rūgštis (99 %); TRIS (99,9 %).

Carl Roth: Deuterio oksidas (99,8 % D); guanidino hidrokloridas (99,7 %, protein grade); LB-medium terpė.

Fisher Scientific UK: agarozė; akrilamido:bisakrilamido tirpalas vandenyje (40 %); amonio chloridas (99 %); dekstrozė (99,8 %); dažas Kumasi brilianto mėlis R-250; kalio dihidrofosfatas (99,94 %); laktozė (99,5 %); magnio sulfatas (99,5 %); mielių ekstraktas; natrio chloridas (99,0 %), TEMED; TRIS (99 %).

Sigma Aldrich: tioflavinas T.

Termo Fisher Scientific Baltics: 4X DNR pavyzdžio buferinis tirpalas (Orange DNA Loading Dye); baltymų molekulinės masės žymenys (Pierce TM Unstained protein MW Marker ir EZ-Run Rec Protein Ladder); DNR molekulinės masės žymuo (O'GeneRuler DNA Ladder Mix); dNTP mišinys; restrikcijos endonukleazė (DpnI); PGR rinkinys Phusion High Fidelity PCR Kit; plazmidinės DNR gryninimo rinkinys GeneJET Plasmid Miniprep Kit.

2.1.2 Laboratorinė įranga

- Atominės jėgos mikroskopas „Dimension Icon Bruker“
- Autoklavas „AHS-75N“ (Raypa);
- Centrifūga (šaldoma) „Herolab HiCen SR“ (AF 6.500 ir AS 4.500 rotoriai);
- Chromatografinė kolonėlė „XK26“;
- Chromatografinė sistema „Äkta explorer“;
- Dializės žarna 49,5 mm diametro „Zella Trans Roth“ (pralaidumas 6-8kDA)
- Elektroforezės aparatas „Biometra Minigel-Twin“ su „Biometra PS 300 T“ srovės šaltiniu;
- Filtras 0,45um porų dydžio „Sartorius Stedim Biotech“;
- FTIR spektrometras „Bruker Alpha“
- Homogenizatorius Potter-Elvehjem „Sigma-Aldrich“;

- Koncentratoriai „Amicon® Ultra-15“, kurių pralaidumas yra 10kDa;
- Laminarinis boksas „Telstar Bio II Advance“;
- Liofilizatorius „FreeZone Triad Freeze Dry System 7400030“
- Magnetinė maišyklė „Velp Scientifica ARE“;
- Mikroplokštelių skaitytuvas „Synergy H4 Hybrid Multi-Mode“;
- pH metras „Thermo Fisher Orion Dual Star pH/ISE“;
- Purtyklė: „IKA KS 4000i control“;
- Rotatorius „Bio RS-24 Mini-Rotator“;
- Spektrofotometras „Nanodrop 2000“;
- Spektrofotometras: „Shimadzu UV-1800“
- Svarstyklės „Kern PCB 1000-2“, „Denver Instruments TP-214“;
- Termostatas „Fisher Scientific IB-15G“;
- Ultragarsinis homogenizatorius „Bandelin Sonopuls“;
- Vakuuminė filtravimo sistema „Sigma-Aldrich“;
- Vandens valymo sistema: „Simplicity system“.

2.1.3 Buferiniai tirpalai

A1. 100 mM K_2HPO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 8. pH koreguojamas HCl tirpalu ir filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

A2. 50 mM imidazolo, 100 mM K_2HPO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 8. pH koreguojamas HCl tirpalu ir filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

A3. 700 mM imidazolo, 100 mM KH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 5,8. pH koreguojamas HCl tirpalu ir filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

B1. 6 M guanidino hidrochlorido (98 %), 100 mM KH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 8. Atskirai atvertas guanidino hidrochloridas, KH_2PO_4 ir Tris-HCl užpilami nedideliu dejonizuoto vandens kiekiu. Tirpinama šildant. Atvėsinus koreguojamas pH ir filtruojama per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą. Refraktometru pamatuojama guanidino koncentracija ir atitinkamai praskiedžiama.

C1. 50 mM KH_2PO_4 , pH 6.4. pH koreguojamas HCl tirpalu;

C2. 0.5 M guanidino hidrochlorido (99,7 %, protein grade), 50 mM K_2HPO_4 , pH 6.4. pH koreguojamas NaOH tirpalu;

C3. 6 M guanidino hidrochlorido (99,7 %, protein grade), 50 mM K_2HPO_4 , pH 6.4. pH koreguojamas NaOH tirpalu;

C4. 6 M guanidino hidroklorido (99,7 %, protein grade), pH 6.4. pH koreguojamas NaOH tirpalu;

C5. 8 M karbamido, pH 6.4. pH koreguojamas NaOH tirpalu.

2.1.4 Sorbentai

GE Healthcare: „Ni Sepharose 6 Fast Flow“.

2.1.5 Kompetentinės ląstelės

Baltymų raiškai naudotas kamienas *E. coli* BL21 Star™(DE3), kuris turi tokias genetines charakteristikas: F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3).

Plazmidinės DNR padauginimui naudotas kamienas *E. coli* XLGold, kuris turi tokias genetines charakteristikas: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].

2.1.6 Konstruktas

pRSETB – 6xHis plazmidė su N-galo heksahistidininio inkaru, atsparumo ampicilinui genu ir įklonuotu moPrP23-231 prioniniu genu. Plazmidė sukonstruota Fiziologijos ir Biofizikos fakultete, Case Western Reserve universitete, Klyvlende, JAV (prof. Witold K.Surewicz grupėje).

2.1.7 Mitybinės terpės

Agarizuota LB (Luria broth) terpė: 2,5 g LB terpės ir 1,5 g agarą ištirpinama 96 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min. 121°C temperatūroje. Pravėsus tirpalui maždaug iki 50°C temperatūros, pridedama 100 μg/mL ampicilino ir gerai išmaišius gauta terpė išpilstoma į Petri lėkšteles ir kambario temperatūroje laukiama kol sustings.

Skysta LB (Luria broth) terpė: 2,5 g LB terpės ištirpinama 96 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min. 121°C temperatūroje. Atvėsus tirpalui laminariniam bokse pridedama ampicilino (100 mg/mL), kad jo galutinė koncentracija būtų 100 μg/mL.

Auto-induktyvi mitybinė terpė ZYM-5052: 10 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 3,55 g Na₂HPO₄, 3,4 g KH₂PO₄, 2,675 g NH₄Cl, 0,7 g Na₂SO₄, 0,49 g MgSO₄ ištirpinama 900 mL dejonizuoto vandens. Atskirai atsveriami 5 g glicerolio, 0,5 g D-gliukozės ir 2 g laktozės ir ištirpinama 100 mL dejonizuoto vandens. Abu tirpalai autoklavuojami 20 min. 121°C temperatūroje. Atvėsus, laminariniam bokse, šie tirpalai sumaišomi ir pridedama ampicilino (100 mg/mL), kad jo galutinė koncentracija būtų 100 μg/mL.

S.O.C. mitybinė terpė: 2 g peptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės. Peptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl

tirpinami 97 mL dejonizuoto vandens. Pridedama Mg^{2+} druskų, gliukozės ir steriliai nufiltruojama.

2.1.8 Oligonukleotidų pradmenys

Norint atlikti pelės prioninio baltymo W144STOP mutaciją buvo naudojami nukleotidų sekų pradmenys (1 lentelė.).

1 lentelė. Nukleotidų pradmenys

Mutacija	Pradmens tipas	Pradmens nukleotidų seka
W144 STOP	Tiesioginis	5' - CATTGGCAACGATTGAGAAGATCGCTATTATCG - 3'
	Atvirkštinis	5' - CGATAATAGCGATCTTCTCAATCGTTGCCAAAATG - 3'

2.2 Metodai

2.2.1 Polimerinė grandininė reakcija.

Šiai reakcijai atlikti buvo naudojami reagentai (1 lentelė) ir naudojamos sąlygos (2 lentelė) pateiktos žemiau.

2 lentelė. PGR reakcijos reagentai

Medžiagos	V, μ L
H ₂ O	8,50
dNTP	2,00
Tiesioginis pradmuo	1,25
Atvirkštinis pradmuo	1,25
Pgu buferis su Mg^{2+} jonais	2,00
pRSETB plazmidė 150 ng/ μ L	4,00
Pfu polimerazė	1,00

3 lentelė. PGR reakcijos sąlygos

Nr.	Temperatūra, °C	Trukmė, s	Kartojimų skaičius
1.	95	180	1
2.	95	30	25
3.	58	30	
4.	78	450	
5.	78	300	1

2.2.2 Nukleorūgščių elektroforezės gelio paruošimo eiga

Imama 30 mL 1% agarozės tirpalo ir pridedama 1,5 µL Et-Br, supilama agarozės geliui formuoti skirtą dėklą, įdedamos „šukos“. Susiformavęs gelis dedamas į elektroforezės gelio aparatą ir užpilama TE (*Tris-EDTA*) buferio. Į elektroforezės gelio šulinėlius yra suleidžiami mėginiai, bei molekulinis žymuo. Paleidus aparatą, naudojama įtampa 150V.

2.2.3 Plazmidės transformacija į bakterijų kamienus

Jeigu tai polimerinės grandininės reakcijos produktas, tada į 25 µL dedama 1 µL DpnI restriktazės ir inkubuojama vieną valandą. Tada 5 µL inkubuoto mėginio dedama į *E. coli* XLGold kompetentines ląsteles. Jeigu tai plazmidės išskyrimo rinkiniu išgryninta plazmidė, tada paimama 5 µL plazmidės tirpalo ir įdedama į *E. coli* BL21 Star kompetentines ląsteles. Abejais atvejais šaldoma pusvalandį ant ledo. Tada laikoma 42 °C – 90 sekundžių. Vėl šaldoma ant ledo 120 sekundžių. Po to pridedama 300 µL S.O.C. ir inkubuojama 45 minutes. Tada galima sėti ant petri lėkštelės padengtos agarizuotos lėkštelės su ampicilino antibiotiku.

