



VILNIAUS GEDIMINO TECHNINIOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Dovilė Janušaitė

**PELĖNO REKOMBINANTINIO PRP121-231 GAMYBA IR JO  
AGREGACIJOS TYRIMAI  
RECOMBINANT BANK-VOLE PrP121-231 PURIFICATION AND  
ANALYSIS OF AGGREGATION**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2014

# TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS .....	9
ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	12
1.1. Prioniniai baltymai (PrP <sup>c</sup> ).....	12
1.2. Pelėno prioniniai baltymai (BvPrP).....	13
1.3. Patogeniniai prionai (PrP <sup>Sc</sup> ).....	14
1.4. Kamieniai.....	15
1.5. Prionų amiloidų fibrilės .....	17
1.6. Rekombinantinių baltymų gryninimas.....	18
1.7. Giminingumo chromatografija .....	19
1.7.1. Jonų mainų chromatografija.....	20
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	21
2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės.....	21
2.1.1. Naudotos medžiagos ir rinkiniai pagal gamintoją.....	21
2.1.2. Naudota laboratorinė įranga .....	21
2.1.3. Naudoti sorbentai .....	22
2.1.4. Naudoti kamieniai .....	22
2.1.5. Naudoti konstruktai .....	23
2.1.6. Mitybinės terpės .....	23
2.1.7. Tirpalai .....	23
2.1.8. Buferiniai tirpalai naudoti baltymų gryninime.....	25
2.2. Metodai .....	26
2.2.1. Transformacija į kompetentines ląsteles .....	26
2.2.2. Bakterijų auginimas.....	26
2.2.3. Elektroforezės mėginių ruošimas .....	27
2.2.4. Baltymų elektroforezė .....	28
2.2.5. Renatūracija ir gryninimas IMAC metodu.....	28

2.2.6.	Histidino uodegėlės nukirpimas ir jonų mainų chromatografija .....	29
2.2.7.	Koncentravimas .....	30
2.2.8.	Agregacija 37 °C temperatūroje .....	30
2.2.9.	Fibrilių stabilumo tyrimas .....	30
2.2.10.	Agregacija 60 °C temperatūroje .....	32
2.2.11.	Duomenų analizė .....	33
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	34
3.1.	Rekombinantinio BvPrP121-231 raiška .....	34
3.2.	Rekombinantinio BvPrP121-231 gryninimas .....	35
3.3.	Agregacija 37 °C temperatūroje .....	38
3.4.	Fibrilių stabilumas .....	39
3.5.	Agregacija 60° C temperatūroje .....	40
	IŠVADOS .....	43
	LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	44

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AA – akrilamidas;  
APS – amonio persulfatas;  
Aps./min – apsisukimai per minutę;  
BAA – bisakrilamidas;  
BSE – galvijų kempinligė (angl. Bovine Spongiform Encephalopathy);  
BvPrP121-231 – pelėno prioninis baltymas;  
CJD – Creutzfeldto-Jakobso liga (angl. Creutzfeldt-Jakobs Disease);  
CM – karboksimetil;  
GPI – glikozilfosfatidilinozitolis;  
GSS – Gerstmanno-Sträusslerio-Scheinkerio sindromas (angl. Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome);  
GuHCl – guanidino hidrochloridas / guanidino chloridas;  
GuSCN – guanidinio tiocianatas;  
IDA – iminodiacto rūgštis;  
IMAC – giminingumo (afininė) chromatografija naudojant imobilizuotus metalo jonus (angl. Immobilized-Metal Affinity Chromatography);  
IPTG - izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas;  
NDS – natrio dodecilsulfatas;  
NDS–PAAG - natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;  
NTA – nitrilotriacto rūgštis;  
O. V. – optiniai vienetai;  
PB – fosfatinis buferis;  
PrP<sup>C</sup> – natyvus prioninis baltymas;  
PrP<sup>Sc</sup> – prionas;  
ROS – reaktyvaus deguonies dalelės (angl. Reactive Oxygen Species);  
S.O.C. – optimali mitybinė terpė (angl. Super Optimal broth with Catabolite repression);  
SOD – superoksido dismutazė;  
TED – trikarboksimetiletildiaminas;  
TEMED – tetrametiletildiaminas;  
ThT – tioflavinas T;  
TME – užkrečiamos audinių encefalopatijos (angl. Transmissible Mink Encephalopathy);  
TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis.

## ĮVADAS

1956 m. buvo išaiškinta DNR struktūra ir sudėtis bei patvirtinti ankstesni, prieš daugiau kaip dešimtmetį atlikti, tyrimai, kurie rodo, jog deoksiribonukleorūgštis (DNR) ir ribonukleino rūgštis (RNR) yra genetinė medžiaga, kuri yra perduodama iš vienos kartos į kitą, ir joje yra užkoduota informacija būtina visam organizmui sukurti. Tačiau Stanley B. Prusiner atrasti prionai paneigia šį faktą, nes nustatyta, kad šios nežinomos funkcijos baltyminės dalelės gali išsaugoti informaciją apie savo struktūros konformacinius pokyčius ir perduoti ją naujai sintetiniams baltymams ląstelėje, nedalyvaujant DNR ir RNR (Lewin, 2002; Aguzzi, 2009).

Nustatyta, kad priono baltymai egzistuoja skirtingų formų: normali ląstelinė izoforma - PrP<sup>c</sup> (angl. cellular) arba PrP<sup>Scn</sup> – jautrus (angl. sensitive) proteazėms ir infekcinė izoforma, kurios konformacija yra pakitusi, vadinama PrP<sup>Sc</sup> (angl. scrapie) arba PrP<sup>Res</sup> – atsparus (angl. resistant) proteazėms (Prusiner, 2001). Normalią priono baltymo formą koduoja pradinis genas *Prnp*, dėl kurio mutacijų atsiranda įvairius sutrikimus sukeltantys infekciniai prionai. Tokie baltymų agregatai, patekę į organizmą, pakeičia jame esančių natyvių prioninių baltymų struktūrą, paversdami juos lygiai tokiais pačiais prionais. Skirtingų struktūrų prionų agregatai, dar vadinami prionų „kamienais“, sukelia įvairias prionines ligas, vadinamas kempinligėmis, kurios sąlygoja žmogaus ar gyvūnų galvos smegenų ir centrinės nervų sistemos sutrikimus. Patekę į organizmą ir nukeliaavę iki galvos smegenų, prionai gali ilgus metus kauptis, kol galiausiai, susidarius dideliame jų kiekiui, sukelia mirtį (Aguzzi, 2009; Soto, 2011).

Tam, kad būtų galima tyrinėti prionus biofizikiniais metodais, visų pirma reikia turėti pakankamą natyvių prioninių baltymų kiekį. Kadangi tyrimams šie baltymai nėra dažnai naudojami, tai jų pasiūla maža, o kaina didelė. Todėl šiuos baltymus galima gamintis patiems ir vėliau su jais atlikti norimus eksperimentus.

Taigi, šio darbo tikslas yra gauti pelėno rekombinantinį prioninį baltymą BvPrP121-231 ir atlikti jo agregacijos tyrimus. Tad keliami tokie uždaviniai:

1. Atlikti plazmidės, koduojančios BvPrP121-231 geną, transformaciją į *E. coli* BL21 Star (DE3) kompetentines ląsteles.
2. Auginti kompetentines ląsteles skirtinguose terpėse: LB-terpėje, pridendant IPTG, kuris indikuoja tikslinio baltymo raišką, ir naudojant auto-induktyvią terpę.
3. Iš gautos biomasės renatūruoti baltymą iš intarpinių kūnelių ir gryninti afininės chromatografijos metodu.

4. Panaudojus trombino proteazės pagalba nukirpti histidininę uodegą ir galutinai išgryninti baltymą jonų mainų chromatografijos metodu.
5. Naudojantis fluorescenciniu spektrofotometru atlikti pelėno prioninio baltymo agregacijos tyrimus.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Prioniniai baltymai (PrP<sup>C</sup>)

Nors prioninių baltymų funkcija dar nėra tiksliai žinoma, tačiau išsiaiškinta, kad šiuos prioninius baltymus koduoja daugelio gyvūnų genomo chromosomose aptinkamas genas *prnp* ir atitinkama iRNR, kuri aptinkama smegenyse (Agguzi, 2004; Lysek, 2004). Prioninius baltymus smegenyse ar limfocituose ir limfinių organų stromos ląstelėse turi visos aukštesniosios rūšys : žuvis, ropliai, paukščiai, žinduoliai, tarp kurių ir žmonės. Nustatyta, kad skirtingų žinduolių rūšių prioninių baltymų molekulinė struktūra yra labai panaši: N-galo prioninio baltymo domenai yra sulankstyti netvarkingai, o C-galas yra labai struktūrizuotas, sudarytas iš trijų  $\alpha$ -spiralių ir dviejų trumpų  $\beta$ -juostų (Kretzshmar, 2013). Ląstelinė prioninio baltymo izoforma yra sintetinama, sulankstoma ir glikozilinama endoplazminiame tinkle, o po to transportuojama į ląstelės paviršių – plazminę membraną. Transportavimo metu vyksta baltymo brendimas, kurio metu atjungiamas N galo signalinė polipeptido seka, prie dviejų aminorūgščių likučių prijungiamos oligosacharido grandinės, atjungiamas polipeptido C galo seka ir prie C galinio sutrumpinto peptido prijungiamas glikozilfosfatidilinozitolis (GPI), kuris ir laiko priono baltymą ląstelės membranos paviršiuje (Aguzzi, 2009).

Fiziologinė prioninių baltymų funkcija vis dar nėra išsiaiškinta, tačiau yra kelios hipotezės, kurios aiškina galimas šių baltymų funkcijas. Atlikta daug eksperimentų, kurie parodė, jog baltymo N-gale esančios histidino liekanos prisijungia  $\text{Cu}^{2+}$  jonus, tačiau aiškaus atsakymo, kokią įtaką vario prijungimas daro prioninių baltymų funkcijai, nėra (Lehmann, 2002; Kretzshmar, 2013). Varies yra esminis kofaktorius daugeliui fermentų, vykstant redukcijos reakcijoms. Yra faktų, rodančių, kad prioniniai baltymai yra varį prijungiančios dalelės, o vario prisijungimas gali iššaukti konformacinius pokyčius prioninio baltymo lanksčioje N-galo srityje, taip pat biocheminius ir biologinius ląstelių pakitimus. Ląstelėse įvykus šiems biocheminiams ir biologiniams pokyčiams gali išsivystyti daug ligų, įskaitant ir keletą neurodegeneracinių sutrikimų (Westergard, 2007).

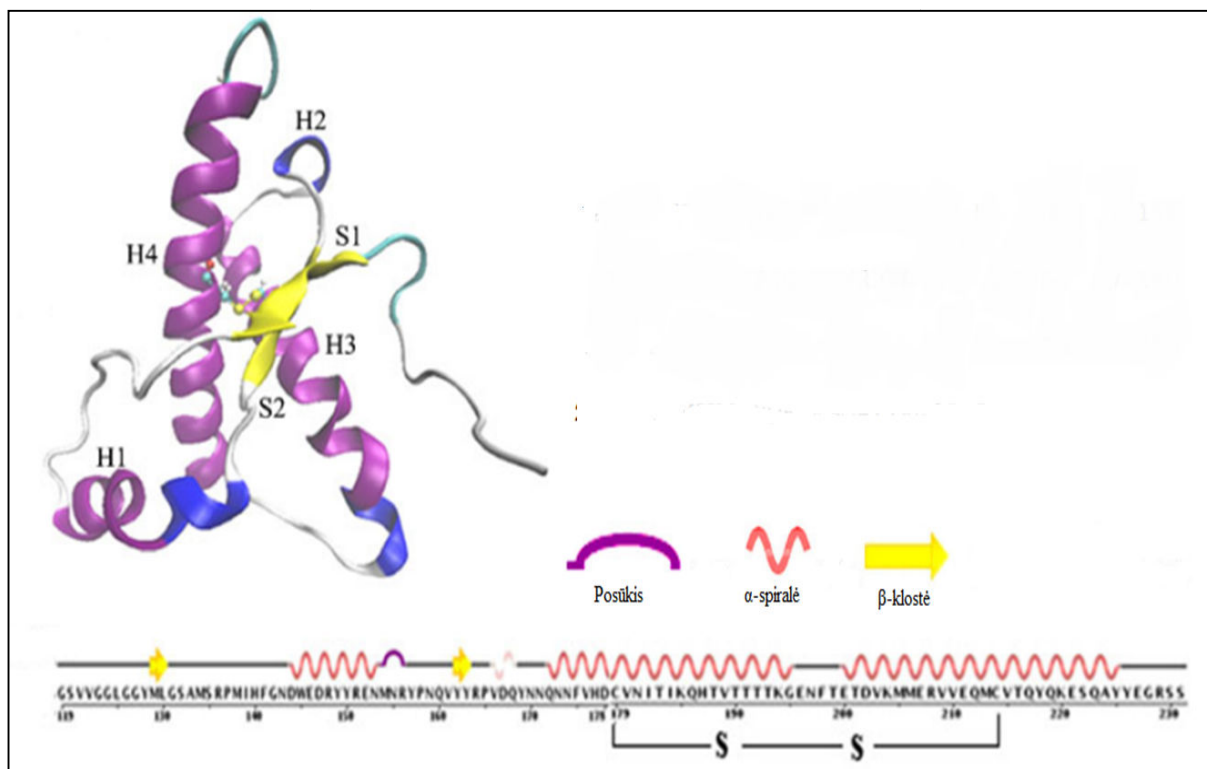
Gali būti, jog prioniniai PrP<sup>C</sup> baltymai apsaugo ląsteles nuo oksidacinio streso, detoksikuodami reaktyvaus deguonies daleles (ROS). Buvo pasiūlyta, kad rekombinantiniai ir išskirti iš smegenų audinio prioniniai baltymai turi superoksido dismutazės (SOD) aktyvumą. Taip pa, yra hipotezė, jog prioniniai baltymai apsaugo ląsteles nuo oksidacinio streso netiesiogiai, reguliuodami kitų baltymų, tokių kaip Cu – Zn SOD (detoksikuojančių ROS), aktyvumą. Nors dėl prioninių baltymų savybės prijungti vario jonus vis dar lieka neatsakytų klausimų, tačiau

eksperimentiškai įrodyta, kad vario jonų prijungimas gali veikti kaip reguliatorius keičiantis PrP<sup>C</sup> fiziologinį aktyvumą (Westergard, 2007).

