

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Chemijos fakultetas

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė
Justė MIKUČIAUSKAITĖ

Bakalauro darbas

**Molekulinio šaperono Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio
gavimas ir jungimosi su slopikliais tyrimas**

Darbo vadovas
dr. Daumantas Matulis

Vilnius, 2012

Molekulinio šaperono Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio gavimas ir jungimosi su slopikliais tyrimas

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Justė Mikučiauskaitė

Darbo vadovas:

dr. Daumantas Matulis

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Hsp90 struktūra.....	6
1.2. ATP hidrolizės ciklas.....	8
1.3. Hsp90 ir košaperonai	9
1.4. Hsp90 slopikliai	10
1.5. Terminio poslinkio metodas	12
1.6. Izoterminio titravimo kalorimetrija	15
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	17
2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos ir tirpalai	17
2.1.1. Naudoti prietaisai	17
2.1.2. Naudotos medžiagos	18
2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai	19
2.2 Metodai	20
2.2.1. Geno klonavimas.....	20
2.2.2. Baltymo raiška, tirpumo patikrinimas ir gryninimas	23
2.2.3. Baltymo jungimosi su slopikliais tyrimas	26
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	27
3.1. Klonavimas	27
3.1.1. pET15b-6xHis-Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio klonavimas	28
3.1.2. pET21b-Hsp90αN-6xHis be aktyvaus centro dangčio klonavimas	29
3.2. Baltymų raiškos ir tirpumo patikrinimas	30
3.3. Baltymų gryninimas.....	31
3.4. Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi su slopikliu matavimas terminio poslinkio metodu.....	32
3.5 Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimasis su slopikliu tyrimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu	37
3.6. Hsp90αN ir Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi konstantų palyginimas ..	38
4. IŠVADOS	39
SUMMARY	40
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	41

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AA – akrilamidas

Amp – ampicilinas

AmpR – atsparumo ampicilinui genas

ANS – 8-anilino-1-naftaleno sulfonatas

APS – amonio persulfatas

aps. – apsisukimai

BAA – bis-akrilamidas

DMSO – dimetilsulfoksidas

dNTP – deoksiribonukleotidai

DTT – ditionitrietolis

EDTA – etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska

HEPES – 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis

Hsp90 α N – molekulinio šaperono Hsp90 α -izoformos N-galo domenas

Hsp90 α N(lidless) – molekulinio šaperono Hsp90 α -izoformos N-galo domenas be aktyvaus
centro dangčio

IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas

ITK – izoterminio titravimo kalorimetrija

NDS – natrio dodecilsulfatas

NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinis gelis

Pfu – DNR polimerazė iš *Pyrococcus furiosus*

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas

SAP – (Shrimp Alkaline Phosphatase) šarminė krevečių fosfatazė

SOC – (Super Optimal broth with Catabolite repression) mitybinė terpė

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas

TPM – terminio poslinkio metodas

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

IVADAS

Molekulinis šaperonas šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90) yra labai konservatyvus baltymas, kuris padeda subręsti ir palaikyti natyvią būseną didelei grupei baltymų. Hsp90 baltymai randami visuose organizmuose, išskyrus archėjas. Šaperonai padeda baltymų polipeptidinei grandinei susisukti į natyvią būseną, apsaugo nuo nenatytos struktūros baltymų agregacijos juos suskaidant, padeda baltymui išsivynioti ir susivynioti pernešant juos per membraną, apsaugo baltymus nuo denatūracijos. Neteisingas baltymų susivyniojimas ar agregacija gali sukelti įvairias ligas, tokias kaip Alzheimerio ar Parkinsono liga. Vėžinėse ląstelėse Hsp90 koncentracija padidėja 2 – 3 kartus. Todėl molekuliniai šaperonai yra tiriami, kaip galimi įvairių vaistų taikiniai.

Žmonių ląstelėse sintetamos dvi citozolinės Hsp90 izoformos – α ir β . Hsp90 baltymas sudarytas iš N-galo, vidurinio ir C-galo domenų. N-galo domenas pasižymi ATPaziniu aktyvumu. Prisijungus ATP, keičiasi baltymo konformacija – „užsidaro“ molekulinis dangtis, dimeras pereina iš atviros į uždara būseną. Prie ATP prijungiančios kišenės gali jungtis struktūriškai į ATP panašūs ir nepanašūs ligandai, kurie, sąveikaudami stipriau nei nukleotidai, stabdo ATP jungimąsi ir keičia baltymo aktyvumą.