2.2.4 Baltymų elektroforezė

Skiriamąjo (3 lentelė) ir koncentruojamojo (4 lentelė) gelio paruošimui naudojamos medžiagos:

4 lentelė. Skiriamąjo gelio 12% sudėtis

Skiriamasis gelis 12 %	
Distiliuotas Vanduo	2,55 mL
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,53 mL
40% AA/BAA	1,83 mL
10% NDS	61,0 µL
10% APS	30,5 µL
TEMED	3,65 µL

5 lentelė. Koncentruojamo gelio 4% sudėtis

Koncentruojamasis gelis 4%	
Distiliuotas Vanduo	1,27 mL
1,5M Tris-HCl pH 8,8	500 µL
40 % AA/BAA	201 µL
10 % NDS	20 µL
10 % APS	10 µL
TEMED	2 µL

Sumaišius skiriamą 12 % gelio komponentus, mišinys yra supilamas tarp dviejų stiklinių elektroforezės plokštelių. Kai skystis polimerizuojasi, sumaišomi koncentruojamojo 4 % gelio komponentai ir užpilama ant viršaus. Į šį sluoksnį įdedamos „šukos“. Susiformavus geliui stiklinės plokštelės įdedamos į elektroforezės aparatą. Aparato talpyklos pripildomos baltymų elektroforezės buferiu. Elektroforezės metu leidžiama 30 mA srovės ir 150 V įtampos riba. Pasibaigus elektroforezei išimamas gelis praplaunamas dejonizuotu vandeniu. Tada jis dažomas „Ez-run“ dažų bent 45 minutes. Po to gelis paliekamas išryškėti dejonizuotame vandenyje.

2.2.5 Baltymo gryninimas

Naudoti buferiniai tirpalai A1, A2, A3 ir B1.

Biomasa užpilama buferiniu tirpalu B1 ir homogenizuojama homogenizatoriumi. Tada ardama ant ledo 15 minučių ultragarsu 70 % galios 60 sekundžių darbiniais ciklais su 60 sekundžių pertraukomis. Po to, centrifuguojama 20 min, 4 °C temperatūroje 30.000 x g. Gautame supernatante yra tikslinis baltymas. Supernatantas užpilamas ant sorbento „Ni Sepharose™ 6 Fast flow“ ir inkubuojamas lėtai maišant vieną valandą tam, kad tikslinis prisijungtų prie sorbentu. Sorbentas yra pakraunamas į kolonėlę (XK26/20). Kolonėlė prijungiama prie chromatografinės sistemos. Paleidžiama programa, leidžiami buferiniai tirpalai per kolonėlę:

- 3 mL/min greičiu praleidžiama 100 mL B1 buferinio tirpalo;
- 1 mL/min greičiu praleidžiamas 100 mL buferinių tirpalų B1/A1 gradientas pilnai pakeičiant B1 buferinį tirpalą;
- 3 mL/min greičiu praleidžiama 50 mL buferinio tirpalo A1;
- 3 mL/min greičiu praleidžiama 100 mL buferinio tirpalo A2;
- 3 mL/min greičiu praleidžiama 150 mL buferinio tirpalo A3,

Praleidus A3 buferinį tirpalą, yra renkamos frakcijos. Matuojant UV sugertį ($\lambda = 280$), pasirenkamos frakcijos, kuriose buvo detektuojamas baltymas. Jos supilamos į 6-8 kDa pralaidumo dializės žarną ir dializuojamos prieš vandenį – 4 kartus po 5 L.

2.2.6 Išgryninto baltymo paruošimas liofilizacijai

Dializuotas baltymo tirpalas yra nufiltruojamas 0,45 μm porų dydžio filtru. „Nanodrop 2000“ spektrofotometru pamatuojama filtrato koncentracija. Koncentracija apskaičiuojama pasitelkiant masės (14659.1 Da) ir ekstinkcijos koeficiento ($42970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) vertėmis gautomis ExPaSy baltymų parametrų įrankiu („Expasy ProtParam tool“) (Gasteiger et al. 2005). Tada tirpalas koncentruojamas 10 kDa pralaidumo koncentratoriais iki 1 mg/ml koncentracijos, jeigu pamatuota koncentracija yra žemiau šios ribos.

Turimas 1 mg/mL baltymo koncentracijos tirpalas yra supilstomas po 10 mL į 50 mL tūrio mėgintuvėlius ir užšaldomas (-80°C temperatūroje) ir po to liofilizuojamas.

2.2.7 Baltymo paruošimas eksperimentams

Liofilizuotas baltymas yra tirpinamas C1 arba C2 buferiniais tirpalais taip, kad baltymo koncentracija tirpale nebūtų žemesnė nei 3 mg/mL. Baltymo tirpalas yra filtruojamas 13 mm diametro, 0,22 μm porų dydžio regeneruotos celiuliozės filtru, koncentracija matuojama „Nanodrop 2000“ aparatu. Apskaičiavus koncentraciją, baltymo tirpalas yra skiedžiamas taip, kad galutinė koncentracija būtų 2 mg/mL.

2.2.8 De novo baltymo agregacijos tyrimai

Amiloidinių agregatų susidarymas buvo stebimas matuojant amiloidiniams agregatams specifinio fluorescencinio dažo Tioflavino T intensyvumo pokytį (sužadinimas 450 nm, emisija 482 nm bangų srityje). 10 mM Tioflavino T tirpalas skiedžiamas taip, kad galutinė jo koncentracija baltymo tirpale būtų 50 μM .

2 mg/mL baltymo spontaninė agregacija buvo atliekama 37°C temperatūroje naudojant rotacinį maišytuvą, maišant 8 aps./min. Mėginiai imti laiko intervalais ir matuoti fluorimetru skiedžiant 10 μL mėginį su 190 μL C1 arba C2 buferiniu tirpalu – buferinis tirpalas pasirenkamas priklausomai nuo pradinio buferinio tirpalo. Taip pat, tos pačios koncentracijos baltymo spontaninė agregacija buvo atliekama mikroplokštelių skaitytuvu naudojant 96 šulinėlių plokštelę pridodant po rutuliuką į kiekvieną šulinėlį. 2 mg/mL baltymo tirpalas buvo išpilstytas po 100 μL į šulinėlius. Plokštelė viso ekperimento metu buvo pastoviai purtoma 16 Hz (960 aps./min) dažniu.

2.2.9 Inicijuotas baltymo agregacija

Amiloidinių agregatų susidarymas stebimas naudojant tokią pačią metodiką kaip 2.2.8 skyriuje. Šiuo atveju agregacija yra inicijuojama jau susidariusiais agregatų nukleacijos branduoliais („sėkla“), kurie gaunami spontaniškai susidariusius agregatus ardant ultragarsu 20 % galios 30 sekundžių darbiniais ciklais su 30 sekundžių pertraukomis naudojant „Bandelin Sonopuls“ ultragarso aparatą su MS72 antgaliu. Taip apdorojus amiloidinius agregatus, gaunamas didesnis kiekis nukleacijos branduolių, bei homogenizuota suspensija.

Inicijuotos agregacijos kinetikos priklausomybei nuo baltymo koncentracijos stebėti buvo naudojamas 4,5 mg/mL baltymo tirpalas (turintis 50 μ M ThT), skiedžiamas C1 buferiniu tirpalu (turinčiu 50 μ M ThT) iki galutinių 4, 2, 1, 0,5 mg/mL koncentracijų. Į kiekvieną mėginį pridedama ultragarsu ardytos „sėklos“ 10 % (nuo baltymo koncentracijos). Mišinys yra padalinamas po 20 μ L į PGR tipo mėgintuvėlius ir sudedami į „Qiagen Rotor-gene Q“ aparatą. Matuojamas ThT fluorescencijos intensyvumo pokytis 37 °C temperatūroje.

Inicijuotos agregacijos kinetikos priklausomybei nuo „sėklos“ koncentracijos stebėti buvo naudojama tokia pati baltymo ir „sėklos“ paruošimo bei fluorescencijos intensyvumo pokyčio stebėjimo metodika, kaip ir prieš tai apibūdintame eksperimente. Mėginys yra paruošiamas taip, kad galutinė baltymo koncentracija būtų 2 mg/mL o „sėklos“ koncentracija skirtinguose mėginiuose būtų atitinkamai – 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % (nuo baltymo koncentracijos).

Vėliau atliktuose inicijuotos agregacijos kinetikos tyrimuose buvo naudojami moPrP23-143 baltymo amiloidiniai agregatai ir natyvių moPrP89-230, moPrP23-230 baltymų tirpalai. Fluorescencijos pokyčio priklausomybės laike stebėjimui buvo naudojama tokia pati baltymo ir „sėklos“ paruošimo metodiką. ThT fluorescencijos intensyvumo pokytis matuojamas 60 °C temperatūroje. Likęs mėginio tūris yra inkubuojamas termostate, kuriame pastoviai laikoma 60 °C temperatūra.

Po eksperimento paimami amiloidinių agregatų mėginiai iš kiekvieno reakcijos mėgintuvėlio ir naudojami kaip „sėkla“ inicijuoti baltymo agregaciją („persėjimas“). Eksperimentas kartojamas 4 kartus.

2.2.10 Fibrilinių agregatų stabilumo tyrimai

Stabilumo tyrimams atlikti naudojami buferiniai tirpalai C4 ir C5. Amiloidiniai agregatai pagaminti C1 buferiniame tirpale yra ardami ultragarsu 1 minutę esant 20 % darbinės galios su MS72 antgaliu. Homogenizatas išpilstomas po 30 μ L tokiu santykiu su buferiniu tirpalu C4, kuriame yra 50 μ M ThT, kad GuHCl koncentracija mėginiuose varijuotų nuo 0 iki 4,5 M.

Mėginių fluorescencijos pokyčio priklausomybė nuo laiko yra stebima mikroplokštelių skaitytuvu.

2.2.11 Baltymų struktūros tyrimai FTIR spektroskopu

Susidarę amiloidiniai agregatai buvo centrifuguojami (30 min 17.500 x g), nusiurbiamas supernatantas ir nuosėdos resuspenduojamos 1 mL D₂O. Procedūra yra kartojama keturis kartus, kol pilnai atplaunami mėginiai nuo mėginio buferinio tirpalo. Mėginį centrifuguojant penktą kartą, nuosėdos resuspenduojamos 250 μL D₂O. Mėginys homogenizuojamas jį ardant ultragarsu 1 minutę, esant 20 % darbinės galios su MS72 antgaliu.

Fourjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektro matavimai buvo atlikti naudojant „Brucker Alpha“ spektroskopą. 60 μL fibrilinių agregatų homogenizato matuojama naudojant CaF₂ matavimo celės su 50 μm tarpine. Spektras nuskaitomas 256 kartus išvedant vidurkį. Prieš atliekant matavimus visada yra nuimamas foninis signalas, vandens garų spektras ir D₂O spektras, kad po to galima būtų apdoroti spektrus palyginimui (Surewicz et al. 1988) naudojant programą „Grams/AI“.

2.2.12 Atominės jėgos mikroskopija

20 μL mėginio yra užnešama ant 1 cm diametro žėručio disko. Mėginys palaikomas 1 minutę ant žėručio. Tada švelnia srove nuplaunamas MilliQ vandeniui ir džiovinamas švelnia suspausto oro srove. Mikroskopavimas atliekamas atominės jėgos mikroskopu dinaminiam „Dimension Icon Bruker“ virpančio zondo režime. Skanavimui naudotos aliuminiu dengtos silikoninės adatos (RTESPA-300 Bruker), kurių virpėjimo dažnis ~300 kHz. Tyrimo metu naudotas skenavimo greitis 1 Hz, maksimali skenavimo kokybė 1024 x 1024 taškų.