Dar viena hipotezė, aiškinanti galimą prioninių baltymų funkciją, yra tai, jog jie gali dalyvauti transmembraninio signalo perdavimo procese. Kaip ir kiti GPI prijungti baltymai, prioniniai baltymai yra plazminės membranos lipidiniuose plaustuose, ten kur vyksta signalo perdavimas. (Westergard, 2007).

## 1.2. Pelėno prioniniai baltymai (BvPrP)

Šiame darbe išsamiau tyrinėjamas rekombinantinis prioninis pelėno baltymas (BvPrP121-231), kurio struktūra pavaizduota 1 paveiksle. Ši struktūra labai panaši į kitas prioninių baltymų struktūras. Visi šie baltymai sudaryti iš trijų  $\alpha$ -spiralių (H1, H3, H4) ir dviejų  $\beta$ -juostų (S1, S2). Taip pat disulfidinis tiltelis formuojasi tarp H3 ir H4  $\alpha$ -spiralių (Chen *et al.*, 2013).



**1 pav.** A – prioninio baltymo BvPrP121-231 erdvinė struktūra; B – prioninio baltymo BvPrP121-231 aminorūgščių seka (Chen *et al.*, 2013).



Pelėnai sudomino mokslininkus dėl neįprastų savybių, susijusių su prionais ir jų sukeliomomis ligomis. Užkrėtus pelėnus iš elnių ir briedžių išskirtais prionais, jų sukeliamų ligų inkubacinis laikotarpis yra 25-28 dienos, kai tuo metu užkrėtus kitus gyvūnus inkubacinis laikotarpis svyruoja nuo 156 iki 281 dienų. BvPrP prionų neuropatologinės ir molekulinės charakteristikos tyrimai atskleidė, jog visi klasikiniai žinduolių prioninių ligų požymiai pelėnams pasireiškė mažiau nei per mėnesį po patogeninių prionų suleidimo. Nors patogeninių prionų suleidžiamas itin mažas kiekis, tačiau užtenka itin trumpo laiko inicijuoti PrP<sup>C</sup> virsmą į PrP<sup>Sc</sup> (Christen *et al.*, 2008).

Atlikus tyrimus su pelių, Sirijos žiurkėnų ir pelėnų prionais, nustatyta, kad pelėno prionai smarkiai skiriasi nuo kitų tirtų graužikų prionų (Christen *et al.*, 2008). Buvo atlikti eksperimentai, kurie parodė, jog pelėnai yra labai jautrūs avių skrapi ligai, tačiau yra atsparūs galvijų kempinligei, tuo metu pelės atvirkščiai (Agrimi, 2008). Gali būti, kad tokias pelėno priono savybes lemia šiek tiek kitokia aminorūgščių struktūra, nei kitų minėtų graužikų, tačiau keista, kad pelėno ir pelės aminorūgščių seka skiriasi tik keturiomis aminorūgštimis (Christen *et al.*, 2008).

### 1.3. Patogeniniai prionai (PrP<sup>Sc</sup>)

Normali ląstelinė izoforma PrP<sup>C</sup> gali pakeisti konformaciją ir pavirsti infekcine izoforma, PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 2001). Nustatyta, kad PrP<sup>C</sup> ir PrP<sup>Sc</sup> polipeptidinės grandinės, sudarytos iš identiško aminorūgščių sąstato, skiriasi tik erdvine struktūra, t. y. konformacijomis. Priešingai nei PrP<sup>C</sup> izoforma, kuri turi didelį  $\alpha$ -spiralių kiekį ir nežymų  $\beta$ -klosčių kiekį, patogeniniai prionai PrP<sup>Sc</sup> turi daugiau  $\beta$ -klosčių nei  $\alpha$ -spiralių (Prusiner, 2001; Soto, 2011). Manoma, kad tokį prioninio baltymo virsmą patogeniniu lemia prioninius baltymus koduojančio *prnp* geno mutacijos, kurios pakeičia natyvaus PrP<sup>C</sup> baltymo konformaciją ir taip gaunamas PrP<sup>Sc</sup> prionas. Tikslus šio proceso mechanizmas dar neaiškus. Prionai taip pat apibūdinami, kaip savarankiškai besidauginančios dalelės, kurios yra fibrilių arba amiloido formos (Cobb *et al.*, 2014). Žinant, kad šios baltyminės dalėlės neturi lipidų, karbohidratų ir genetinės informacijos perdavimui reikalingų nukleorūgščių, belieka išvada, kad baltymai gali būti infektyvūs (Prusiner, 1998).

Nors tiksliai natyvių prioninių baltymų funkcija nėra žinoma, tačiau išsiaiškinta, kad patogeniniai prionai yra neurodegeneracinių sutrikimų priežastis. Šios prioninės ligos vadinamos spongiforminėmis encelopatijomis arba tiesiog kempinligėmis. Tai mirtini neurodegeneraciniai susirgimai, kurių atsiradimas siejamas su neįprastų baltymų struktūrų, vadinamų amiloidinėmis fibrilėmis, susikaupimu smegenyse. Anksčiau manyta, kad šiuos centrinės nervų sistemos pakitimus lemia virusai ar mikroorganizmai, tačiau Stanley Prusiner nustatė, kad daugelio neurodegeneracinių

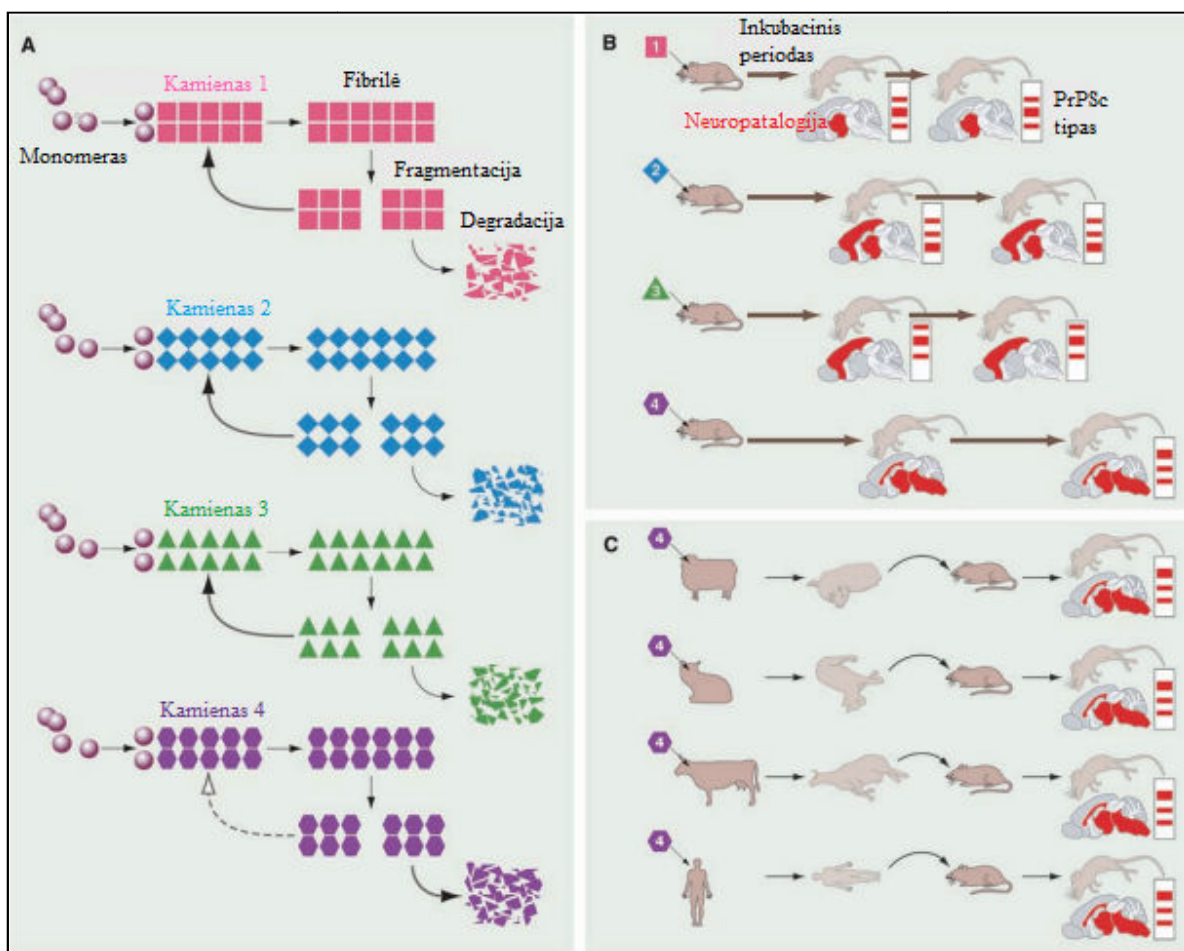
sutrikimų – ožkų ir avių skrapai, kuru, galvijų kempinligės (BSE), Creutzfeldto-Jakobso ligos (CJD), Gerstmanno-Sträusslerio-Scheinkerio sindromo (GSS), lėtinės išsekimo ligos elniams ir briedžiams bei užkrečiamos audinių encefalopatijos (TME) – atsiradimo priežastis yra netaisyklingos struktūros prioniniai baltymai ir jų fibrilių kaupimasis neuronuose. Manoma, kad prioninės ligos gali atsirasti spontaniškai, dėl geno koduojančio PrP<sup>C</sup> mutacijos, ar dėl infekcijos. (Prusiner, 1998; Cobb *et al.*, 2007; Surewicz, 2011). Nežiūrint to, kad žmogaus prioninės ligos yra palyginti retos, dėl jų infekcinių savybių kartais pasireiškia ligų protrūčiai bei epidemijos pvz. prieš 60 metų buvo kuru ligos protrūkis Papua Naujojoje Gvinėjoje, vėliau užregistruoti 250 CJD ligos atvejai, 1984 m. buvo užregistruota daug BSE susirgimų (Aguzzi, 2004) . Šios ligos gali būti perduodamos nuo vienos rūšies į kitas per kraują ar su maistu. Prioninė infekcija siejama su ilgu besimptomiu inkubaciniu laikotarpiu, kuris žmogui gali viršyti 50 metų (Prusiner, 1998; Cobb *et al.*, 2007; Surewicz, 2011). Šis inkubacinis laikotarpis yra skirtingas kiekvienam prionų kamienui ir priklauso nuo kelių faktorių: patekusio priono tipo bei kiekio, inukoliacijos vietos, šeimininko PrP<sup>C</sup> sekos bei prionų raiškos lygio (Colby *et al.*, 2009).

Kaip jau minėta, prionų sukeltos ligos yra unikalios tuo, kad jos atsiranda dėl besikaupiančių prionų ar jų fibrilių. Tai reiškia, kad visų kitų žinomų infekcijų sukėlėjai skiriasi nuo prioninių susirgimų sukėlėjų kelias aspektais. Pirmasis skirtumas – yra manoma, kad prionai neturi genomo, koduojančio informaciją, reikalingą prionų dauginimuisi. Antrasis skirtumas – prionas sudarytas tik iš glikoproteino, kuris GPI inkaru prijungtas prie membranos. Trečiasis, pats neįprasčiausias aspektas, tai ląstelinio prioninio baltymo konformacinis virsmas į patogeninę izoformą, kuri yra netirpi, atspari proteazėms, jonizuojančios bei UV spinduliuotėms. Taip pat prionines ligas sukeliančių dalelių molekulinė masė per maža, kad galėtų būti virusais ar kito tipo mikroorganizmais (Lysek, 2004; Aguzzi, 2009; Soto, 2011). Tiksliai ketvirtinė PrP<sup>Sc</sup> struktūra dar nėra tiksliai žinoma, todėl prionų struktūriniai modeliai sudaromi, atsižvelgiant į biochemines ir biofizines skirtingų kamienų savybes (Kretzshmar, 2013; Chen *et al.*, 2013).

## 1.4. Kamienai

Nors šiuo metu hipotezė apie prionų sukeltus susirgimus yra vertinama teigiamai, tačiau yra vienas faktas, kuris neleidžia iki galo patikėti šia hipoteze – tai prionų kamienai. Jie yra apibūdinami, kaip infekciniai agentai, kurie patekę į vienodus organizmus gali sukelti skirtingus prioninių ligų fenotipus (Aguzzi, 2009). Nustatyta, kad beveik visos užkrečiamos spongiforminės encefalopatijos gali turėti skirtingus prionų kamienus, kurie nulemia skirtingus ligos inkubacinius

laikotarpius, skirtingas agregatų išsidėstymo vietas, histologinius pažeidimus, specifines neuronines taikinio sritis, klinikinius ir neuropatologinius bruožus (2 pav.). Mutacijos ir polimorfizmai sukelia nukleorūgščių pakitimus genome. Buvo manoma, kad dėl šių pakitimų viena polipeptidinė grandinė gali koduoti skirtingus ligos fenotipus (Collinge, 2007). Tačiau David Colby komanda paneigė versiją, kad skirtingi kamienai atsiranda, dėl mutacijos ar polimorfizmo t. y. yra skirtingų aminorūgščių prioninio baltymo sekoje. Jie teigia, kad skirtingi kamienai atsiranda dėl nevienodų PrP<sup>Sc</sup> konformacijų ir po kitimo proceso susidariusių amiloidinių fibrilių stabilumo (Colby *et al.*, 2009). Manoma, kad kamienai susidaro, kuomet prie jau egzistuojančio polimero šablono jungiasi monomerai, tada gauta fibrilė suskyla į daugiau šablonų ir taip atsiranda vis daugiau galimybių susidaryti naujiems kamienams. Gauti skirtingi polimerų tipai gali skirtingai propaguoti ir sudaryti nevienodus kamienus (Collinge, 2007).