Darbo tikslas – žmogaus molekulinio šaperono Hsp90 α -izoformos N-galo domeno be aktyvaus centro dangčio gavimas ir jungimosi su slopikliais tyrimas.

Darbo uždaviniai:

1. Klonuoti Hsp90 α N-galo domeno be aktyvaus centro dangčio geną į baltymų raiškai pritaikytus vektorius.
2. Išgryninti Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio.
3. Izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais nustatyti sąlygas, kuriomis Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio jungimasis su slopikliais yra stipriausias.
4. Palyginti Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio ir Hsp90 α N jungimosi su slopikliais termodinamikos parametrus.

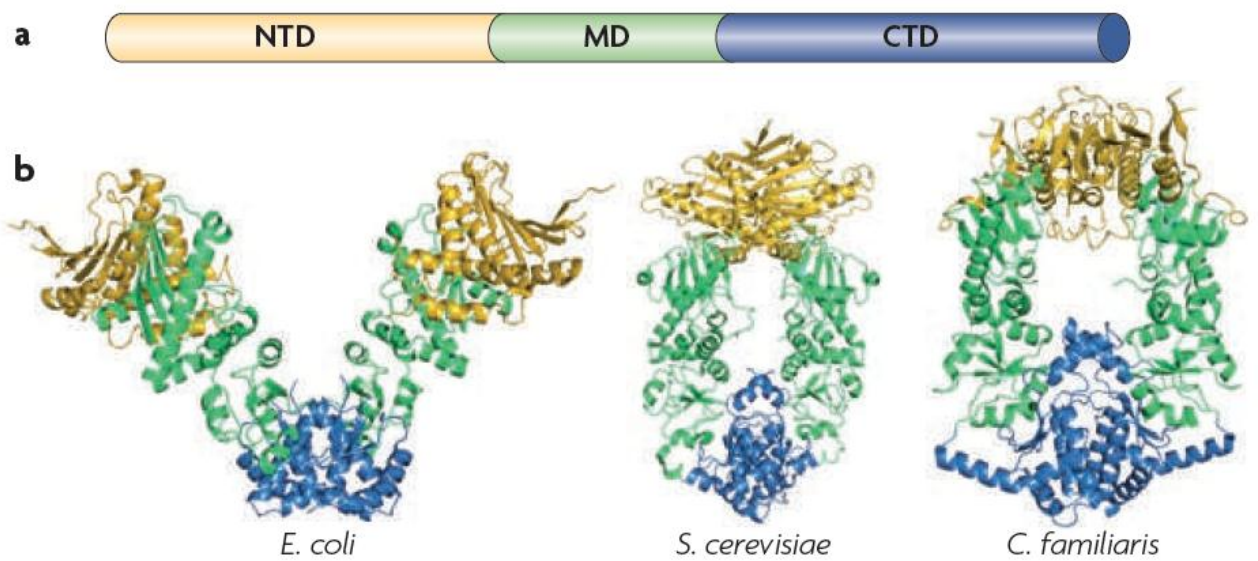
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Hsp90 struktūra