2.2.13 Kinetinių duomenų apdorojimas

Amiloidinių agregatų „sėkla“ indukuoto formavimosi kinetiką galima sekti matuojant ThT fluorescencijos intensyvumo pokytį laike. Norint palyginti kreives esant skirtingoms baltymų ir „sėklos“ koncentracijoms, reikia normalizuoti kreives (**1 lygtis**).

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{A_x - A_{\min}}{A_{\max} - A_{\min}} * \left(1 - \frac{S}{100}\right) + \frac{S}{100}$$

1 lygtis. Kreivės normalizavimo lygtis. A_x – fluorescencijos reikšmė x laiko momentu, A_{\min} – fluorescencijos reikšmė pradiniu laiko momentu, A_{\max} – maksimali fluorescencijos reikšmė, S – pridėtos „sėklos“ koncentracija (procentais nuo viso baltymo koncentracijos).

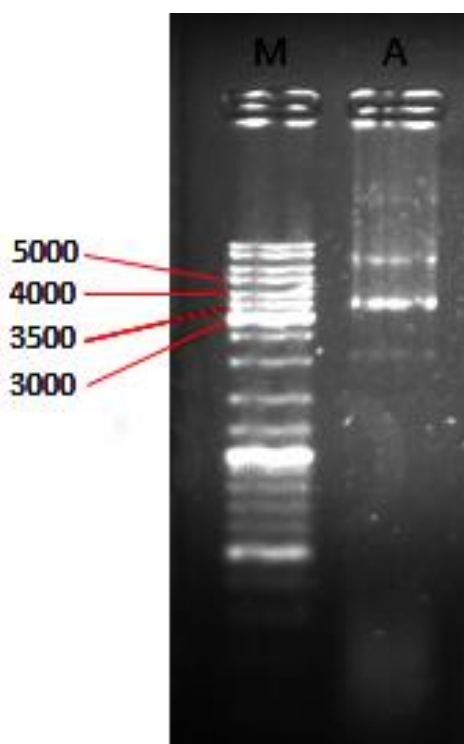
Šis normalizavimo metodas palengvina duomenų apdorojimą, bei galima išskaičiuoti t_{50} vertę, kurią galima naudoti kreivių kitimo laike palyginimui. t_{50} vertės skaičiavimas atliekamas normalizuotos kreivės artimiausių verčių prie 50 % aproksimacijai pagal laiką.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Rekombinantinio moPrP23-143 kryptinga mutagenezė

W144STOP mutacija įterpta į MoPrP23-230 geną vykdant PGR. Mutagenezės metu buvo naudojami pradmenys, kurių nukleotidų sekų centruose yra vieno nukleotido neatitikimas, kuris keičia triptofano aminorūgštį koduojantį kodoną TGG į stop kodoną koduojantį TGA.

Siekiant įsitikinti, kad yra gautas tinkamas konstruktas buvo atlikta nukleorūgščių elektroforezė. PGR produktai buvo patikrinti nukleorūgščių elektroforezės metodu naudojant molekulinės masės žymenį (13 pav.) Biotechnologijos instituto sekvenavimo centre buvo atlikti sekvenavimo tyrimai, kurių rezultatai patvirtino įvykusią mutaciją.



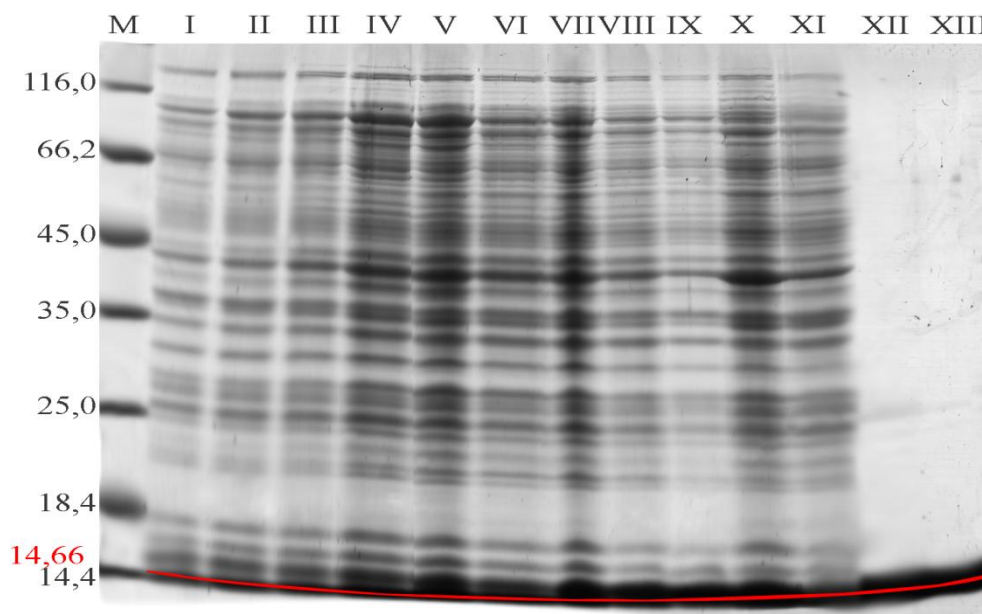
13 pav. Agarozės gelis. M - molekulinės masės žymio. A – DNR su W144STOP mutacija.

Gautas PGR produkto tirpalas buvo inkubuojamas su DpnI, kuris specifiskai kerpa metilintą DNR. Tokiu atveju šabloninė (metilinta) DNR, kuri buvo išskirta iš *E. coli* bakterijų, yra sukarpoma. Likęs mišinys yra transformuojamas į *E. coli* XLGold kompetentines ląsteles. Iš gautos biomasės, naudojant „Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį išgryninta plazmidinė DNR. Gautos plazmidinės DNR koncentracija yra 110,14 ng/μL.

3.2 Rekombinantinio moPrP23-143 raiška ir gryninimas

3.2.1 Rekombinantinio moPrP23-143 raiška

Rekombinantinio pelės prioninio baltymo W144STOP mutanto sintezė transformantuose patikrinta NDS-PAAG elektroforezės metodu (**14 pav.**).

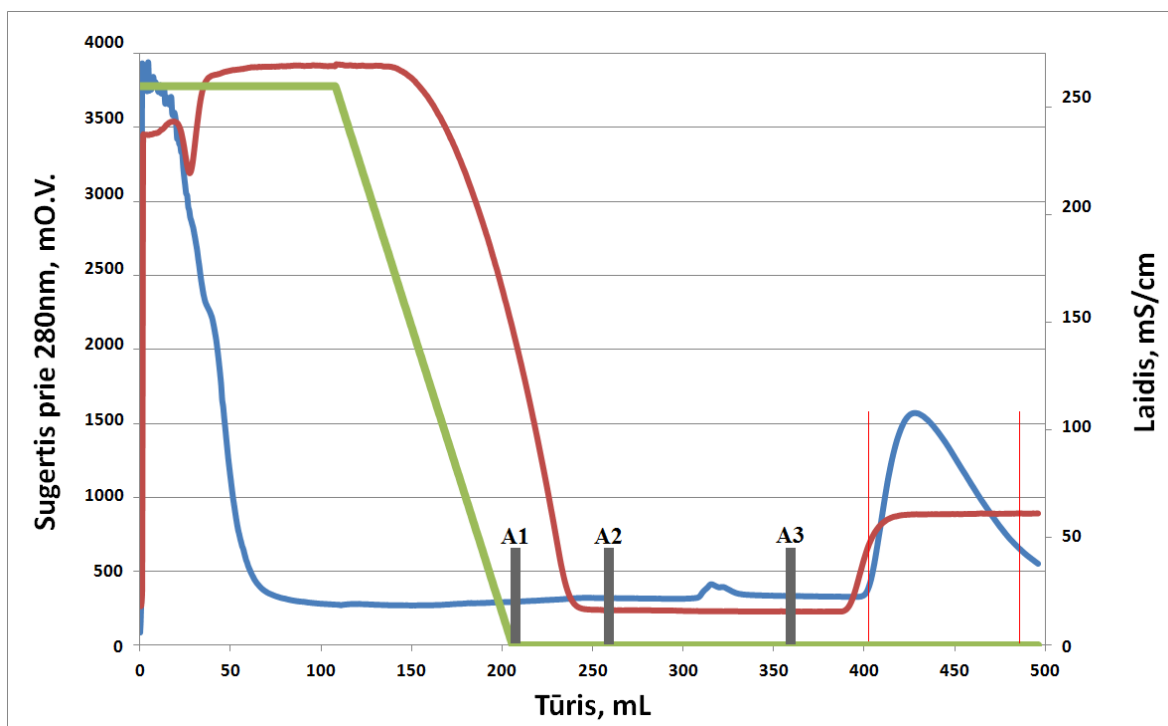


14 pav. moPrP23-143 sintezė transformantuose. M – molekulinės masės žymuo, I – VIII – kas valandą mėginiai imti iš auginamosios kultūros nuo užsėjimo pradžios, IX – mėginys paimtas šešioliktą valandą nuo užsėjimo pradžios, X – ląstelių homogenizatas B1 buferyje, XI – nesisorbavusi frakcija, XII – išgrynintas baltymas, XIII – ištirpintas liofilizuotas baltymas. Raudona linija pavaizduoja tikslinio baltymo ekspresiją.

Tikslinio rekombinantinio baltymo molekulinė masė yra nustatyta naudojantis Expassy ProtParam įrankiu.

3.2.2 Rekombinantinio moPrP23-143 gryninimas

Rekombinantinis prioninis baltymas yra sintetinamas į intarpinius kūnelius, todėl baltymui ištirpinti yra naudojamas stiprus denatūrantas – 6 M GuHCl. Denatūrantas pašalinamas pirmame metalų chelatinės giminingumo chromatografijos žingsnyje palaipsniui mažinant GuHCl koncentraciją. Pašalinus GuHCl, chromatografijos kolonėlė praplaunama A2 buferiniu tirpalu (**15 pav.**). Laidumo pokytis laike kinta priklausomai nuo buferinių tirpalų naudotų chromatografijos metu - didelę joninę jėgą turinčio 6 M GuHCl buferinio tirpalo bei eliucijos buferyje A3 esančio 700 mM imidazolo koncentracijos tirpalo. Iš sugerties kreivės matoma, kad didžioji dalis kolonoje esančių baltymų eliuoja iš karto, o likę priemaišiniai baltymai atsiplauna prie 50 mM imidazolo koncentracijos. Tikslinio baltymo eliucija stebima leidžiant A3 buferinį tirpalą.