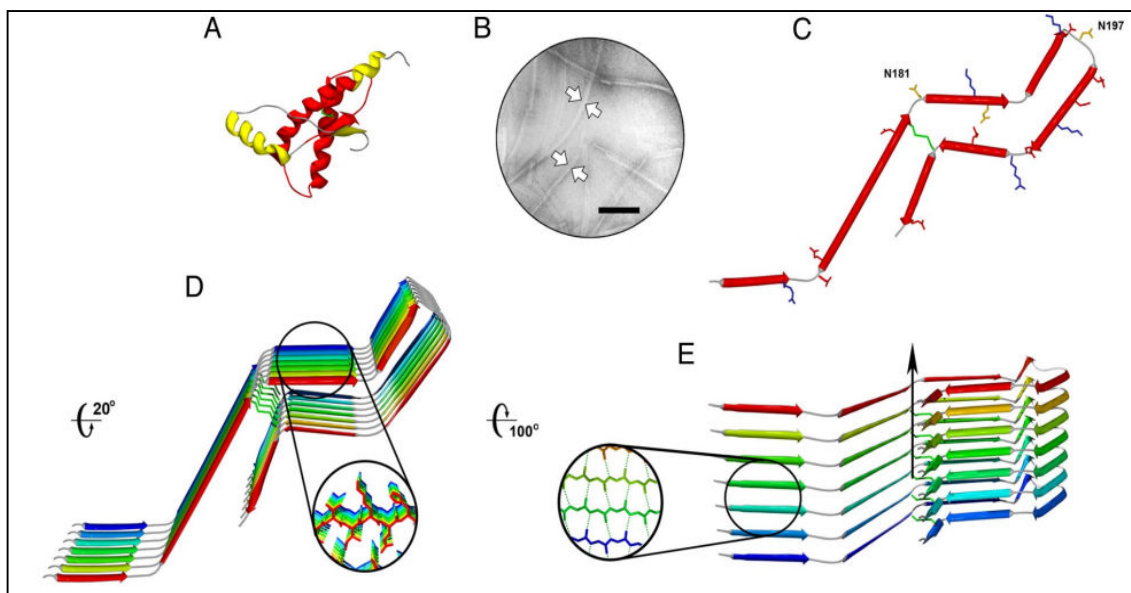
**2 pav.** A – kamienų formavimasis; B – raudonos juostelės rodo inkubacinio laikotarpio skirtumus ir kaupimosi smegenyse vietą skirtinguose prionų kamienuose; C – kamieno savybių išlaikymas skirtinguose gyvūnuose (Collinge, 2007).

Manoma, kad prionai gali įveikti tarprūšinį barjerą ne tik dėl PrP<sup>Sc</sup> konformacijų pakitimo, bet ir dėl to, kad žinduolių PrP genai skirtinguose organizmuose yra labai panašūs, o PrP – labai panašios struktūros. Tai turbūt svarbiausia prionų gebėjimui prasiskverbti ir užkrėsti kitų rūšių žinduolius (Colby *et al.*, 2009).

Prionų kamienai yra apibūdinami pagal šias skirtingas tarpusavio savybes: antrinė struktūra, atsparumas proteinazėms, konformacinis stabilumas, antikūnų atpažinimas, glikozilinimo profilis (Cobb *et al.*, 2014). Pastebėta, kad kamienai turi tris galimas glikozilinimo formas: neglikozilintą, monoglikozilintą, diglikozilintą. Skirtingiems kamienams gali būti būdinga tik tam tikra forma ir nuo glikozilinimo formos gali priklausyti prionų kamienų stabilumas (Collinge, 2007).

### 1.5. Prionų amiloidų fibrilės

Manoma, kad beveik visi baltymai ir peptidai gali agreguotis į skirtingas struktūras, nuo pilnai netvarkingų amorfinių agregatų iki labai tvarkingų kristalinių formų (Chiti, 2006). Amiloidai turi tvarkingą struktūrą arba bent jau dalį jos, kuri nėra kristalinė, ir yra suformuoti iš maždaug 10 nm diametro fibrilių, kurios gali būti iki kelių šimtų μm ilgio. Dėl šių bruožų jie dar yra vadinami amiloidinėmis fibrilėmis (Alies *et al.*, 2013). Visoms amiloidų fibrilėms yra būdingas vienodas susilankstymas, (3 pav.) kuomet β-gijos suformuoja β-lakštus, kurie yra statmeni fibrilių ašiai, o vandenilinis ryšys tarp β-gijų yra lygiagretus fibrilių ašiai (Moore, 2009).



**3 pav.** A – žmogaus prioninio baltymo erdvinė struktūra; B- elektroniniu mikroskopu užfiksuotos priono fibrilės; C- priono fibrilės modelis; D – beveik plokščių PrP monomerų motyvo modelis, kur

šoninės grandinės tankiai išsidėsčiusios; E – pasukta priono fibrilės struktūra, rodanti tarpmolekulinį vandenilį ryšį, kur strėlytė rodo ilgąją fibrilės ašį (Cobb *et al.*, 2007).

Nustatyta, kad prioniniai baltymai ne išimtis – jie taip pat agreguoja ir sudaro amiloidinių fibrilių struktūras. Amiloidų fibrilių formavimasis – tai procesas, kai natyvūs, tirpūs baltymai netaisyklingai susilanksto į netirpias fibriles, sudarydami  $\beta$ -klostes (Lee *et al.*, 2007). Prionų replikacija prasideda, kai patogeninis PrP<sup>Sc</sup> sąveikauja su šeimininko PrP<sup>C</sup> ir taip prasideda natyvaus baltymo formos transformacija į patogeninį. Preliminarus virsmo mechanizmas yra toks: PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup>, nors ir jis nėra iki galo aiškus, tačiau šiuolaikiniai duomenys teigia, kad virsmas vyksta pagal sėklinės polimerizacijos arba branduolių susidarymo modelį, kurio metu prie PrP<sup>Sc</sup> oligomero (branduolio), dar vadinamo sėkla, prijungiamas PrP<sup>C</sup> ir polimeras toliau auga. Tam tikru laiko momentu PrP<sup>Sc</sup> polimeras skyla į mažesnes daleles. Ši fragmentacija padidina efektyvių branduolių skaičių, kurie gali toliau vykdyti PrP<sup>C</sup> virsmą (Soto, 2011). Pagal šį „Protein-only“ modelį yra suformuojamos amiloidinės priono fibrilės, kurių stabilumas yra siejamas su Van der Valso sąveika ir elektrostatiniais krūviais erdvinėje užtrauktuko sąsajoje (Cobb *et al.*, 2014). Ir kaip jau minėta – nevienodas amiloidų fibrilių stabilumas gali daryti įtaką skirtingų prionų kamienų formavimuisi.

## 1.6. Rekombinantinių baltymų gryninimas

Šiuo metu naudojant genų inžinerijos pagalbą yra sukurta nemažai bakterijų ir mielių kamienų, kurie gali pagaminti įvairius žinduolių baltymus. Šie baltymai gali būti gaminami farmacijos tikslais, tai tokie produktai, kaip žmogaus insulinas, žmogaus augimo hormonas, įvairūs interferonai, vakcinos. Taip pat jie gali būti gaminami ir eksperimentams, vieni iš tokių baltymų yra žinduolių prionai, šiuo atveju ir pelėno prioninis baltymas (Palomares, 2004).

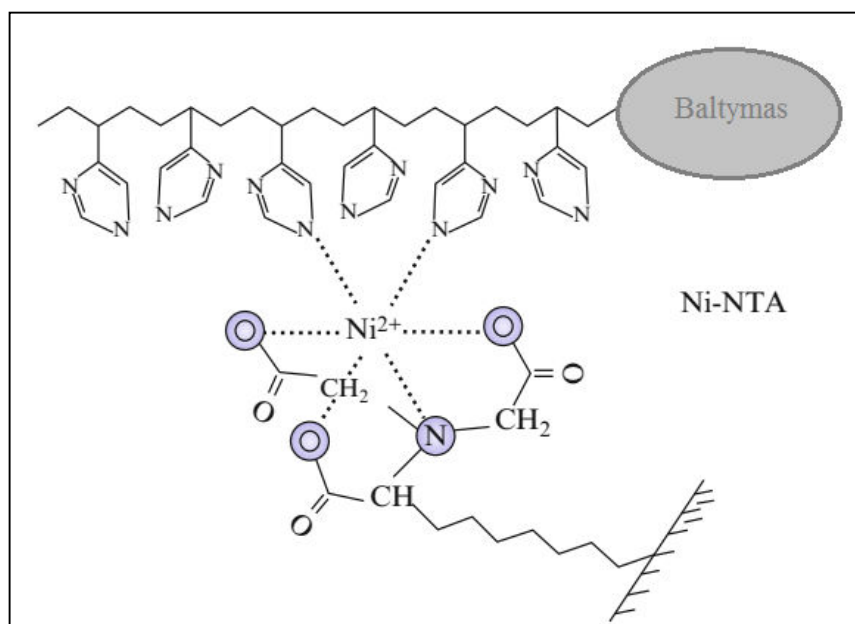
Norint išgryninti rekombinantinius prioninius baltymus baltymų ekspresijai dažniausiai naudojamos gerai žinomos *Escherichia coli* bakterijos. Tačiau ekspresuojant *E. coli* rekombinantinis baltymas dažniausiai yra sulankstomas netinkamai ir susidaro netirpūs agregatai, vadinami tarpiniais kūneliais (Baneyx, 1999). Taigi norint turėti gryną, tinkamai susilanksčią (natyvų) baltymą yra būtina atlikti rekombinantinio baltymo renaturaciją.

Kadangi baltymai yra kaupiami tarpinių kūnelių pavidale ląstelės citoplazmoje, pirmiausia reikia suardyti bakterijas; tam biomasė yra sumaišoma su denatūruojančiu buferiu ir homogenizuojama (Lilie, 1998). Reikia, kad tarpiniai kūneliai būtų ištirpinti; tam naudojami didelės koncentracijos denatūrantai: 5-8 M guanidino chloridas arba 6-8 M urėjos tirpalai. Šie

tirpalai padeda suardyti antrinę struktūrą, o disulfidinių tiltelių suardymui stabdyti naudojamas stiprus antioksidantas glutationas (Fischer, 1993). Denatūruoto baltymo renatūracija vykdoma mažinant naudojamo denatūrantų ir glutationo koncentraciją (Middelberg, 2002).

### 1.7. Giminingumo chromatografija

Jeigu baltymo konstruktas turi histidininę uodegą, jis yra gryninamas, pasitelkiant giminingumo (afininės) chromatografijos metodą. Šis skysčių chromatografijos metodas pagrįstas biospecifine grįžtama sąveika tarp biologiškai aktyvių arba erdviškai unikalių molekulių su kitomis komplementariomis molekulėmis (Sasnauskienė, 2008). Naudojama imobilizuotų metalo jonų afininė chromatografija (IMAC) yra giminingumo chromatografijos metodas, paremtas pereinamųjų metalų jonų ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) giminingumu histidinui ir cisteinui vandeniniuose tirpaluose. Prie rekombinatinio baltymo esančios histidino uodegėlės koordinaciniu ryšiu jungiasi su metalų jonais ir sudaro patvarų kompleksą su ligandais (4 pav.). Kaip chelatuojantys ligandai, tinkantys agarozės ir metalo surišimui, gali būti naudojama iminodiacto rūgštis (IDA), nitrilotriacto rūgštis (NTA) arba trikarboksimetilendiaminas (TED). Šio darbo metu naudojamas NTA sorbentas, kuris yra labai dažnai sutinkamas afininėje chromatografijoje (Block *et al.*, 2009).



**4 pav.** Baltymo histidininės uodegos sąveika su  $Ni^{2+}$  jonu, kuris yra prijungtas prie NTA chelatuojančio ligando (pritaikyta iš Block, 2009).

Denatūruotas baltymas yra adsorbuojamas ant vieno iš šių sorbentų, tada kolonėlėje renatūruojamas mažinant denatūrantą koncentraciją ir galiausiai desorbuojamas imidazolo tirpalu (Lilie, 1998). Atlikus baltymų gryninimą IMAC metodu, reikia iš gauto baltymo tirpalo pašalinti nereikalingas druskas. Tai atliekama naudojant mažos druskų koncentracijos dializės buferį. Dializės žarnelė praleidžia tik atitinkamo dydžio molekules, o greitis priklauso nuo difuzijos, todėl buferinis tirpalas dializės metu nuolat maišomas. Dializuojant tirpalus galima sumažinti druskos koncentraciją tirpale, gauti kitos sudėties baltymo tirpalą, taip pat iš dializuojamo tirpalo pašalinti detergentus, polisacharidus (Bagdonienė ir kt., 2001).

### **1.7.1. Jonų mainų chromatografija**

Jonų mainų chromatografijos metodas yra pagrįstas sąveika tarp priešingus krūvius turinčių molekulių. Baltymai turi jonogenines funkcines grupes, kurios vandeniniuose tirpaluose gali jonizuotis, t. y. įgyti teigiamą arba neigiamą krūvį. Baltymo sąveika su jonitais priklauso nuo teigiamų ir neigiamų krūvių skaičiaus, konkretaus baltymo jonogeninių grupių disociacijos konstanta priklausys nuo baltymo erdvinės struktūros, jonogeninių grupių apsupties (Sasnauskienė, 2008). Jonų mainų chromatografijai naudojama stacionarioji fazė – sorbentas – taip pat turi jonogeninių grupių: katijonitai geba prisijungti katijonus, o anijonitai prisijungia anijonus. Šio darbo metu naudota CM-sefarozė – silpnas katijonitas, kurio neigiamąjį krūvį turinčios funkcinės grupės sąveikauja su chromatografuojamų medžiagų katijoninėmis grupėmis. Šie nešikliai dar vadinami rūgštiniais jonų mainų nešikliais, nes jų neigiamas krūvis priklauso nuo rūgštinių funkcinių grupių jonizacijos (Sasnauskienė, 2008).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės

#### 2.1.1. Naudotos medžiagos ir rinkiniai pagal gamintoją

- AB Vilniaus degtinė: etanolis 96 %.
- Acros Organics: acto rūštis 99,5 %; glicerolis 99 %; druskos rūgštis 37 %; natrio šarmas 50 %.
- AppliChem: glicinas 99,5 %; natrio dodecilsulfatas 85 %; TRIS 99,9 %.
- Bio–Rad: amonio persulfatas.
- Carl Roth: agaras, akrilamidas 98 %; ampicilinas natrio druskos pavidale; 99 %; dikalio hidrofosfatas 99 %; guanidino hidrokloridas (>99,7 %); kalio chloridas, 98 %; kalio dihidrofosfatas 99 %; LB-Medium mitybinė terpė; peptonas.
- Fisher Scientific: baltymų molekulinės masės markeriai (BPE36036-1, EZ-RUN REC. PROT. L.); dinatrio hidrofosfatas; Kumasi R-250 (Coomassie Brilliant Blue 250R); glutationas; izopropiltio-β-galaktozidas; gliukozė; guanidino tiocianatas 99 %; imidazolas 99 %; kazeino hidrolizatas; karbamidas 99,5 %; laktozė; magnio sulfatas; mielių ekstraktas, natrio fosfatai; natrio sulfatas, trombinas; TRIS 99,8 %; TEMED.
- Fluka: baltymų hidrolizatas; guanidino chloridas 98 %.
- Invitrogen: D-gliukozė.
- MERCK: natrio chloridas.
- PEAXIM: amonio chloridas; glicerolis; gliukozė, natrio hidrofosfatas; trichloracto rūgštis.
- Sigma: Thioflavin T (ThT).

#### 2.1.2. Naudota laboratorinė įranga

- Autoklavas: Steam Sterilizer „Trade Raypa“.
- Centrifūgos: „Beckmann J2-21M“ (JA 20 rotorius); „Hettich Zentrifugen Rotina 38R“; „SIGMA 6-16K“ (12500 rotorius); „Eppendorf 5424“ (F-45-18-11-Kit rotorius); „HiCen SR“ (HeroLab) (AF 6.500, AF 8.50.2 rotoriai).
- Chromatografinė kolonėlė: „GE Healthcare XK 26/20“.
- Chromatografinės sistema: „ÄKTA explorer“; „ÄKTApurifier“ (GE Healthcare).



- Elektroforezės sistema: „Minigel-Twin“ (Biometra), sudaryta iš „BioRad Mini Protean 3“ elektroforezės aparato ir „CONSORT EV 243“ srovės šaltinio.
- Fluorescencinis spektrofotometras: „Variant“ Fluorescence Spectrophotometer Cary Eclipse; Synergy™ H4 with Hybrid Technology“.
- Kaitinimo plytelė: „ИСКOPKA“.
- Kiuvetė: „Helema Analytics“ High-Precision Cells CXA-145-330Q.
- Koncentratoriai: „Amicon® Ultra–15“ (pralaidumas - 10 kDa).
- Laikmatis: „Carl Roth“.
- Magnetinės maišyklės: „VARIOMAG Maxi Direct“, „BIOSAN MSH-300“; „Velp Scientifica ARE“; „IKA C-MAG HS7“; „IKA LABORTECHNIK RCT basic“.
- Maišyklė: „CLASSIC vortex mixer“ (VELP Scientifica).
- pH-metras: „Orion DUAL STAR meter“ (Thermo Scientific).
- Purtyklė: „IKA KS 4000i control“.
- Rankinis homogenizatorius: „Potter-Elvehjem“ (Sigma-Aldrich).
- Spektrofotometras: „Shimadzu UV-1800“.
- Svarstyklės : „KERN ABJ“; „KERN PCB 400-2“; „KERN PLJ 6000-1GM“.
- Termostatas: „Fisher Scientific“.
- Termostatinė vonelė: „Fisherbrand mini dry bath“.
- Ultragarso šaltinis: „Bandelin Sonopuls 3100“ (antgaliai: VS70T, MS72).
- Vakuuminė filtravimo sistema: „Sigma-Aldrich“.

### 2.1.3. Naudoti sorbentai

*GE Healthcare*: „Ni Sepharose™ 6 Fast Flow“; „Chelating Sepharose Fast Flow“; „CM Sepharose Fast Flow“.

### 2.1.4. Naudoti kamienai

Baltymų raiškai naudotas kamienas *E. coli* BL21 Star™(DE3), kuris turi tokias genetines charakteristikas: *F– ompT hsdSB (rB–mB–) gal dcm rne131*(DE3). Kamienas pirktas iš *Invitrogen*.

### 2.1.5. Naudoti konstruktai

pRSETA plazmidė su N-galo histidinine uodega, atsparumo ampicilinui genu ir įklonuotu BvPrP121-231 prioniniu genu. Plazmidės sukonstruotos „Neuropatologijos institute“, Zūriche, Šveicarijoje prof. (Simone Hornemann grupėje).

### 2.1.6. Mitybinės terpės

**Agarizuota LB (Broth) terpė:** 10 g NaCl, 10 g peptono, 5 g mielių ekstrakto ir 15 g agaro ištirpinama 1 L dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.

**Auto-induktyvi mitybinė terpė ZYM-5052:** 1 % N-Z-amino (kazeino hidrolizato arba triptono), 0,5 % mielių ekstrakto, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 % glicerolio, 0,05 % dekstrozės (D-gliukozės), 0,2 % laktozės, 100 mg/L ampicilino, 25 mg/L chloramfenikolio. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje, bet dekstrozė, glicerolis, laktozė autoklavuojami atskirai nuo kitų reagentų.

**LB baltymų hidrolizatas (Luria Broth) mitybinė terpė:** 10 g NaCl, 10 g baltymų hidrolizato, 5 g mielių ekstrakto ištirpinama 1 L dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.

**S.O.C. mitybinė terpė:** 2 g peptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM gliukozės. Peptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami 97 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje. Ataušinus iki kambario temperatūros, pridedama Mg druskų ir gliukozės ir steriliai nufiltruojama.

### 2.1.7. Tirpalai

**0,05 M PB pH 6:** 0,61 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ir 0,16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> yra ištirpinama 100 mL dejonizuoto vandens.

**0,1 M HCl:** 0,83 mL 37 % HCl tirpalo (ρ = 1,18) praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

**0,1 M NaOH:** 0,53 mL 50 % NaOH tirpalo (ρ = 1,50) praskiedžiami dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

**0,5 M HCl:** 4,15 mL 37 % HCl tirpalo (ρ = 1,18) praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

**0,5 M TRIS, pH 6,8:** 7,88 g TRIS–HCl tirpinama 60 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 1 M NaOH tirpalu iki 6,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

**1 M CH<sub>3</sub>COOH:** 6,4 mL 99,5 % acto rūgšties ( $\rho = 1,048$ ) praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

**1 M CH<sub>3</sub>COONa:** 13,15 g 99,5 % natrioacetato-trihidrato tirpinama 100 mL dejonizuoto vandens.

**1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** 87,09 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ištirpinami 0,5 L dejonizuoto vandens.

**1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** 68,05 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ištirpinami 0,5 L dejonizuoto vandens.

**1 M NaOH:** 5,3 mL 50 % NaOH tirpalo ( $\rho = 1,50$ ) praskiedžiami dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

**1 M TRIS, pH 6,8:** 15,76 g TRIS–HCl tirpinama 60 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 1 M NaOH tirpalu iki 6,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

**1,5 M TRIS, pH 8,8:** 18,21 g TRIS tirpinama 60 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 8,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

**6M GuHCl:** 5,75 g 99,7 % guanidino chlorido ištirpinama 10 ml dejonizuoto vandens.

**6M GuSCN:** 28,65g 99 % guanidino tiocianato ištirpinama 40 ml dejonizuoto vandens.

**Akrilamidas 40 %:** 40 g akrilamido ištirpinama 60 mL dejonizuoto vandens.

**Ampicilino tirpalas:** 1 g ampicilino tirpinamas 10 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo koncentracija 100 mg/mL.

**APS 10 %:** 100 mg amonio persulfato tirpinama 900  $\mu$ L dejonizuoto vandens.

**Bis–akrilamidas 2 %:** 2 g bis–akrilamido ištirpinama 98 mL dejonizuoto vandens.

**IPTG tirpalas:** 238,3 mg IPTG ištirpinami 1 mL dejonizuoto vandens.

**Kumasi R–250 dažo tirpalas:** 0,5 g kumasi R–250 dažo ištirpinama 104 mL 96 % etanolio, pridedama 20,3 mL ledinės acto rūgšties. Praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 200 mL.

**6X pavyzdžio buferinis tirpalas:** 1,2 g NDS ištirpinama 6 mL glicerolio, pridedama 3,75 mL 1 M TRIS pH 6,8 ir 0,93 mL 2–merkaptioetanolio bei 6 mg bromfenolio mēlio. Praskiedžiama iki 10 mL dejonizuotu vandeniu (jeigu reikia).

**Elektroforezės buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas):** 25 mM TRIS, 192 mM glicino, 0,1 % NDS, pH 8.3–8.6 (pH nekoreguojamas). 288 g glicino, 60.4 g TRIS, 20 g NDS tirpinami 2 L dejonizuoto vandens.

### **2.1.8. Buferiniai tirpalai naudoti baltymų gryninime**

#### **1. 10 mM TRIS, 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.**

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tirpalo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

#### **2. 50 mM imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.**

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tirpalo, pridedama 3,4 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

#### **3. 700 mM imidazolo, 10 mM TRIS, 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,8.**

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tirpalo, pridedama 47,66 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

#### **4. 6 M guanidino chlorido, 10 mM TRIS, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glutationo, pH 8.**

402,3 g 99,7 % guanidino chlorido užpilama 7 mL 1 M TRIS tirpalo ir 70 mL 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tirpalo, užpilamas pakankamas kiekis dejonizuoto vandens (bendras tirpalo tūris apie 650 mL) ir maišant ant magnetinės maišyklės laukiama, kol ištirps guanidino chloridas. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio filtrą. 2,15 g glutationo įdedama prieš pat naudojimą. Tirpalo pH koreguojamas su 1 M NaOH ir 0,5 M HCl iki 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalas su glutationu turi būti laikomas ant ledo.

#### **5. 10 mM PB, pH 6,4.**

36,8 mL 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, sumaišoma su 3,2 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, praskiedžiama vandeniu iki 3800 mL. pH koreguojamas 1 M NaOH ir 0,5 M HCl (jeigu reikia) iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 4000 mL.

#### **6. 1,5 M NaCl, 10 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, pH 6,4.**

9,2 mL 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, sumaišoma su 0,8 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pridedama 87,66 g NaCl, praskiedžiama vandeniu iki 900 mL. pH koreguojamas 1 M NaOH ir 0,5 M HCl (jeigu reikia) iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

#### **7. 10 mM acetatinis buferis, pH 4.**

30 mL 1 M CH<sub>3</sub>COOH sumaišoma su 10 mL 1 M CH<sub>3</sub>COONa ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 3800 mL. pH koreguojamas 1 M NaOH ir 0,5 M HCl (jeigu reikia) iki 4. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 4000 mL.

## **2.2. Metodai**

### **2.2.1. Transformacija į kompetentes ląsteles**

1. Paruošiamos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, kurioje yra ampicilino (100 µg/mL). Lėkštelės šildomos 37 °C temperatūroje apie 1 val.
2. Į 30 µL kompetentinių ląstelių įdedama 1 µL plazmidės, sumaišoma lengvai purtant.
3. Gautas mišinys laikomas 30 min. ledo vonioje.
4. Vykdomas temperatūrinis šokas, 90 s laikoma 42 °C temperatūroje, tuomet mišinys greitai perkeliamas į ledo vonią ir laikomas joje 2 min.
5. Į transformacijos mišinį pridedama 400 µL S.O.C. mitybinės terpės ir auginama 45 min. 37 °C temperatūroje terostatuojamoje purtyklėje (220 aps./min).
6. 100 µL transformantų steriliai užsėjama ant pašildytos Petri lėkštelės. Lėkštelė laikoma termostate 37 °C temperatūroje 16 val.

### **2.2.2. Bakterijų auginimas**

#### **2.2.2.1 LB terpėje naudojant induktorių**

1. Į LB mitybinę terpę su ampicilinu (100 µg/mL), nuo Petri lėkštelės užsėjama viena transformantų kolonija ir auginama per naktį (16 val.) 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min).
2. Skiedžiant santykiu 1:40 (10 mL į 400 mL) naktinė kultūra persėjama į kitas kolbas, kuriose yra LB terpė su ampicilinu (100 µg/mL).

3. Bakterijos auginamos 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min), kol optinis tankis ( $\lambda = 600$ ) pasiekia 0,6-1 optinius vienetus. Paimamas ląstelių kultūros mėginys.
4. Atliekama indukcija – pridedama 1 mM IPTG. Bakterijos auginamos 20-24 val. 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min).
5. Praėjus 20-24 val. po augimo paimamas mėginys.
6. Gauta ląstelių biomasė yra perpilama į centrifugavimo indus ir 40 min centrifuguojama 5000 aps/min. Supernatantas pašalinamas, o biomasė laikoma -20 °C temperatūroje.
7. Mėginiai, paimti prieš ir po indukcijos, analizuojami NDS–PAAG metodu.