15 pav. MoPrP23-143 baltymo gryninimas metalų chelatinės giminingumo chromatografijos metodu. Mėlyna linija – sugertis prie 280 nm bangos ilgio, raudona linija – laidis, žalia linija – į koloną leidžiamo 6 M GuHCl koncentracija. A1, A2, A3 – buferiniai tirpalai aprašyti 2.1.3 dalyje. Tikslinio baltymo frakcija apibrėžta vertikaliomis raudomis linijomis, surinkta 19 frakcijų po 5 mL (95 mL).

15 paveikslėlyje pateiktoje elektroforegamoje matosi tikslinio baltymo juostelė, kuri atitinka moPrP23-143. Po atliktos dializės bei ištirpinus baltymą po liofilizavimo, reikėjo galutinai patvirtinti, jog išgrynintas tikslinis baltymas. Tam buvo atlikta masių spektrometrinė analizė (atliko dr. Vytautas Smirnovas). Rezultatai patvirtino, jog išgrynintas baltymas yra moPrP23-143 (**6 lentelė**).

6 lentelė. Masių spektrometrinės analizės duomenys

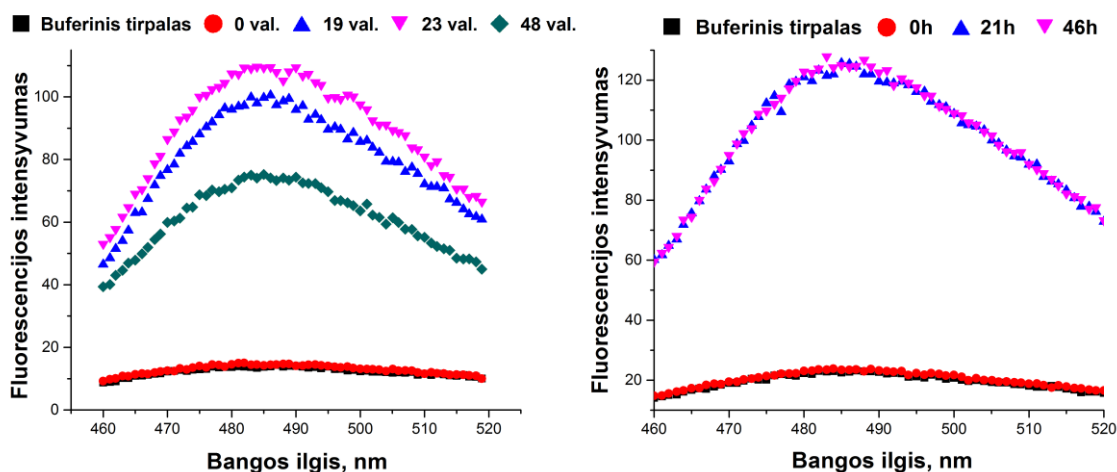
Teorinė rekombinantinio moPrP23-143 molekulinė masė, Da	Praktiškai išmatuota rekombinantinio moPrP23-143 molekulinė masė, Da
14659,1	14659 ± 1

Darbo metu buvo atlikti 4 tikslinio baltymo gryninimai metalų chelatinės giminingumo chromatografijos metodu, po kurių bendrai buvo gauta $229,1 \pm 0,5$ mg gyno moPrP23-143.

3.3 Rekombinantinio moPrP23-143 agregacijos tyrimai

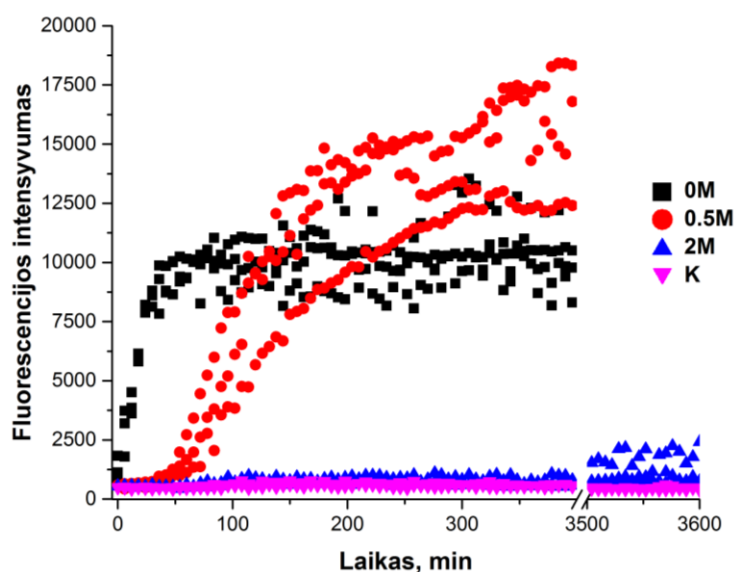
3.3.1 *De novo* agregacijos tyrimai

Pasigaminus gryno baltymo nuspręsta patikrinti moPrP23-143 spontaninę agregaciją, buvo vykdoma rekombinantinio baltymo inkubacija 0 M ir 0,5 M GuHCl 50 mM pH 6,4 fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose 37 °C laipsnių temperatūroje vertikaliai vartant 8 aps./min (**16 pav.**). Fibrilių susidarymas buvo nustatomas matuojant ThT fluorescencijos pokytį.



16 pav. ThT fluorescencijos spektrai. Gauti moPrP23-143 fibriliniai agregatai buferiniuose tirpaluose, 0 M ir 0,5 M GuHCl koncentracijose. Naudota kontrolė – buferinis tirpalas.

Norint patikrinti moPrP23-143 spontaninės agregacijos kinetiką, buvo atliekamas agregacijos tyrimas su skirtingomis GuHCl koncentracijomis užrašant ThT fluorescencijos pokytį laike mikroplokštelių skaitytuvu (**17 pav.**).

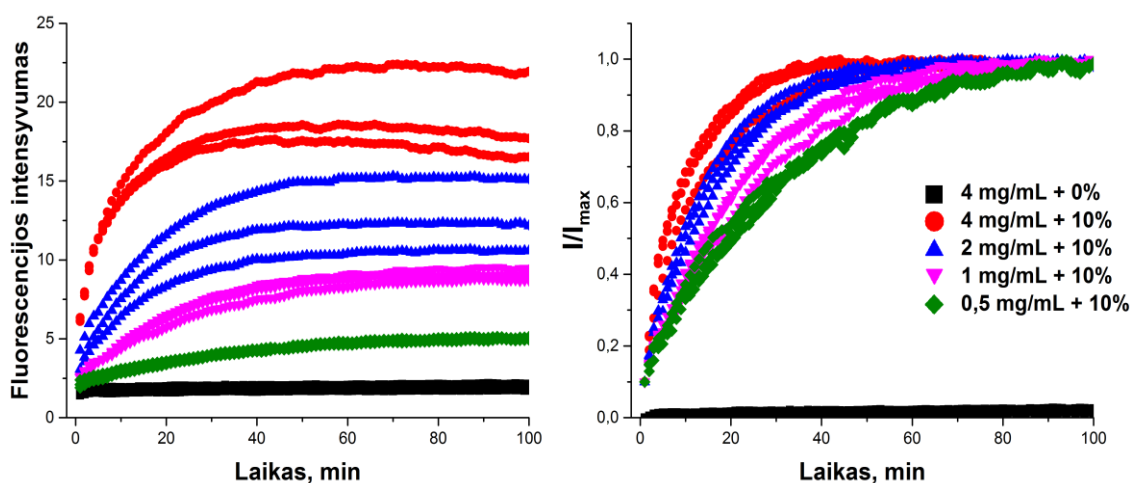


17 pav. MoPrP23-143 spontaninės agregacijos kinetika 37 °C purtant 16 Hz dažniu. Mėginiai tarpusavyje skiriasi GuHCl koncentracija buferiniuose tirpaluose. Naudota kontrolė – C1 buferinis tirpalas.

Remiantis 17 pav. pateiktais duomenimis nustatyta, kad tirpale esant 0 M GuHCl spontaninė agregacija vyksta greičiau, nei esant 0,5 M GuHCl. Spontaninė moPrP23-143 agregacija tirpale esant 2 M GuHCl koncentracijai praktiškai nevyksta per pirmas 24 valandas.

3.3.2 Inicijuotos agregacijos kinetiniai tyrimai

MoPrP23-143 skirtingų koncentracijų baltymų tirpalai (0,5 – 4 mg/mL) buvo paveikti tos pačios koncentracijos fibrilinais agregatais. Pavaizduota fluorescencijos intensyvumo pokyčio bei normalizuoto intensyvumo pokyčio priklausomybė nuo laiko prie 0 M GuHCl (**18 pav.**). Procesas stebėtas matuojant ThT fluorescencijos pokytį laike 37 °C temperatūroje. Gauta atvirkštinė agregacijos puslaikio priklausomybė nuo baltymo koncentracijos (**7 lentelė.**).

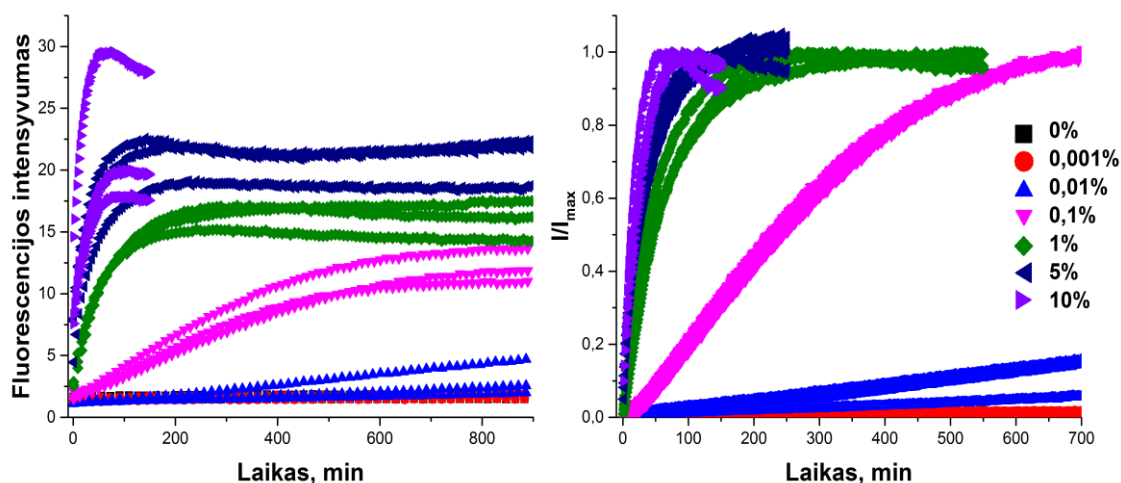


18 pav. Baltymo fluorescencijos intensyvumo pokyčio priklausomybė nuo laiko pavaizduota dešinėje paveikslėlio pusėje, o kairėje normalizuotos fluorescencijos intensyvumo pokyčio priklausomybės nuo laiko kreivės. Kontrolinis tirpalas – C1 buferinis tirpalas su 4 mg/mL moPrP23-143 baltymo koncentracija.