### **2.2.2.2 Auto-induktyvioje terpėje**

1. Į paruoštą auto-induktyvią terpę su ampicilinu (100 µg/mL) kilpele nuo Petri lėkštelės yra užsėjama transformantų kolonija. Paimamas mėginys.
2. Bakterijos auginamos 20-24 val. 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min).
3. Po 20-24 val. paimamas dar vienas ląstelių kultūros mėginys.
4. Gauta ląstelių biomasė yra perpilama į centrifugavimo indus ir 40 min centrifuguojama 5000 aps/min. Supernatantas pašalinamas, o biomasė laikoma -20 °C temperatūroje.
5. Mėginiai, paimti prieš ir po indukcijos, analizuojami NDS–PAAG metodu.

### **2.2.3. Elektroforezės mėginių ruošimas**

1. Prieš pridedant induktoriaus į LB terpę arba praėjus 2 val. po transformantų užsėjimo į auto-induktyvią terpę imamas 0,5-1 mL ląstelių suspensijos mėginys, kuris yra nucentrifuguojamas 2 min 6000 aps./min, supernatantas nupilamas, o biomasė tirpinama 10 µL 6X pavyzdžio buferiniame tirpale ir 50 µL dejonizuoto vandens. Mėginys kaitinamas 98 °C temperatūroje 10 min. .
2. Mėginys, imtas iš užaugusios ląstelių kultūros, ruošiamas skiedžiant ląstelių suspensiją taip, kad jos optinis tankis būtų lygus prieš indukciją paimto mėginio optiniam tankiui. Paimtas mėginys centrifuguojamas 2 min 6000 aps./min, nuosėdos tirpinamos 10 µL 6X pavyzdžio buferiniame tirpale ir 50 µL dejonizuoto vandens, kaitinama 98 °C temperatūroje 10 min.

## 2.2.4. Baltymų elektroforezė

Ląstelės baltymai išskirstomi atliekant elektroforezę denatūruojančiomis sąlygomis.

**1 lentelė.** Ruošiamas gelis:

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

Skiriamasis gelis ruošiamas sumaišant nurodytus reagentus. Kadangi inicijuoja polimerizacijos reakciją TEMED ir 10 % APS, pilami pačioje pabaigoje, prieš pat gelio supylimą tarp elektroforezės plokštelių. Gerai išmaišius, tirpalas pilamas tarp švarių, 70 % etanolio tirpalu nuvalytų gelio užpylimo stiklų (1 mm tarpelis) iki pažymėtos vietos (4 cm nuo stiklo viršaus). Po to atsargiai iki formos viršaus užpilama vandens. Apatinio gelio polimerizacijos reakcija vyksta apie 40 minučių kambario temperatūroje. Geliui sustingus vanduo nupilamas. Gautas skiriamasis gelis užpilamas koncentruojančiu geliu ir tarp plokštelių įdedamos „šukos“, kad po dantimis neliktų oro burbulų. Koncentruojantis gelis kambario temperatūroje stingsta apie 30 min. Geliui sustingus, plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą. Surenkamas elektroforezės aparatas, pripilama elektroforezės buferinio tirpalo ir iš gelio išimamos „šukos“. Į gelio takelius įvedami anksčiau aprašytu būdu paruošti ląstelių kultūros mėginiai. Elektroforezė vykdoma 30 mA srovėje, neviršijant 300 V įtampos, kol dažo frontas pasiekia frakcionuojančio gelio apačią. Gelis dažomas 20 minučių kumasi R-250 dažu 30 °C temperatūroje purtant (80 aps./min).

## 2.2.5. Renatūracija ir gryninimas IMAC metodu

Užauginta biomasė yra atšildoma ir sumaišoma su buferiniu tirpalu 4 santykiu 1:5 ir homogenizuojama rankiniu homogenizatoriumi sukant ir spaudžiant stūmoklį tol, kol gaunama vientisa biomasė. Gautas homogenizatas toliau ardomas ultragarsu ledo vonelėje 20 min. (30 s/30 s ultragarsinimo/poilsio ciklais ir, esant 70 % amplitudei). Suardyta biomasė išpilstoma į

centrifugavimo mėgintuvėlius ir centrifuguojama 40 min. 15000 aps./min. 4 °C temperatūroje. Baltymo mišinys sumaišomas su 4 buferiniu tirpalu nupusiausvirintu sorbentu (NTA-sefarozė, pakrauta Ni (II) jonais). Gautas tirpalas maišomas 30 min 80 aps./min greičiu, 4 °C temperatūroje. Chromatografinė kolonėlė pakraunama sorbento ir baltymo mišiniu. Praplovimo metu baltymo tekėjimo greitis 3 mL/min. Kolonėlėje vykdoma sorbuoto baltymo renatūracija mažinant GuHCl koncentraciją nuo 6 M iki 0 M per 200 mL (tekėjimo greitis 1 mL/min). Norint, kad GuHCl visiškai atsiplautų, yra leidžiami 65 mL buferinio tirpalo 1 (tekėjimo greitis 3 mL/min). Kad išeitų prie nikelio silpniau besijungiantys baltymai, 3 mL/min greičiu yra leidžiamas 2 buferinis tirpalas. Galiausiai tikslinis baltymas desorbuojamas 130 mL 3 buferiniu tirpalu (tekėjimo greitis 3 mL/min). Iš kolonėlės išplauti baltymai renkami į frakcijas.

Po chromatografijos baltymo tirpalas dializuojamas 4 °C temperatūroje 3 kartus pakeičiant buferinį tirpalą 5, po to steriliai filtruojamas panaudojant 150 mL arba 250 mL, 73 mm diametro, 0,22 μm porų dydžio filtravimo indus „Millipore Stericup“. Filtrato optinis tankis išmatuojamas spektrofotometru ( $\lambda = 280$ ), koncentracija (mg/mL) skaičiuojama pagal formulę, kuri remiasi šviesos sugertį aprašančiu Beer-Lambert dėsniumi bei žinant baltymo molekulinę masę ir ekstinkcijos koeficientą:

$$C_{baltymo} = \frac{A \cdot M}{\epsilon \cdot l} \quad (1)$$

kur A – baltymo optinis tankis, M – baltymo molekulinė masė (g/mol),  $\epsilon$  – baltymo ekstinkcijos koeficientas ( $20525 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ), l – optinio kelio ilgis (1 cm).

### 2.2.6. Histidino uodegėlės nukirpimas ir jonų mainų chromatografija

Žinant, jog 1 mL baltymo kirpimui reikia 5 vienetų trombino, apskaičiuojamas reikalingas trombino tūris. Reikiamas trombino tūris įpilamas į afininės chromatografijos metodu išgrynintą baltymą ir paliekamas per naktį 4 °C temperatūroje.

Trombino pašalinimui naudojamas jonų mainų chromatografijos metodas, kurio metu, baltymas yra supilamas į CM-sefarozės sorbentą nupusiausvirintą buferiniu tirpalu 5 ir ant magnetinės maišyklės maišomas 30 min 80 aps./min greičiu, 4 °C temperatūroje. Chromatografinė kolonėlė pakraunama sorbento ir baltymo tirpalu. Per pakrautą kolonėlę yra paleidžiamas 100 mL (tekėjimo greitis 3 mL/min) buferinis tirpalas 5, vėliau baltymas atskiriamas nuo sorbento sudarant



200 mL buferinio tirpalo 6 gradientą. Iš kolonėlės išplauti baltymai renkami į frakcijas. Po trombino atskyrimo gautas baltymas yra nudializuojamas 3 kartus, pakeičiant buferinį tirpalą 7.

### **2.2.7. Koncentravimas**

Rekombinantiniai priono baltymai po dializės nufiltruojami ir sukonzentruojami centrifugavimo metu, naudojant koncentravimo mėgintuvėlius, turinčius membraną, praleidžiančią ne didesnius kaip 10000 Da junginius. Centrifuguojama kelis kartus po 10 min., 4000 aps./min, 4 °C temperatūroje, pastoviai papildant viršutinio mėgintuvėlio rezervuarą baltymo tirpalu. Po kiekvieno baltymo centrifugavimo etapo yra patikrinama, kiek baltymas susikoncentravo, ir nusprendžiama, kiek dar reikės laiko centrifuguoti. Iki  $3 \pm 0,5$  mg/mL sukonzentruotas baltymas išpilstomas į ependorfinius mėgintuvėlius po 0,5 mg ir laikomas šaldiklyje, kuriame temperatūra palaikoma apie -20 °C.

### **2.2.8. Agregacija 37 °C temperatūroje**

Norint patikrinti spontanineę baltymo agregaciją, esant 2 M ir 4 M GuHCl koncentracijai, paruošiami tirpalai, į kurių sudėtį įeina 0,5 mg/mL BvPrP121-231 baltymo, 50 mM PB pH 6, 2 M GuHCl pH 6 arba 4 M GuHCl pH 6. 2 M GuHCl ir baltymo tirpalas yra 8 val. paliekamas 37 °C temperatūroje juos vartant 8 aps./min. 4 M GuHCl ir baltymo tirpalas tomis pačiomis sąlygomis yra laikomas 5 dienas. Rekombinantinio prioninio BvPrP121-231 baltymo fibrilių formavimasis buvo stebimas, į baltymų tirpalus pridėjus tioflavino T (ThT), specifiskai prie fibrilių besijungiančio dažo, ir matuojant jo fluorescenciją, kai sužadėjimas vyksta prie 450 nm, o emisija – nuo 480 nm iki 520 nm bangos ilgio. Spontanine agregacija buvo įvertinama stebint fluorescencijos pokyčius, kuomet ThT prisijungus prie fibrilių fluorescencija žymiai padidėja. Fluorescencijos pokyčiai buvo stebimi, naudojant fluorimetrą (fluorescencinį spektrofotometrą) „Variant“ Fluorescence Spectrophotometer Cary Eclipse ir gautus duomenis analizuojant ir gluodinant.

### **2.2.9. Fibrilių stabilumo tyrimas**

Suagregavęs 2 M guanidino chlorido baltymo tirpalas (gautas naudojant 2.2.7. skyriaus metodiką) yra nucentrifuguojamas 20 min, 14000 aps./min. supernatantas nusiurbiamas, o nusėdusios fibrilės resuspenduojamos 1 mL 0,5 M guanidino tiocianato tirpale. Suagregavęs 4 M guanidino chlorido baltymo tirpalas (gautas naudojant 2.2.7. skyriaus metodiką) užpilamas 1 mL distiliuotu vandeniu ir centrifuguojamas 20 min. 14000 aps./min. Centrifugavimas kartojamas po 3

kartus. Paruošti fibrilių tirpalai yra veikiami ultragarsu 10 min. (30 s/30 s ultragarsinimo/poilsio ciklai ir amplitudė 20 %), naudojant ultragarso homogenizatorių su MS72 antgaliu). Visą laiką mėginiai buvo laikomi lede. Norint patikrinti paruoštų fibrilių stabilumą, skirtingose denatūrantų GuSCN koncentracijose paruošiami tirpalai (2 lentelė), kurie laikomi per naktį kambario temperatūroje.

**2 lentelė.** Fibrilių stabilumui patikrinti ruošiami mėginiai:

Gaunama GuSCN konc., M	Fibrilės, $\mu\text{L}$	6M GuSCN, $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O, $\mu\text{L}$
0,5		83,3	116,7
0,75		27	173
1		37,5	162,5
1,25		48	152
1,5		58,3	141,7
1,75		68,8	131,2
2		79,2	120,8
2,25		89,6	110,4
2,5	50	100	100
2,75		110,4	89,6
3		120,8	79,2
3,25		131,3	68,7
3,5		142	58
3,75		152	48
4		162,5	37,5
4,25		172,9	27,1
4,5		183,3	16,7

Kitą dieną kvarcinėje mikrokiuvetėje sumaišoma 40  $\mu\text{L}$  50  $\mu\text{M}$  ThT tirpalo su 10  $\mu\text{L}$  paruoštų fibrilių mišinio ir naudojantis fluorimetru matuojama mėginių fluorescencija, kai sužadinimas vyksta prie 450 nm, o emisija – nuo 480 nm iki 520 nm. Po kiekvieno matavimo mikrokiuvetė yra išplaunama dejonizuotu vandeniu, 70 % etanolio tirpalu ir išdžiovinama.

### 2.2.10. Agregacija 60 °C temperatūroje

Pastebėjus, kad baltymas agreguoja 37 °C temperatūroje, nuspręsta patikrinti, kaip pelėno prionininis baltymas sudaro fibriles 60 °C temperatūroje. Šiam eksperimentui atlikti buvo naudojami 76 skirtinguose sąlygose esantys baltymo tirpalai. Pirmiausia, į lėkštelėje esančius šulinėlius yra sudedami stiklo rutuliukai, kurie skirti baltymo maišymui. Sudėjus šiuos rutuliukus, kiekviename šulinėlyje yra ruošiami skirtingi baltymo tirpalai, į kuriuos dedamas atitinkamas kiekis 50 mM pH 6 PB (3 lentelė), 6 M GuHCl (4 lentelė), 31 μL 3,23 mg/mL BvPrP121-231 baltymo bei 1 μL 10μM dažo ThT.

#### 3 lentelė. Eksperimentui reikalingi 50 mM PB kiekiai:

PB pH	šulinėlis	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH 2	A	168	150,6	133,2	115,9	98,5	81,1	68,8	46,7	29,1
pH 3	B	168	151,1	134,3	117,4	100,6	83,8	66,9	50,1	33,3
pH 4	C	168	151,1	134,3	117,4	100,6	83,8	66,9	50,1	33,3
pH 5	D	168	150,9	133,9	116,9	99,9	82,9	65,95	48,9	31,9
pH 6	E	168	150,9	133,9	116,9	99,9	82,9	65,95	48,9	31,9
pH 7	F	168	151,3	134,6	118,0	101,3	84,6	68,0	51,3	34,6
pH 8	G	168	150,6	133,2	115,9	98,5	81,1	68,8	46,47	29,1
pH 9	H	168	149,2	130,4	111,6	92,8	74,0	55,2	36,4	17,6

#### 4 lentelė. Eksperimentui reikalingi 6 M GuHCl kiekiai:

GuHCl gaunama konc.		0 M	0,5 M	1 M	1,5 M	2 M	2,5 M	3 M	3,5 M	4 M
GuHCl pH	šulinėlis	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH 2	A	–	17,4	34,8	52,1	69,5	86,9	104,2	121,3	138,9
pH 3	B	–	16,9	33,7	50,6	67,4	84,2	101,1	117,9	134,7
pH 4	C	–	16,9	33,7	50,6	67,4	84,2	101,1	117,9	134,7
pH 5	D	–	17,1	34,1	51,1	68,3	85,1	102,1	119,1	136,1
pH 6	E	–	17,1	34,1	51,1	68,3	85,1	102,1	119,1	136,1
pH 7	F	–	16,7	33,4	50,0	66,7	83,4	100,0	116,7	133,4
pH 8	G	–	17,4	34,8	52,1	69,5	86,9	104,2	121,6	138,9
pH 9	H	–	18,9	37,6	56,4	75,2	94,0	112,8	131,6	150,4

Paruošus mėginius, plokštelė yra uždengiama specialia sandaria plėvele ir dedama į „Synergy™ H4 with Hybrid Technology“ fluorescencinį spektrofotometrą, kur sužadinimas vyksta

prie 450 nm, o emisija – nuo 480 nm iki 520 nm bangos ilgio. Eksperimentas vykdomas 20 val., purtant lėkštelę ir esant 60 °C temperatūrai.

### 2.2.11. Duomenų analizė

Fluorimetru gautos agregacijos kreivės yra eksportuojamos į Microsoft Exel programą, kur yra normalizuojamos, kiekvieną gautą reikšmę padalinant iš eksperimento metu gautos didžiausios skaitinės reikšmės. Normalizuoti duomenys yra analizuojami „OriginPro 8.1“ programa. Kreivės gluodinamos, naudojant eksponentę funkciją „Hill1“.

Sigmoidinės „Hill1“ kreivės lygtis:

$$y = START + (END - START) \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad (2)$$

kur START – minimali fluorescencija, END – maksimali fluorescencija, k – laikas, kaip įvyksta pusė agregacijos.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

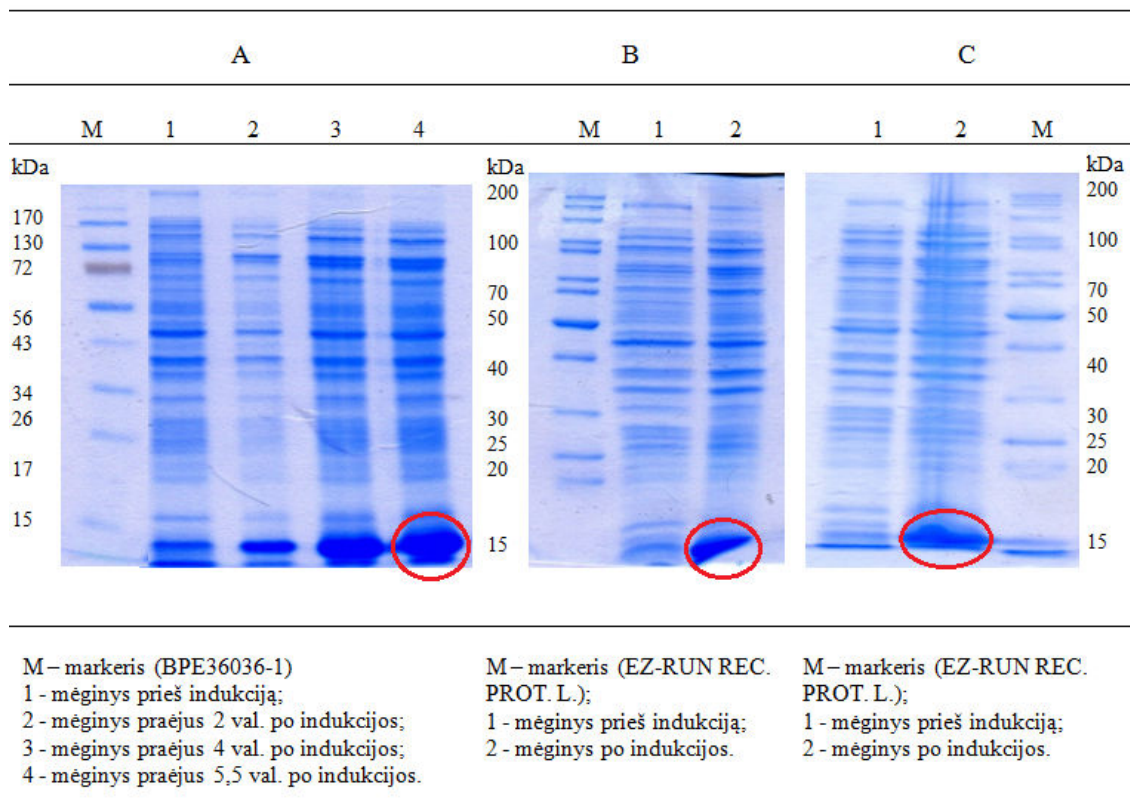
#### 3.1. Rekombinantinio BvPrP121-231 raiška

Atlikta gauto konstrukto transformacija į kompetentines ląsteles (*E. coli* BL21 Star (DE3)) bei transformantų auginimas termostate keturiose kolbose po 400 mL (5 lentelė). Transformantai auginti LB peptonas (Luria Broth) mitybinėje terpėje bei auto-induktyvioje (ZYM-5052) mitybinėje terpėje. Iš viso atlikti trys transformantų auginimai keturiose 400 mL kolbose ir iš viso gauta  $22,02 \pm 0,01$  g biomasės.

**5 lentelė.** Ląstelių augimo duomenys.

Auginimai	Terpė	Mėginių paėmimas	Auginimo laikas, min	O.V. ( $\lambda=600\text{nm}$ )	
A	Luria Broth	x	0	0,076	
		x	60	0,537	
		1	90	0,945	
		Indukcija, pridant 1 mM IPTG			
		2	170	1,398	
		3	350	1,518	
		4	440	1,703	
		Gauta 3,52 g biomasės			
		1	420	1,112	
		B	ZYM-5052	Auto-indukcija	
2	1440			2,138	
Gauta 10,16 g biomasės					
C	ZYM-5052	1	150	0,686	
		Auto-indukcija			
		2	1440	2,169	
		Gauta 8,34 g biomasės			

Naudojant Luria Broth terpę bakterijos iki indukcijos augintos 4 val. 37 °C temperatūroje, esant 220 aps./min., o pasiekus optinį tankį 0,945 O.V. ( $\lambda = 600\text{nm}$ ), pridėta IPTG induktoriaus ir bakterijos augintos dar 4 val. Naudojant auto-induktyvią terpę, kompetentinės ląstelės auginamos tomis pačiomis sąlygomis, tačiau induktorius nededamas ir bakterijos po užsėjimo nuo lėkštelės auginamos 24 val. ir 20 val. . Abiem atvejais baltymų raiška kompetentinėse ląstelėse buvo įvertinama NDS–PAAG metodu (5 pav.).

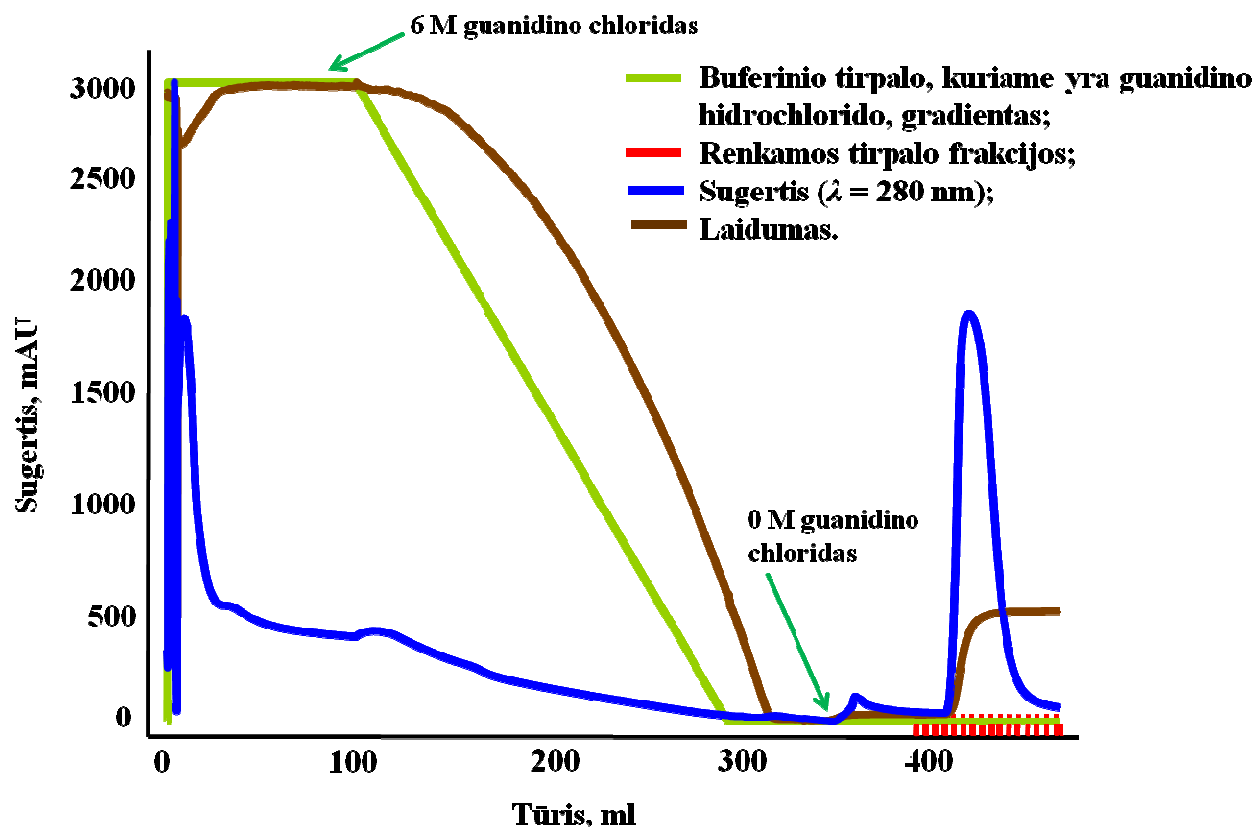


**5 pav.** Prioninio pelėno (BvPrP121-231) baltymo raiškos įvertinamas.

Remiantis elektroforeogramomis, kuriuose tikslinis baltymas ( $M = 15296$  Da) yra ties 15 kDa baltymų dydžio standarto juoste, galima teigti, kad *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene vyksta gera rekombinantinio BvPrP121-231 raiška ir galima atlikti tolimesnes baltymo gryninimo stadijas.

### 3.2. Rekombinantinio BvPrP121-231 gryninimas

Rekombinantinio BvPrP121-231, auginto *E. coli* ląstelėse, bet skirtingose terpėse, gautos biomasės yra gryninamos tuo pačiu renatūracijos ir gryninimo giminingumo chromatografijos metodu. Baltymo tirpalas buvo surišamas, panaudojant  $Ni^{2+}$  jonais pakrautą Ni Sepharose™ 6 sorbentą. Baltymas desorbuotas, naudojant 700 mM imidazolo koncentracijos buferinį tirpalą. Desorbicijos procesas fiksuojamas chromatogramose, stebint absorbciją 280 nm bangoje. Taip pat, stebimi druskų koncentracijos pokyčiai, kuriuos parodo laidumo kreivė. Chromatogramoje matyti, kad gryninimo metu baltymas išeina viena smaile ir surenkamos frakcijos, kuriuose daugiausiai baltymo. Buvo atlikti trys gryninimai IMAC metodu ir 6 paveiksle pavaizduota viena iš gautų chromatogramų.



**6 pav.** Chromatograma gauta gryninat, pelėno prioninį baltymą giminingumo chromatografijos metodu.

Iš surinktų frakcijų buvo imidazolas pašalinamas, dializuojant tirpalą 5 buferiniame tirpale. Po dializės baltymo tirpalas buvo filtruojamas panaudojant filtravimo indus „Millipore Stericup“ ir įvertinami afininės chromatografijos metu gauti rezultatai, kurie pateikti 3 lentelėje.