7 lentelė. Puslaikio reikšmės esant skirtingai baltymo koncentracijai.

Baltymo koncentracija, mg/mL	t_{50} , min
4	$6,03 \pm 1,40$
2	$11,96 \pm 2,20$
1	$15,20 \pm 2,28$
0,5	$18,71 \pm 2,87$

Norint atlikti agregacijos priklausomybės nuo „sėklos“ koncentracijos kinetinius matavimus buvo naudojama 2 mg/mL baltymo koncentracija (**19 pav.**). Procesas stebėtas matuojant ThT fluorescencijos pokytį laike 37 °C temperatūroje. Pastebėta, kad didinant pridėtos „sėklos“ procentinę koncentraciją, trumpėja agregacijos puslaikis (**8 lentelė.**).

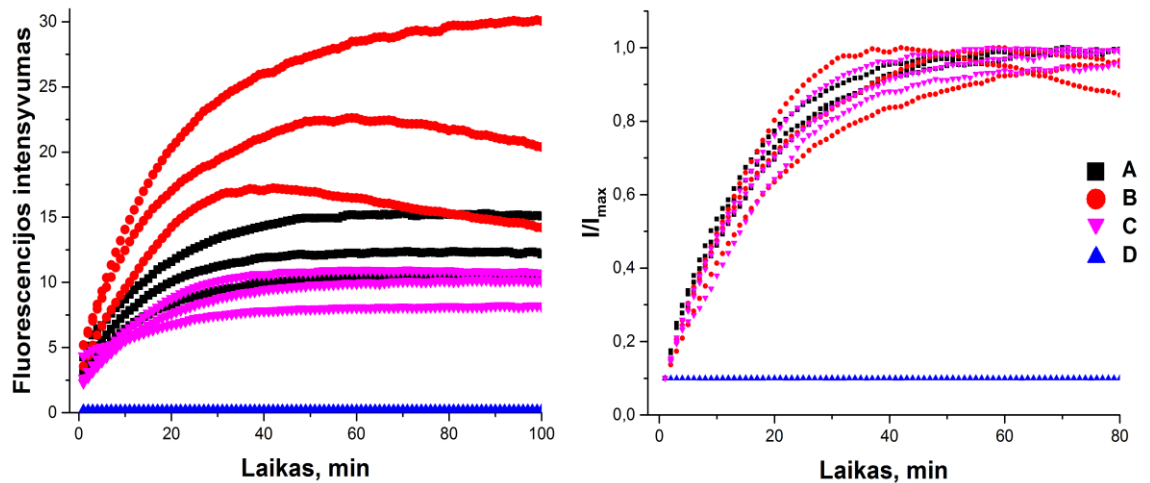


19 pav. Fluorescencijos intensyvumo pokyčio priklausomybė nuo „sėklos“ koncentracijos pavaizduota dešinėje pusėje, kairėje normalizuoto intensyvumo kreivės.

8 lentelė. Inicijuotos agregacijos puslaikio reikšmės pridėjus skirtingas „sėklos“ procentines koncentracijas.

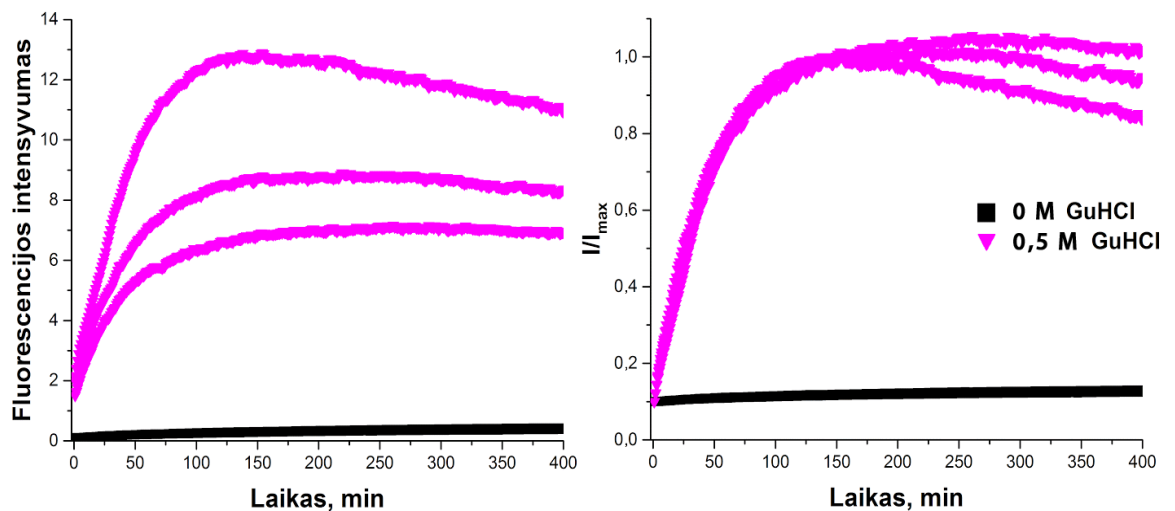
Pridėtos „sėklos“ procentinė koncentracija	t_{50} , min
10 %	$11,96 \pm 2,20$
5 %	$21,45 \pm 2,47$
1 %	$41,56 \pm 6,92$
0,1 %	$243,66 \pm 18,28$

Prieš atliekat tolimesnius tyrimus buvo iškeltas klausimas, kaip turėtų kisti fibrilių inicijuotos agregacijos kinetika inicijuojant baltymo agregaciją su skirtingomis sąlygomis pagamintais fibriliniiais agregatais. Todėl buvo atliktas persėjimas amiloidinių agregatų formuotų 0 M ir 0.5 M GuHCl koncentracijose, pasirinkta 10 % „sėklos“ dėl greitos inicijuotos agregacijos laiko. Procesas stebėtas matuojant ThT fluorescencijos pokytį laike 37 °C temperatūroje (**20 pav.**). Iš paveikslo matome, kad be GuHCl susidariusios fibrilės neinicijavo agregacijos esant 0,5 M GuHCl koncentracijai, kitais atvejais inicijuota agregacija vyko panašiu greičiu.



20 pav. Kairėje fluorescencijos intensyvumo pokyčio priklausomybės nuo laiko grafikas, o dešinėje normalizuoto intensyvumo pokyčio kreivės. Paaiškinimas - (baltymo tirpalas GuHCl konc.) + (fibrilės formuotos GuHCl konc.): A – 0 M GuHCl + 10 % 0 M GuHCl; B – 0 M GuHCl + 10 % 0,5 M GuHCl; C – 0,5 M GuHCl + 10 % 0,5 M GuHCl; D – 0,5 M GuHCl + 10 % 0 M GuHCl.

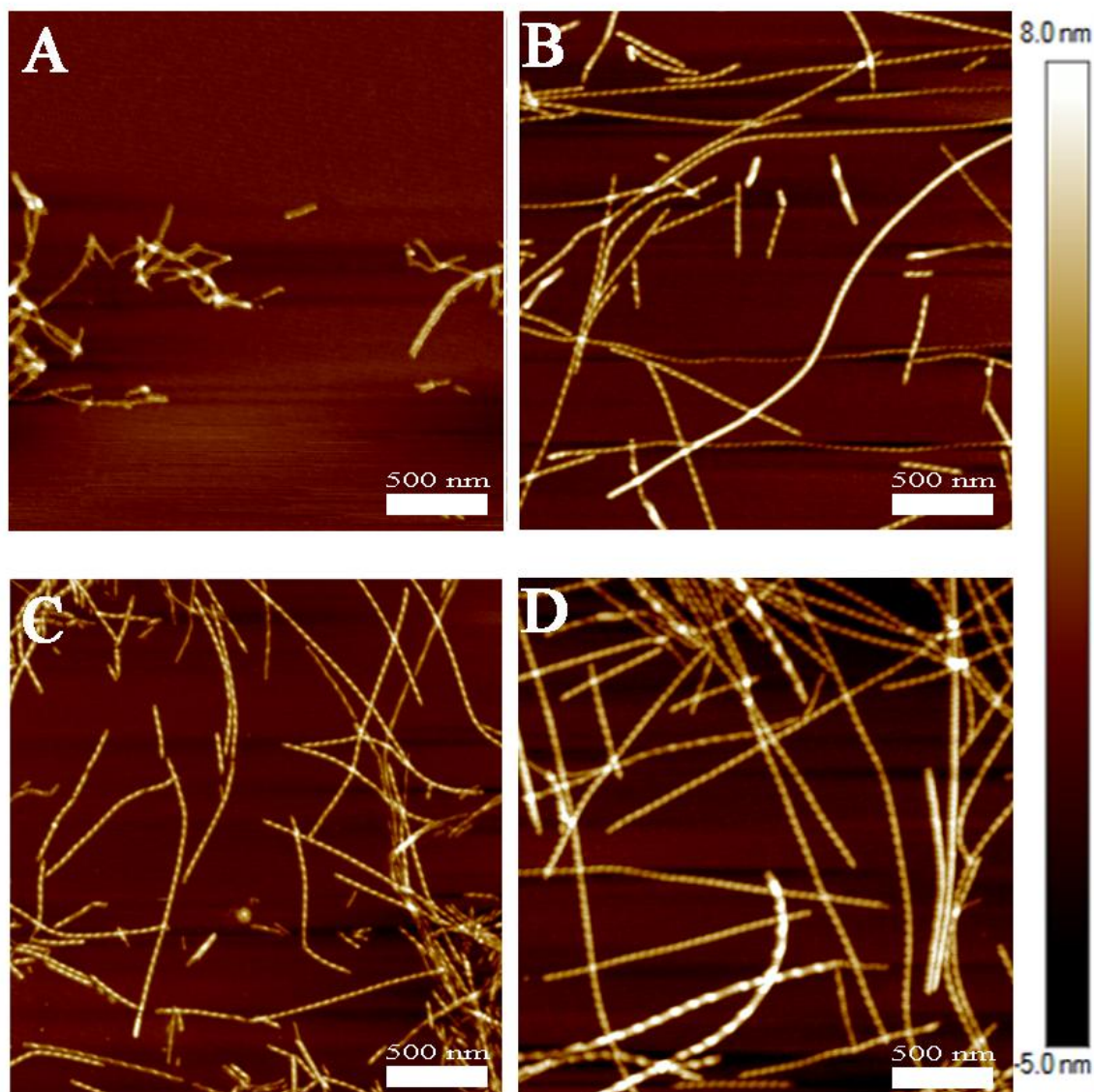
Tikintis, kad reakcija pagreitės, buvo atlikti inicijuotos agregacijos tyrimai 60 °C temperatūroje. Rezultatai buvo visiškai netikėti (**21 pav.**). Baltymo tirpale be GuHCl inicijuota agregacija neprasisidėjo per 400 minučių, o 0,5 M GuHCl koncentracijoje buvo daugiau nei dvigubai lėtesnė prie 60 °C temperatūros ($27,67 \pm 3,26$ min) , nei prie 37 °C ($11,82 \pm 2,25$ min) lyginant inicijuotos agregacijos puslaikius. Tokie rezultatai yra kontraversiški, nes tiriant moPrP89-230 priklausomybę nuo temperatūros, buvo pastebėta, kad didinant temperatūrą, agregacijos laikas trumpėja (Molto et al. 2014). Tai galėtų būti dėl to, kad skirtingai nei moPrP89-230, moPrP23-143 neturi aiškios erdvinės struktūros. Gali būti, kad moPrP23-143 agregacijai neegzistuoja kinetinis barjeras.



21 pav. Fluorescencijos intensyvumo pokyčio kreivės, bei normalizuotos jų reikšmės.

3.3.3 Fibrilinių agregatų nustatymas AJM

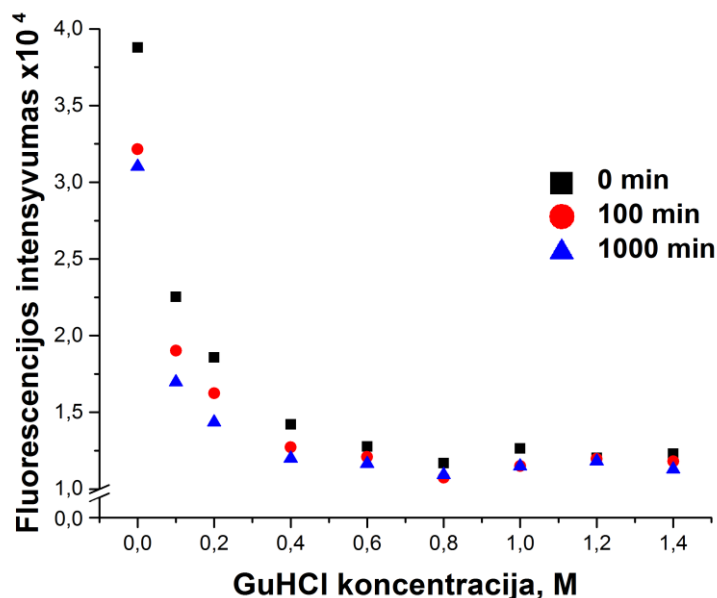
Norint įsitikinti, kad moPrP23-143 formuoja fibrilinius agregatus, mėginiai buvo ištirti atominės jėgos mikroskopu (22 pav.). Nustatyta fibrilinių agregatų morfologija atitinka literatūroje aprašytas moPrP23-143 fibriles (Kundu et al. 2003). Nors moPrP23-143 baltymo tirpalas esant 0 M GuHCl 60 °C nepasižymėjo aiškia agregacijos kinetika 22 pav. C dalyje matomi fibriliniai agregatai. Visose paveikslėlio dalyse matomi morfologiškai panašūs fibriliniai agregatai.



22 pav. MoPrP23-143 mėginių mikroskopavimas atominės jėgos mikroskopu. A ir C nuotraukoje matyti moPrP23-143 fibriliniai agregatai suformuoti buferiniame tirpale be GuHCl atitinkamai 37 °C ir 60 °C temperatūroje. B, D nuotraukoje matyti moPrP23-143 fibriliniai agregatai 0,5 M GuHCl buferiniame tirpale. B - 37 °C temperatūroje, spontaninės agregacijos metu, D – 60 °C temperatūroje, inicijuotos agregacijos metu.

3.4 Rekombinantinio moPrP23-143 agregatų stabilumo tyrimai

Gautų fibrilinių agregatų (pagamintų pagal 2.2.8 metodiką) buferiniame tirpale be GuHCl (C1) stabilumas buvo tikrinamas skirtingose GuHCl koncentracijose (**23 pav.**).



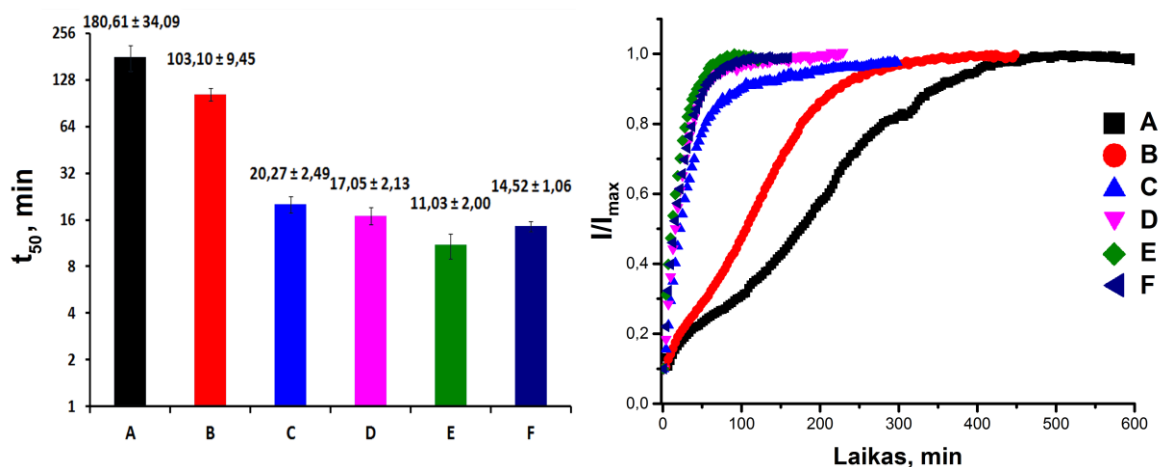
23 pav. MoPrP23-143 fibrilinių agregatų fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo GuHCl koncentracijos skirtingais laiko momentais. Juoda spalva – agregatų stabilumas eksperimento pradžioje, raudona – po 100 minučių, o mėlyna po 1000 minučių.

Gauti rezultatai parodė, jog be GuHCl aplinkoje suformuoti fibriliniai agregatai yra nestabilūs esant GuHCl. Šiais duomenimis galima paaiškinti anksčiau atlikto eksperimento duomenis (**20 pav.**). Baltymo agregatai pagaminti buferiniame tirpale be GuHCl negali inicijuoti baltymo agregacijos esant 0,5 M GuHCl, nes agregatai paprasčiausiai ištirpsta.

3.5 Rekombinantinių moPrP89-230 ir moPrP23-230 inicijuota agregacija

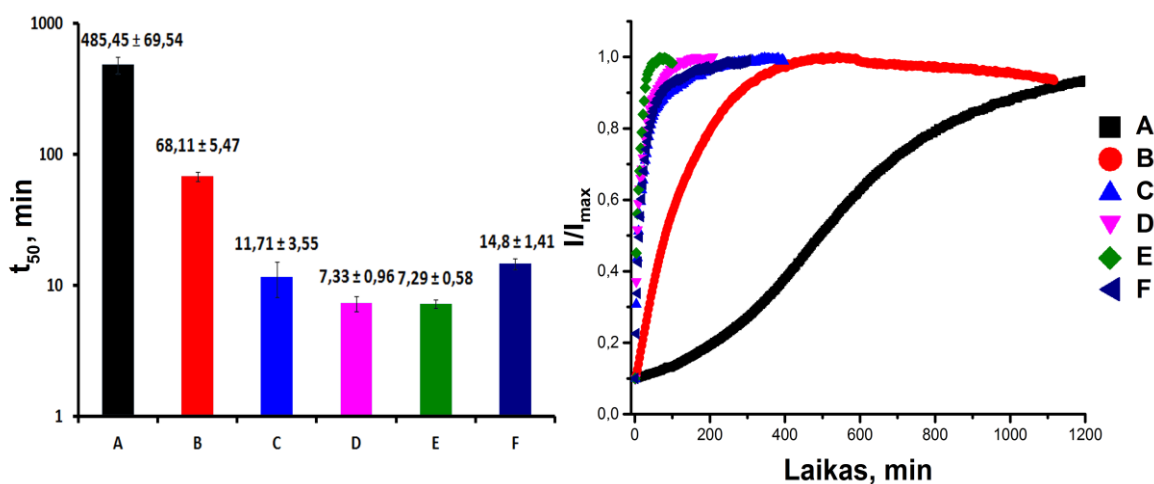
Norint patikrinti moPrP23-143 amiloidinių agregatų poveikį moPrP89-230 bei pilno ilgio pelės prioniniam baltymui, reikėjo išsirinkti palankias sąlygas, kad inicijuota agregacija įvyktų. Todėl remiantis anksčiau atliktais eksperimentais buvo nuspręsta naudoti C2 buferiniame tirpale paruoštus agregatus. Inicijuotos agregacijos sąlygos buvo pasirinktos atlikti 60 °C temperatūroje naudojant 2 mg/mL baltymo tirpalo koncentraciją, bei agregaciją inicijuoti pridedant 10 % fibrilinių agregatų nuo baltymo tirpalo koncentracijos. Persėjimai daryti tomis pačiomis sąlygomis. Rezultatai pavaizduoti agregacijos puslaikio stulpeline diagrama bei normalizuotos

fluorescencijos intensyvumo pokyčio nuo laiko priklausomybe baltymams: moPrP23-230 (24 pav.) ir moPrP89-230 (25pav.).



24 pav. moPrP23-230 inicijuotos agregacijos puslaikiai bei normalizuotos fluorescencijos intensyvumo pokyčio nuo laiko priklausomybės grafikas. A – moPrP23-230 tirpalas paveiktas moPrP23-143 fibriliniiais agregatais. B-E – moPrP23-230 tirplai paveikti fibrilėmis suformuotomis analogiškai A-D bandymo metu. F – moPrP23-230 paveiktas *de novo* suformuotais moPrP23-230 fibriliniiais agregatais.

Remiantis 24 pav. pateiktais duomenimis, nustatyta, kad inicijuojant moPrP23-230 agregaciją su moPrP23-143 fibrilėmis, inicijuotos agregacijos puslaikio vertė yra žymiai didesnė (pastebima sigmoidinė inicijuotos agregacijos laiko priklausomybė) nei baltymą inicijuojant su moPrP23-230 fibrilėmis. Atliekant tolimesnius persėjimo eksperimentus, t_{50} pastoviai mažėjo, o E eksperimento inicijuotos agregacijos puslaikio vertė yra žemesnė nei moPrP23-230 „sėkla“ paveikto baltymo.