**3 lentelė.** Tikslinio baltymo renatūracijos ir gryninimo giminingumo chromatografijos metu gauti rezultatai.

Naudota terpė	Gauta biomasė, g	Frakcijų tūris, mL	Koncentracija, mg/mL	Gauta baltymo, mg
LB Luria Broth	3,52 ± 0,01	32,00 ± 1,00	1,10 ± 0,03	35,22 ± 0,96
ZYM-5052	10,22 ± 0,10	50,00 ± 1,00	1,97 ± 0,03	98,50 ± 1,51
ZYM-5052	8,35 ± 0,01	60,00 ± 1,00	1,38 ± 0,03	80,82 ± 1,80

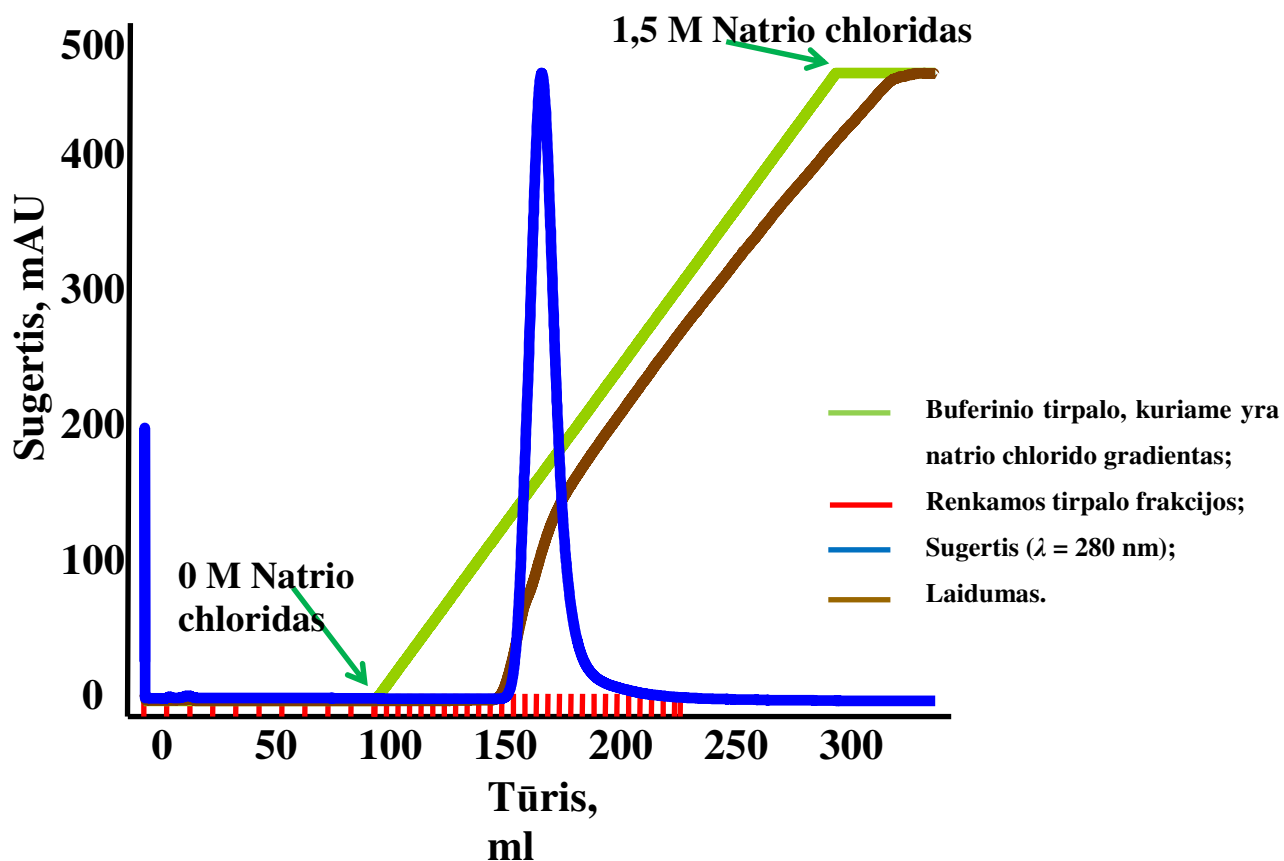
Baltymo His uodegėlės kirpimui naudotas trombinas. Žinant, kad 1 mg baltymo kirpimui reikia 5 vienetų trombino, apskaičiuotas reikalingas trombino kiekis (4 lentelė).

**4 lentelė.** Reikalingas trombino kiekis baltymo His uodegėlėms nukirpti.

Turimas baltymo kiekis, mg	Karpomas baltymo kiekis, mg	Reikalingas trombinas, vnt.
98,50 ± 1,51	98,50 ± 1,51	493
	40,41 ± 0,18	202
80,82 ± 1,80	40,41 ± 0,18	202

Norint nustatyti ar nusikirpo His uodegėlė, masių spektrometrijos metodu patikrinta baltymo molekulinė masė. Nustatyta, jog baltymo molekulinė masė –  $13228,1 \pm 1$  Da. Nuo teorinės rekombinantinio BvPrP121-231 masės (13229,6 Da) skiriasi per  $1,5 \pm 1$  Da. Šis skirtumas parodo disulfidinio tiltelio susidarymą.

Norint iš baltymo tirpalo pašalinti trombiną, His uodegėles ir kitas priemaišas buvo atliekama jonų mainų chromatografija. Rekombinantiniam baltymui su trombino proteazės priemaišomis surišti buvo naudojamas CM-sefarozės sorbentas, baltymo desorbcijai naudotas NaCl gradientas. Baltymas buvo gryninamas tris kartus, tačiau, kaip matoma iš chromatogramos (7 pav.), jonų mainų chromatografijos procesas buvo nesėkmingas, nes gauta mažai baltymo.





**7 pav.** Chromatograma gauta gryninant pelėno rekombinantinį baltymą jonų mainų chromatografijos metodu.

Gauti rezultatai po jonų mainų chromatografijos patvirtino, kad šis gryninimo etapas buvo nesėkmingas ir nuostolingas, gauta labai maža baltymo išeiga (5 lentelė).

**5 lentelė.** Po jonų mainų chromatografijos gauti rezultatai

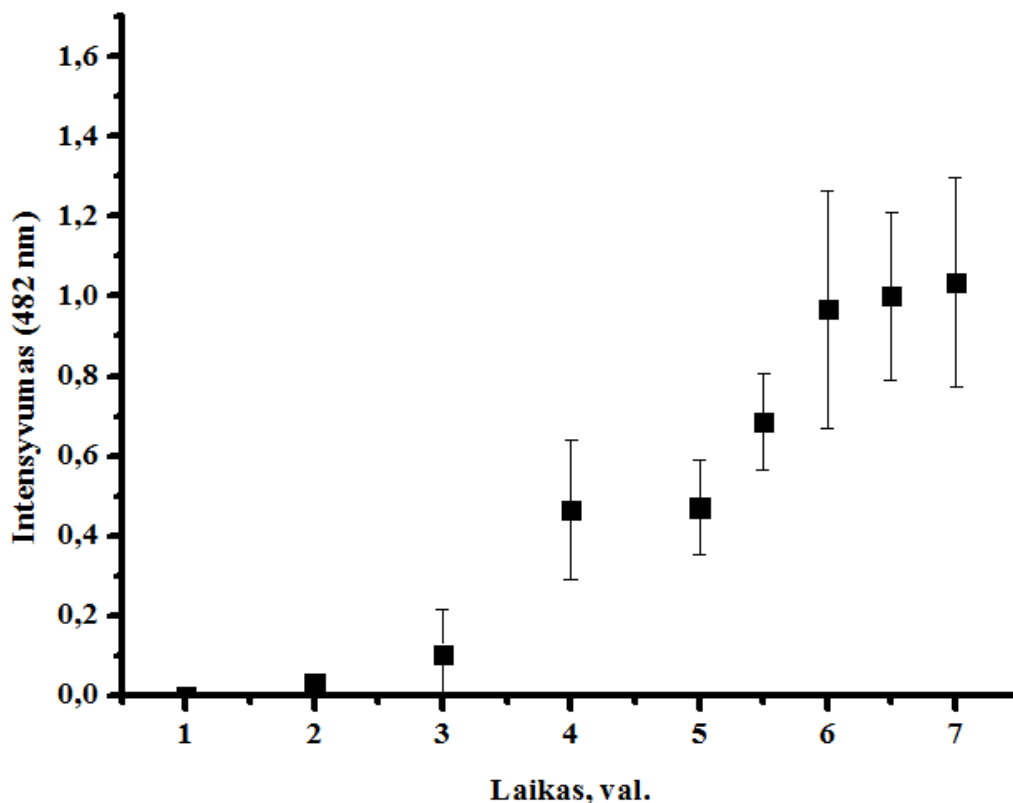
Baltymo kiekis po IMAC, mg	Baltymo kiekis po jonų mainų chromatografijos, mg	Išeiga, %
98,50 ± 1,51	5,82 ± 0,21	6
40,41 ± 0,18	2,60 ± 0,19	6
40,41 ± 0,18	2,33 ± 0,19	6

Matoma, kad buvo prarasti dideli baltymo kiekiai, tai galėjo nutikti, dėl netinkamai paruoštų buferių, sumažėjusio sorbento efektyvumo arba tiesiog baltymas suagregavo kolonoje, kol buvo laikomas kambario temperatūroje.

Kadangi, jonų mainų chromatografijos gryninimo etapas kelis kartus buvo nesėkmingas, nuspręsta baltymo agregacijos eksperimentus atlikti su baltymu išgrynintu tik afininės chromatografijos metu. Po giminingumo chromatografijos gautas baltymo ( $35,22 \pm 0,96$  mg/mL) yra dializuojamas buferyje 7, tuomet nufiltruojamas, sukcentruojamas iki  $3,23 \pm 0,06$  mg/mL ir supilstomas į 1,5 mL talpos „Eppendorf“ mėgintuvėlius.

### **3.3. Agregacija 37 °C temperatūroje**

Šiame darbo etape buvo stebima, kaip 37 °C temperatūroje agreguoja rekombinantinis pelėno prioninis baltymas esantis 2 M ir 4 M guanidino chlorido tirpaluose (8 pav.).

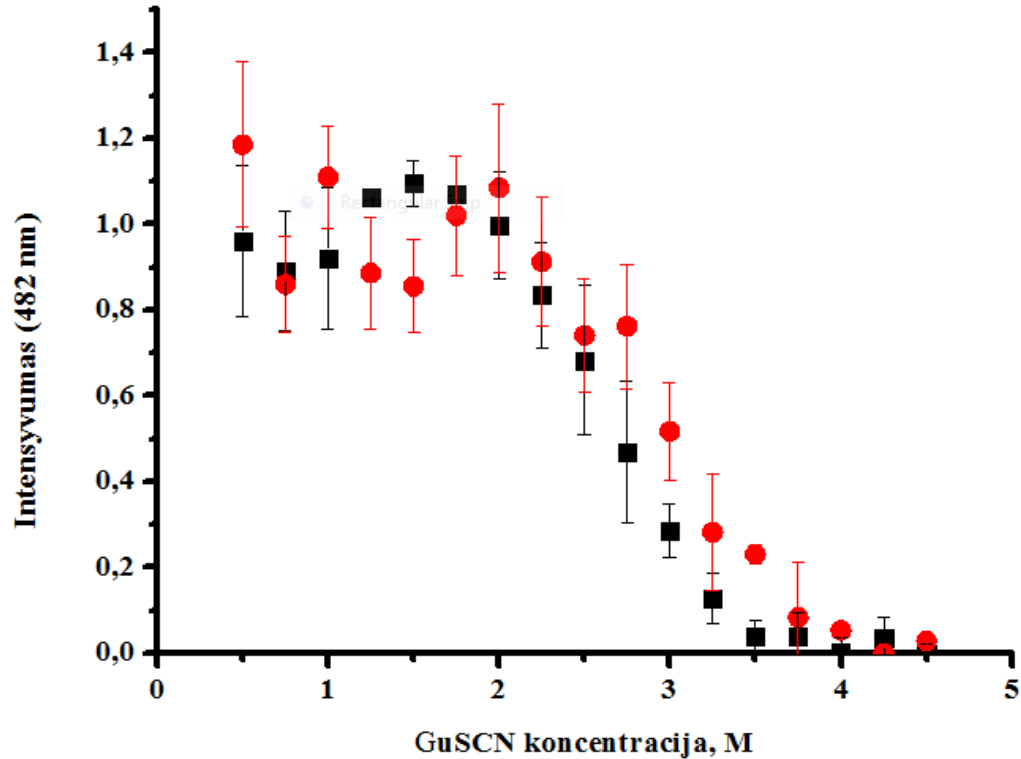


**8 pav.** Prioninio baltymo agregacija 2 M GuHCl tirpale.

Iš 8 paveiksle pateikto grafiko, galima teigti, jog baltymas esantis 2 M GuHCl tirpale pradeda agreguoti po 4 val., tačiau pilnai fibrilės susiformuoja praėjus 6 val. Pastebėjus, kad 2 M guanidino chlorido fibrilės susiformuoja per 6 val., nuspręsta patikrinti, kaip baltymas agreguoja 4 M guanidino chlorido tirpale ir pastebėta, kad šis baltymas agreguoja labai lėtai, todėl nepavyko padaryti tokių pat matavimų, kaip su 2 M GuHCl baltymo tirpalu. Išsiaiškinta, kad prioninis baltymas, esantis 4 M GuHCl tirpale fibrilės suformuoja per 5 dienas.

### 3.4. Fibrilių stabilumas

Gautų fibrilių (pagamintų pagal 2.2.9. metodiką) stabilumas buvo patikrinamas fluorescenciniu spektrofotometru, kuomet baltymo tirpalas jungėsi su fluorescuojančiu ThT dažu (9 pav.).

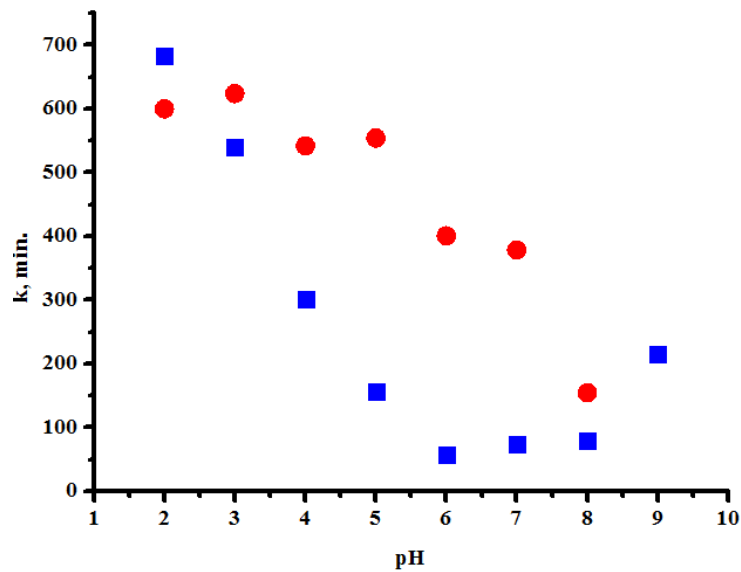


**9 pav.** Juoda spalva – 2 M guanidino chloridė esančios fibrilės, veikiamos skirtingų guanidino tiocianato koncentracijų; raudona spalva – 4 M guanidino chloridė, esančios fibrilės, veikiamos skirtingų guanidino tiocianato koncentracijų.

Gauti rezultatai parodė, jog 2 M ir 4 M GuHCl tirpale, esančios fibrilės pradeda tirpti esant 2 M GuSCN, taip pat matoma, kad 4 M guanidino chloridė esančios fibrilės yra stabilesnės nei 2 M guanidino chloridė esančios.