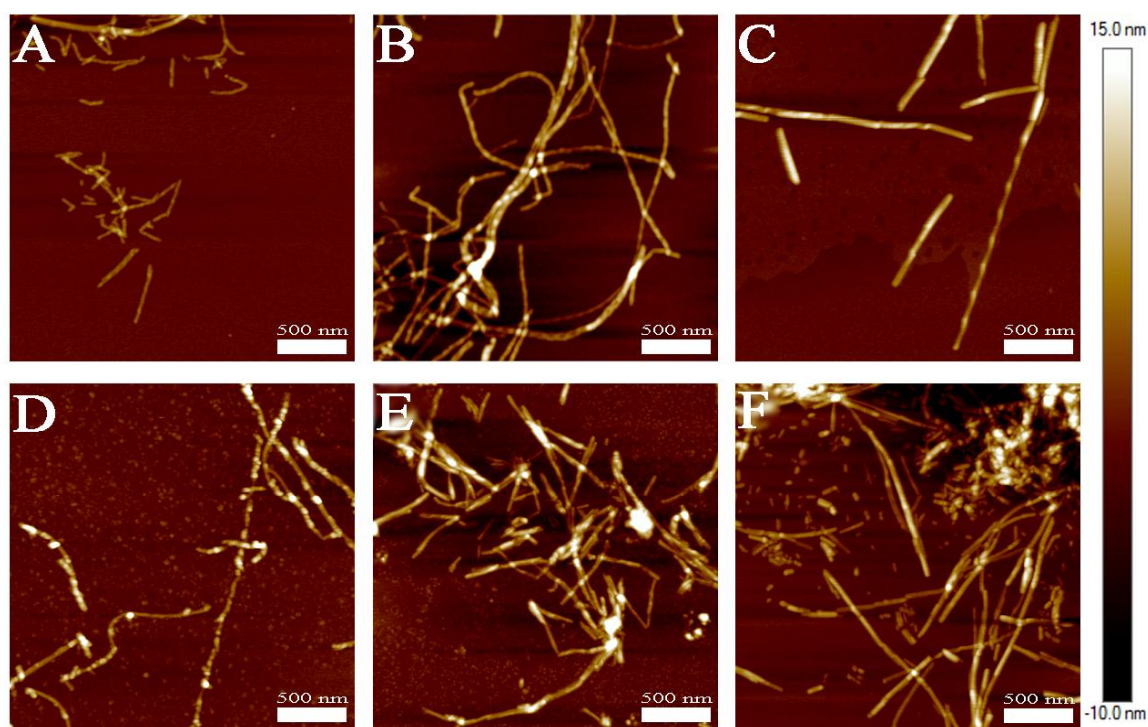


25 pav. moPrP89-230 inicijuotos agregacijos puslaikiai bei normalizuotos fluorescencijos intensyvumo pokyčio nuo laiko priklausomybės grafikas. A – moPrP89-230 tirpalas paveiktas moPrP89-143 fibriliniiais agregatais. B-E – moPrP89-230 tirplai paveikti fibrilėmis suformuotomis analogiškai A-D bandymo metu. F – moPrP89-230 paveiktas *de novo* suformuotais moPrP89-230 agregatais.

Remiantis 25 pav. duomenimis, galima teigti, kad moPrP23-143 fibrilinių agregatų inicijuota moPrP89-230 agregacija yra daug lėtesnis, nei moPrP23-230. Tai galima paaiškinti dėl to, kad moPrP89-230 neturi N galinių aminorūgščių, o moPrP23-143 neturi C galinių aminorūgščių ir persidengiančių aminorūgščių kiekis yra mažesnis nei sąveikos tarp moPrP23-143 fibrilių ir moPrP23-230. Be to iš stulpelinės diagramos matome, kad D ir E eksperimento metu inicijuotos agregacijos puslankis yra gana artimas, todėl galima teigti, kad susiformavę fibriliniai agregatai nebekinta. Taip pat pastebėta, kad moPrP89-230 *de novo* formuoti fibriliniai agregatai inicijuoja agregaciją lėčiau, nei gauti 3 ir 4 kartą persėjant moPrP23-143 paveiktą baltymą.

3.5.1 Fibrilinių agregatų susidariusių persėjimų metu nustatymas AJM

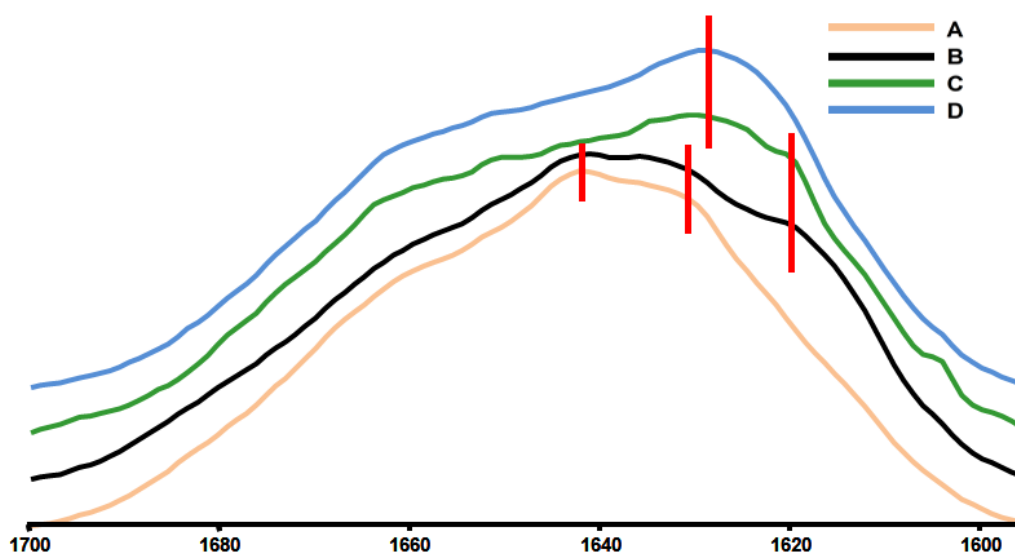
Atlikus kinetikos eksperimentus reikėjo patikrinti ar visuose mėginiuose susidarė fibriliniai agregatai. Todėl buvo atlikta fibrilių analizė AJM (26 pav.). Pastebėta, kad fibriliniai agregatai susidarė visuose mėginiuose. 26 pav. A-C nuotraukose galima įžiūrėti suktos formos fibrilinius agregatus, o D-F tiesios formos.



26 pav. Fibrilių, susidariusių persėjimo metu, nuotraukos nustatytos AFM. A – fibriliniai agregatai susidarę moPrP23-230 paveikus moPrP23-143 fibrilinais agregatais, B – moPrP23-230 ketvirto persėjimo metu susidarę agregatai, C – *de novo* suformuoti moPrP23-230 agregatai. D – fibriliniai agregatai susiformavę moPrP89-230 paveikus moPrP23-143 agregatais, E – moPrP89-230 ketvirto persėjimo metu susidarę agregatai, F – *de novo* suformuoti moPrP89-230 agregatai.

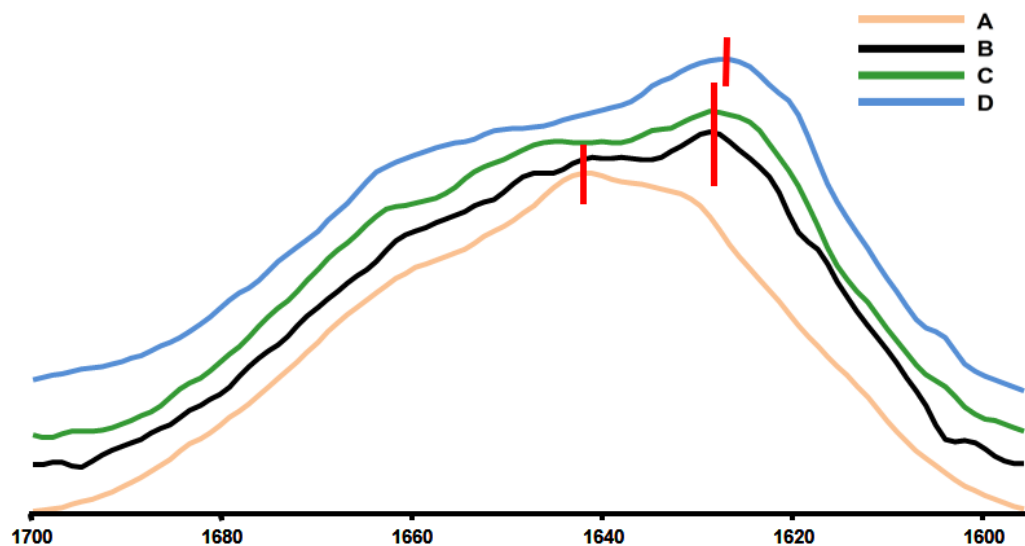
3.5.2 Fibrilinių agregatų struktūros palyginimas FTIR metodu

Pasitelkiant AJM sužinojome, kad baltymai sudaro fibrilinius agregatus. Tada kilo klausimas ar jų struktūros yra panašios (tarp persėjimų, bei tarp *de novo* suformuotų moPrP23-230, moPrP89-230). Kiekvieno iš baltymų mėginiai paimti FTIR analizei. 27 pav. Matome skirtumus tarp kiekvieno moPrP23-230 FTIR spektro. A ir B spektrai turi tuos pačius maksimumus, ties 1631 cm^{-1} (parodo β klostytą regioną) ir ties 1641 cm^{-1} . Taip pat matomas panašumas tarp B ir C spektrų – 1619 cm^{-1} (parodo β klostytą regioną). C ir D spektrai turi tą patį maksimumą 1628 cm^{-1} .



27 pav. FTIR spektrai apdoroti programa „Grams/AI“. A – *de novo* moPrP23-143 fibrilių, suformuotų 0,5 M GuHCl denatūrate spektros, B – moPrP23-230, paveikto moPrP23-143 fibriliniai agregatai, spektros, C – 4 persėjimo moPrP23-230 fibrilinių agregatų spektros, D – *de novo* moPrP23-230 suformuoti fibriliniai agregatai.

MoPrP89-230 FTIR spektruose yra panašumų (**28 pav.**). Tarp spektro A maksimumo ir vieno iš B maksimumų ties 1641 cm^{-1} matomas persiklojimas. B ir C spektrai turi tą patį maksimumą ties 1628 cm^{-1} , o spektro D maksimumas 1627 cm^{-1} nesutampa su kitų spektrų maksimumais.



28 pav. FTIR analizės spektrai apdoroti programa „Grams/AI“. A – *de novo* moPrP23-143 fibrilių, suformuotų 0,5 M GuHCl denatūrate spektras, B – moPrP89-230, paveikto moPrP23-143 fibrilinais agregatais, spektras, C – 4 persėjimo moPrP23-230 fibrilinių agregatų spektras, D – *de novo* moPrP89-230 suformuotų fibrilinių agregatų FTIR spektras.

IŠVADOS

1. Įvesta W144STOP mutacija į moPrP23-230 baltymą koduojantį geną ir gautas moPrP23-143 konstruktas;
2. Gauta moPrP23-143 baltymo raiška *E. coli* ląstelėse;
3. Metalų chelatinės giminingumo chromatografijos metodu iš viso gauta $229,1 \pm 0,01$ mg rekombinantinio moPrP23-143 baltymo;
4. Atlikti moPrP23-143 *de novo* agregacijos bei inicijuotos agregacijos tyrimai skirtinguose buferiniuose tirpaluose parodė, kad baltymas gali sudaryti fibrilinius agregatus esant 0 M ir 0,5 M GuHCl koncentracijoms. Atliktas 0 M GuHCl formuotų fibrilių stabilumo tyrimas. Iš gautų rezultatų buvo pasirinktos optimalios inicijuotos agregacijos sąlygos tolimesniems tyrimams;
5. Inicijuota moPrP23-230, moPrP89-230 agregacija su moPrP23-143 bei išnagrinėti pokyčiai atsiradę šios agregacijos metu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abid K., Soto C. 2006. The intriguing prion disorders, *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(19–20): 2342–2351.
2. Aguzzi A., Calella A.M. 2009. Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases, *Physiological Reviews* 89(4): 1105–1152.
3. Aguzzi A., Polymenidou M. 2004. Mammalian Prion Biology: One Century of Evolving Concepts, *Cell* 116(2): 313–327.
4. Amdursky N., Erez Y., Huppert D. 2012. Molecular rotors: What lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker, *Accounts of Chemical Research* 45(9): 1548–1557.
5. Barria M.A., Gonzalez-Romero D., Soto C. 2012. Cyclic Amplification of Prion Protein Misfolding, *Methods in Molecular Biology* 849(4): 185–198.
6. Barria M.A., Mukherjee A., Gonzalez-Romero D., Morales R., Soto C. 2009. De novo generation of infectious prions in vitro produces a new disease phenotype, *PLoS Pathogens* 5(5).
7. Biancalana M., Koide S. 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1804(7): 1405–1412.
8. Bolognesi B., Kumita J.R., Barros T.P., Esbjorner E.K., Luheshi L.M., Crowther D.C., Wilson M.R., Dobson C.M., Favrin G., Yerbury J.J. 2010. ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species, *ACS Chemical Biology* 5(8): 735–740.
9. Brundin P., Melki R., Kopito R. 2010. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases., *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(4): 301–7.
10. Chiti F., Dobson C.M. 2006. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease, *Annual Review of Biochemistry* 75(1): 333–366.
11. Choi J.-K., Cali I., Surewicz K., Kong Q., Gambetti P., Surewicz W.K. 2016. Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(48): 13851–13856.
12. Cohen F.E., Fletterick R.J., Serban A., Gasset M., Baldwin M., Mehlhorn I., Nguyen J., Huang Z., Pan K.M., Groth D. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(23): 10962–10966.
13. Colacino S., Tiana G., Colombo G. 2006. Similar folds with different stabilization mechanisms: the cases of Prion and Doppel proteins., *BMC structural biology* 6(1): 17.
14. Eghiaian F., Grosclaude J., Lesceu S., Debey P., Doublet B., Treguer E., Rezaei H., Knossow M. 2004. Insight into the PrPC -> PrPSc conversion from the structures of

- antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(28): 10254–10259.
15. Fraser P.E. 2014. Prions and prion-like proteins, *Journal of Biological Chemistry* 289(29): 19839–19840.
 16. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker a, Duvaud S., Wilkins M., Appel R., Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, *The Proteomics Protocols Handbook*: 571–607.
 17. Gillam J.E., MacPhee C.E. 2013. Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth, *Journal of Physics: Condensed Matter* 25(37): 373101.
 18. Groveman B.R., Dolan M.A., Taubner L.M., Kraus A., Wickner R.B., Caughey B. 2014. Parallel in-register intermolecular β -sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids, *Journal of Biological Chemistry* 289(35): 24129–24142.
 19. Hasegawa M., Nonaka T., Masuda-Suzukake M. 2017. Prion-like mechanisms and potential therapeutic targets in neurodegenerative disorders, *Pharmacology & Therapeutics* 172: 22–33.
 20. Helmus J.J., Surewicz K., Surewicz W.K., Jaroniec C.P. 2010. Conformational flexibility of Y145Stop human prion protein amyloid fibrils probed by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy., *J Am Chem Soc* 132(7): 2393–2403.
 21. Hudson S.A., Ecroyd H., Kee T.W., Carver J.A. 2009. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds, *FEBS Journal* 276(20): 5960–5972.
 22. Iljina M., Garcia G.A., Horrocks M.H., Tosatto L., Choi M.L., Ganzinger K.A., Abramov A.Y., Gandhi S., Wood N.W., Cremades N., Dobson C.M., Knowles T.P.J., Klenerman D. 2016. Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(9): E1206–E1215.
 23. Jones E.M., Surewicz W.K. 2005. Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids, *Cell* 121(1): 63–72.
 24. Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., Roy R., Singh S. 2005. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *Journal of Structural Biology* 151(3): 229–238.
 25. Kitamoto, T.; Iizuka, R.; Tateishi J. 1993. An Amber Mutation of Prion Protein in Gerstmann-Straussler Syndrome with Mutant PrP Plaques, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192(2): 525–531.

26. Kundu B., Maiti N.R., Jones E.M., Surewicz K. a, Vanik D.L., Surewicz W.K. 2003. Nucleation-dependent conformational conversion of the Y145Stop variant of human prion protein: Structural clues for prion propagation, *Pnas* 100(21): 12069–12074.
27. Leske H., Hornemann S., Herrmann U.S., Zhu C., Dametto P., Li B., Laferriere F., Polymenidou M., Pelczar P., Reimann R.R., Schwarz P., Rushing E.J., Wüthrich K., Aguzzi A. 2017. Protease resistance of infectious prions is suppressed by removal of a single atom in the cellular prion protein, *Plos One* 12(2): e0170503.
28. LeVine H. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution., *Protein science: a publication of the Protein Society* 2(3): 404–10.
29. Liberski P.P. 2012. *Chapter 10 Gerstmann-Straussler-Scheinker Disease* S. Ahmad, sud.Neurodegenerative Diseases.
30. Liberski P.P., Budka Herbert 2012. Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease, *Folia Neuropathologica*: 128–137.
31. Lindgren M., Sörgjerd K., Hammarström P. 2005. Detection and Characterization of Aggregates, Prefibrillar Amyloidogenic Oligomers, and Protofibrils Using Fluorescence Spectroscopy, *Biophysical Journal* 88(6): 4200–4212.
32. Lloyd S.E., Mead S., Collinge J. 2013. Genetics of prion diseases, *Current Opinion in Genetics and Development* 23(3): 345–351.
33. Lloyd S.E., Simon Mead, John Collinge 2013. Emergence and evolution of meaning, *TripleC* 11(1): 13–35.
34. McKinley M.P., Bolton D.C., Prusiner S.B. 1983. A protease-resistant protein is a structural component of the Scrapie prion, *Cell* 35(1): 57–62.
35. Milto K., Michailova K., Smirnovas V. 2014. Elongation of mouse prion protein amyloid-like fibrils: Effect of temperature and denaturant concentration, *PLoS ONE* 9(4): 1–5.
36. Morales R., Duran-Aniotz C., Diaz-Espinoza R., Camacho M. V, Soto C. 2014. Protein misfolding cyclic amplification of infectious prions, *Prion* 7(7): 1397–1409.
37. Rambaran R.N., Serpell L.C. 2008. Amyloid fibrils, *Prion* 2(3): 112–117.
38. Requena J.R., Wille H. 2014. The structure of the infectious prion protein: experimental data and molecular models., *Prion* 8(1): 60–6.
39. van Rheede T., Smolenaars M.M.W., Madsen O., de Jong W.W. 2003. Molecular Evolution of the Mammalian Prion Protein, *Molecular Biology and Evolution* 20(1): 111–121.
40. Riesner D. 2003. Biochemistry and structure of PrP C and PrP Sc, *British Medical*

- Bulletin* 66(ii): 21–33.
41. Sabate R., Rodriguez-Santiago L., Sodupe M., Saupe S.J., Ventura S. 2013. Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers, *Chemical Communications* 49(51): 5745.
 42. Safar J., Roller P.P., Gajdusek D.C., Gibbs C.J. 1993. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein, *Journal of Biological Chemistry* 268(27): 20276–20284.
 43. Smirnovas V., Baron, Gerald S., Offerdahl D.K., Raymond G.J., Caughey B., Surewicz W.K. 2011. Structural Organization of Brain-Derived Mammalian Prions Examined By Hydrogen Exchange, *Nature Structural & Molecular Biology* 18(4): 504–506.
 44. Soto C. 2011. Prion hypothesis: The end of the controversy?, *Trends in Biochemical Sciences* 36(3): 151–158.
 45. Surewicz W., Mantsch H. 1988. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra, *Biochimica et biophysica acta* 952(2): 115–130. Prieiga per internetą: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=7678532>.
 46. Surewicz W.K., Apostol M.I. 2013. Emergence and evolution of meaning, *TripleC* 11(1): 13–35.
 47. Vanik D.L., Surewicz K. a., Surewicz W.K. 2004. Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions, *Molecular Cell* 14(1): 139–145.
 48. Walker L.C. 2016. Proteopathic Strains and the Heterogeneity of Neurodegenerative Diseases, *Annual Review of Genetics* 50(1): 329–346.
 49. Weissmann C. 2004. The state of the prion, *Nature Reviews Microbiology* 2(11): 861–871.
 50. Westergard L., Christensen H.M., Harris D.A. 2007. The cellular prion protein (PrPC): Its physiological function and role in disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772(6): 629–644.
 51. Yuan J., Zhan Y.-A., Abskharon R., Xiao X., Martinez M.C., Zhou X., Kneale G., Mikol J., Lehmann S., Surewicz W.K., Castilla J., Steyaert J., Zhang S., Kong Q., Petersen R.B., Wohlkonig A., Zou W.-Q. 2013. Recombinant Human Prion Protein Inhibits Prion Propagation in vitro, *Scientific Reports* 3: 1–8.
 52. Zhang Z., Zhang Y., Wang F., Wang X., Xu Y., Yang H., Yu G., Yuan C., Ma J. 2013. De novo generation of infectious prions with bacterially expressed recombinant prion protein, *FASEB Journal* 27(12): 4768–4775.