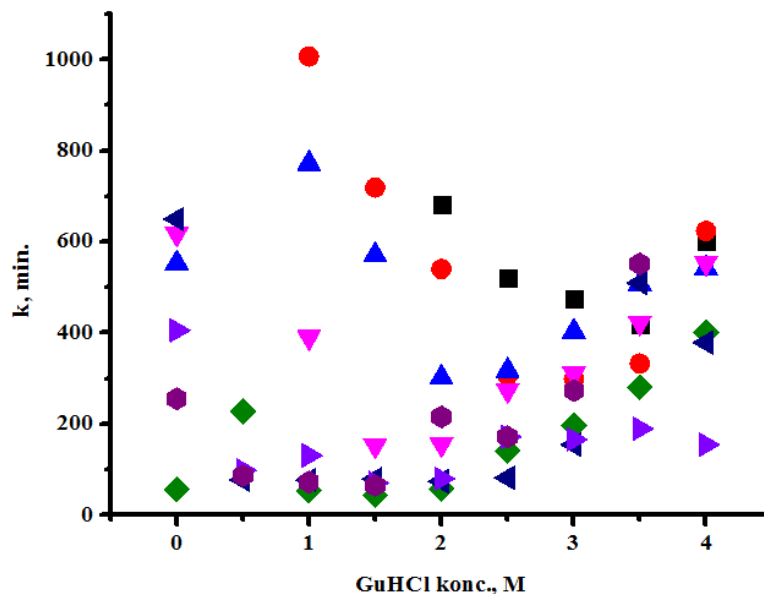
### 3.5. Agregacija 60° C temperatūroje

Pastebėjus, kad pelėno prionino baltymo fibrilės susidaro 37 °C temperatūroje, nuspręsta patikrinti, kaip šis baltymas agreguoja 60 °C temperatūroje, kintant pH ir GuHCl koncentracijai (10 pav.; 11 pav.; 12 pav.). Kadangi šiam eksperimentui atlikti reikia beveik 17 mL baltymo, todėl dėl ekonominių aspektų, nuspręsta šį eksperimentą atlikti tik vieną kartą. Eksperimento metu gautos 72 kreivės, kurios parodo, kaip baltymas agreguoja, esant skirtingoms sąlygoms, kai denatūrantų koncentracija kinta nuo 0 M iki 5 M, o pH kinta 2-9 ribose.



**10 pav.** Mėlyna spalva – 2 M guanidino chloride ir skirtinguose tirpalų pH, esančios fibrilės, raudona spalva – 4 M guanidino chloride ir skirtinguose tirpalų pH, esančios fibrilės.

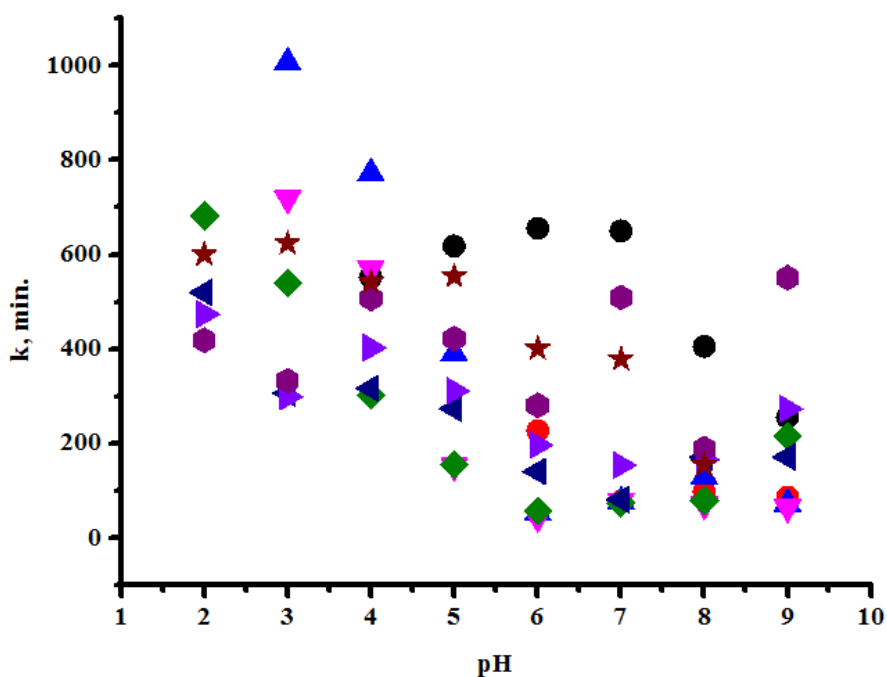
Gauti rezultatai 60 °C temperatūroje sutampa su 37 °C temperatūroje gautais duomenimis, nes abiem atvejais baltymas greičiau agreguoja 2 M GuHCl tirpale, negu 4 M GuHCl tirpale. Taip pat, galima teigti, jog esant šioms denatūrantų koncentracijoms ir didinant pH – greitėja baltymo agregacija.



**11 pav.** Baltymo agregacijos priklausomybė nuo GuHCl koncentracijos, esant skirtingoms pH reikšmėms. Juoda spalva – pH 2, raudona spalva – pH 3, mėlyna spalva – pH 4, rožinė spalva – pH 4

5, žalia spalva – pH 6, tamsiai mėlyna spalva – pH 7, violetinė spalva – pH 8, tamsiai violetinė spalva – pH.

Įvertinus gautus rezultatus, galima teigti, kad kai GuHCl koncentracija yra 0 M baltymas agreguoja lėčiau, nei esant mažoms jo koncentracijoms. Taip pat pastebėta, kad prioninio baltymo agregacija greitėja, didinant denatūrantą koncentraciją iki 2 M, bet pasiekus šią koncentraciją fibrilių susidarymo procesas pradeda lėtėti. Galima daryti išvadą, kad prioninis baltymas sparčiausiai agreguoja esant 2 M GuHCl koncentracijai, nepriklausomai nuo tirpalo pH.



**12 pav.** Baltymo agregacijos priklausomybė nuo pH reikšmės, esant skirtingoms GuHCl koncentracijoms. Juoda spalva – 0,5 M, raudona spalva – 1 M, mėlyna spalva – 1,5 M, rožinė spalva – 2 M, žalia spalva – 2,5 M, tamsiai mėlyna spalva– 3 M, violetinė spalva – 3,5 M, ruda spalva – 4 M.

Šios kreivės parodo, kad didinant pH iki 6, baltymo agregacija greitėja ir daugeliu atveju pasiekus šią pH reikšmę fibrilių susidarymo procesas pradeda lėtėti. Bet kaip matoma iš grafikų, kai kuriais atvejais baltymas greičiausiai agreguoja esant pH 8. Pastebėta, kad nesant denatūrantui, baltymas sparčiausiai agreguoja, kai pH reikšmė yra 9, ir mažėjant šiai reikšmei procesas lėtėja.

Atlikus šį eksperimentą, galima daryti išvadą, kad prioninis baltymas tikrai agreguoja daugelyje stebėtų sąlygų, tačiau norint turėti tikslesnius duomenis reiktų atlikti dar bent 2 eksperimento pakartojimus.

## IŠVADOS

1. Atlikta plazmidės, koduojančios pelėno prioninio baltymo geną, transformacija į *E. coli* bakterijas. Kompetentinės ląstelės buvo auginamos skirtingose terpėse ir išsiaiškinta, jog daugiau biomasės yra gaunama naudojant auto-induktyvią ZYM-5052 mitybinę terpę.
2. Rekombinantinis pelėno prioninis baltymas (BvPrP121-231) buvo renatūruotas ir išgrynintas giminingumo chromatografijos metodu. Iš viso gauta  $214,54 \pm 0,21$  mg BvPrP121-231 (su histidinine uodega).
3. Histidininė uodega buvo atskirta nuo BvPrP121-231, tačiau jonų mainų chromatografijos metodu baltymas buvo nesėkmingai išgrynintas, nes gauta baltymo išeiga yra 6 %. Po šio gryninimo etapo gauta  $10,75 \pm 0,06$  mg baltymo.
4. Atlikti BvPrP121-231 (su histidinine uodega) agregacijos tyrimai parodė, kad šis baltymas gali sudaryti fibriles esant įvairioms denatūrantų GuHCl koncentracijoms. 2 M ir 4 M GuHCl tirpaluose susidariusių fibrilių stabilumas patikrintas į jas pridėjant denatūrantų GuSCN ir išsiaiškinta, kad 4 M GuHCl tirpale esančios fibrilės yra stabilesnės nei 2 M GuHCl tirpale.

\_\_\_\_\_  
(Parašas)

Dovilė Janušaitė  
(Vardas ir pavardė)

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. AGRIMI, U.; NONNO, R.; DELL'OMO, G.; DI BARI, M. A.; CONTE, M.; CHIAPPINI, B.; LIPP, H. P. Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS pathogens*, 2008, 4.7: e1000113.
2. AGUZZI, A.; CALELLA, A. M. Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases, *Physiological Review*, 2009, 89: 1105–1152.
3. AGUZZI, A.; POLYMENIDOU, M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 2004, 116.2: 313-327.
4. ALIES, B.; HUREAU, C.; FALLER, P. The role of metal ions in amyloid formation: general principles from model peptides, *Metallomics : integrated biometal science*, 2013, 5: 183–92.
5. BAGDONIENĖ, L.; BENDIKIENĖ, V.; KADZIAUSKAS, J.; LABEIKYTĖ, D.; MARKUCKAS, A.; SABALIAUSKIENĖ, V.; SASNAUSKIENĖ, Z.; ŠEPUTIENĖ, V. *Biochemijos laboratoriniai darbai*, Vilniaus universiteto leidykla, 2001.
6. BANEYX, F. Recombinant protein expression in Echerichia Coli, *Current opinion in Biotechnology.*, 1999, 10: 411–421.
7. BLOCK, H.; MAERTENS, B.; SPRIESTERSBACH, A.; BRINKER, N.; KUBICEK, J.; FABIS, R.; SCHÄFER, F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in enzymology*, 2009, 463: 439-473.
8. CHEN, X.; DUAN, D.; ZHU, S.; ZHANG, J. Molecular dynamics simulation of temperature induced unfolding of animal prion protein. *Journal of molecular modeling*, 2013, 19.10: 4433-4441.
9. CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, 75: 333-366.
10. CHRISTEN, B.; PÉREZ, D. R.; HORNEMANN, S.; WÜTHRICH, K. NMR structure of the bank vole prion protein at 20 C contains a structured loop of residues 165–171. *Journal of molecular biology*, 2008, 383.2: 306-312.
11. COBB, N. J.; APOSTOL, M. I.; CHEN, S.; SMIRNOVAS, V.; SUREWICZ, W. K. Conformational stability of mammalian prion protein amyloid fibrils is dictated by a packing

- polymorphism within the core region. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289:2643-50.
12. COBB, N. J.; SÖNNICHSEN, F. D.; MCHAOURAB, H.; SUREWICZ, W. K. Molecular architecture of human prion protein amyloid: A parallel, in-register  $\beta$ -structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104.48: 18946-18951.
  13. COLBY, D. W.; GILES, K.; LEGNAME, G.; WILLE, H.; BASKAKOV, I. V.; DEARMOND, S. J.; PRUSINER, S. B. Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.48: 20417-20422.
  14. COLLINGE, J.; CLARKE, A. R. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, 2007, 318.5852: 930-936.
  15. FISHER, B.; SUMNER, I.; GOODENOUGH, P. Isolation, Renaturation, and Formation of Disulfide Bonds of Eukaryotic Proteins Expressed in Escherichia coli as Inclusion Bodies, *Biotechnology and Bioengineering*, 1993,41: 3–13.
  16. KRETZSCHMAR, H.; TATZELT, J. Prion disease: a tale of folds and strains. *Brain Pathology*, 2013, 23.3: 321-332.
  17. LEE, C. C.; NAYAK, A.; SETHURAMAN, A.; BELFORT, G.; MCRAE, G. J. A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophysical journal*, 2007, 92.10: 3448-3458.
  18. LEHMANN, S. Metal ions and prion diseases. *Current opinion in chemical biology*, 2002, 6.2: 187-192.
  19. LEWIN, B. *Genes VIII*. Oxford: Oxford University press, 2002. 279–285, 687–689p.
  20. LILIE, H., SCHWARZ, E., RUDOLPH, R. Advances in refolding of proteins produced in E. coli, *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9: 497–501.
  21. LYSEK, D. A.; NIVON, L. G.; WÜTHRICH, K. Amino acid sequence of the Felis catus prion protein. *Gene*, 2004, 341: 249-253.
  22. MIDDELBERG, A. P. Preparative protein refolding. *TRENDS in Biotechnology*, 2002, 20.10: 437-443.
  23. MOORE, R. A.; TAUBNER, L. M.; PRIOLA, S. A. Prion protein misfolding and disease. *Current opinion in structural biology*, 2009, 19.1: 14-22.
  24. PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONCADA, S.; RAMÍREZ, O. T. Production of recombinant proteins. In: *Recombinant Gene Expression*. Humana Press, 2004. p. 15-51.
  25. PRUSINER, S. B. 2001. Shattuck Lecture – Neurodegenerative diseases and prions, *The New England Journal of Medicine*, 344: 1516–26.



26. PRUSINER, S. B. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95.23: 13363-13383.
27. SASNAUSKIENĖ, Z. *Chromatografiniai metodai*, Kaunas: Technologija, 2008.
28. SOTO, C. Prion hypothesis: the end of the controversy?. *Trends in biochemical sciences*, 2011, 36.3: 151-158.
29. SUREWICZ, W. K.; APOSTOL, M. I. Prion protein and its conformational conversion: a structural perspective. In: *Prion Proteins*. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 135-167.
30. WESTERGARD, L.; CHRISTENSEN, H. M.; HARRIS, D. A. The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>): Its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2007, 1772.6: 629-644.