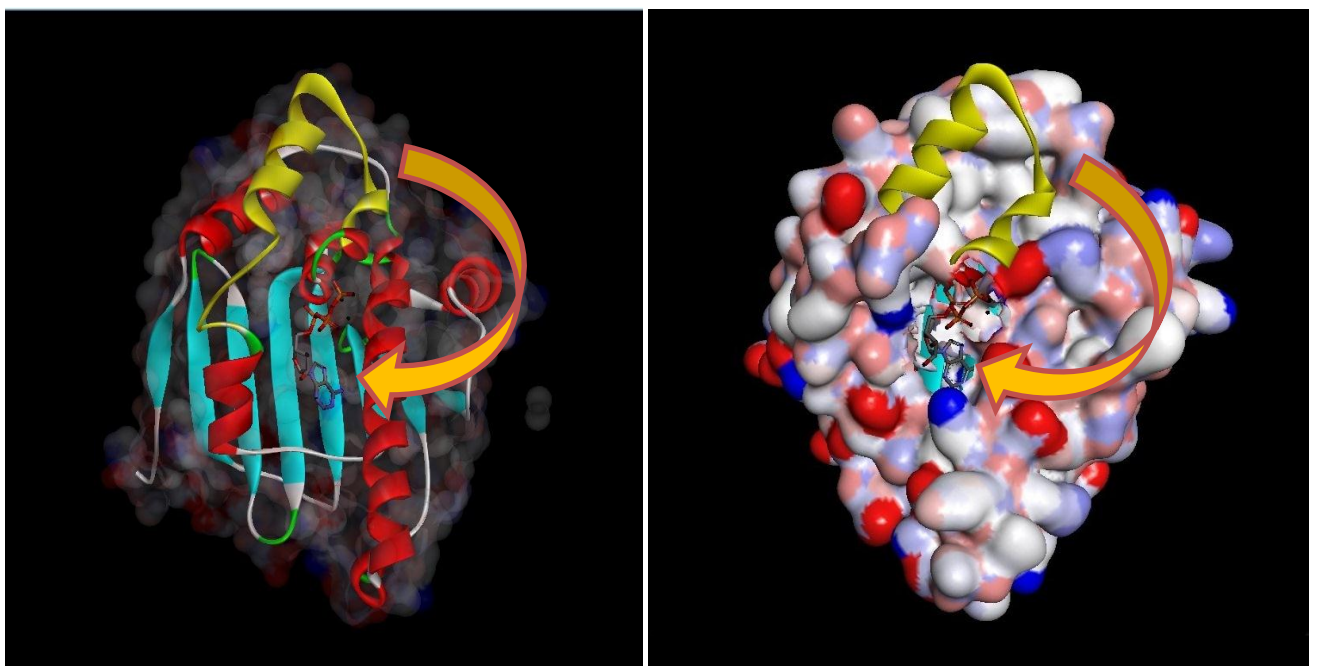
Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90) yra vienas iš konservatyvių baltymų, priklausančių molekulinį šaperonų klasei. Hsp90 baltymo funkcijos yra padėti kitiems baltymams (baltymams „klientams“) susilankstyti į natyvią struktūrą, juos aktyvuoti, stabilizuoti, apsaugoti nuo agregacijos. Tarp Hsp90 „klientų“ yra daugybė transkripcijos faktorių, kinazių, receptorių, signalinių molekulių ir kitokių baltymų, kurie veikia normaliomis ar šoko sąlygomis. Hsp90 yra vienas gausiausiai ląstelės citoplazmoje sutinkamų baltymų – normaliomis sąlygomis jis sudaro apie 1 – 2 % visų ląstelės baltymų. Šoko sąlygomis Hsp90 baltymo raiška padidėja kelis kartus.

Hsp90 baltymas yra randamas beveik visuose eukariotinės ląstelės skyriuose. Ląstelės citozolyje randamos dvi Hsp90 izoformos – streso sąlygomis indukuojama α -izoforma ir nuolat ekspresuojama β -izoforma. Pagrindinis izoformų skirtumas yra toks, kad α -izoforma greitai dimerizuojasi, tuo tarpu β -izoforma dimerizuojasi gerokai lėčiau (Csermely et al., 1998). Hsp90 baltymas daugiausiai egzistuoja kaip konstitutyvus dimeras ($\alpha\alpha$ arba $\beta\beta$), tačiau taip pat pasitaiko ir monomerų (α arba β), heterodimerų ($\alpha\beta$) ar aukštesnių abiejų izoformų oligomerų (Sreedhar et al., 2004).

Hsp90 baltymas sudarytas iš 3 domenų: konservatyvaus N-galo domeno, vidurio (M) domeno ir C-galo domeno (1.1 pav.). N-galo domenas turi ATP jungimosi vietą ir keletą konservatyvių aminorūgščių liekanų, sudarančių aktyvaus centro dangtį (1.2 pav.), kuris uždaro nukleotidą prisijungiančią kišenę. Vidurio domenas turi hidrofobinę dalį ir amfifatinę iškyšą (iškyša iš vienos pusės yra hidrofobinė ir neapsaugota, o iš kitos – teigiamai įkrauta (Pearl, Prodromou, 2006)), kurios yra lemiamos Hsp90 ir baltymo „kliento“ sąveikai. C-galo domenas yra atsakingas už dimerizaciją ir yra mažiau konservatyvus, nei kiti baltymo domenai (Taipale et al., 2010).



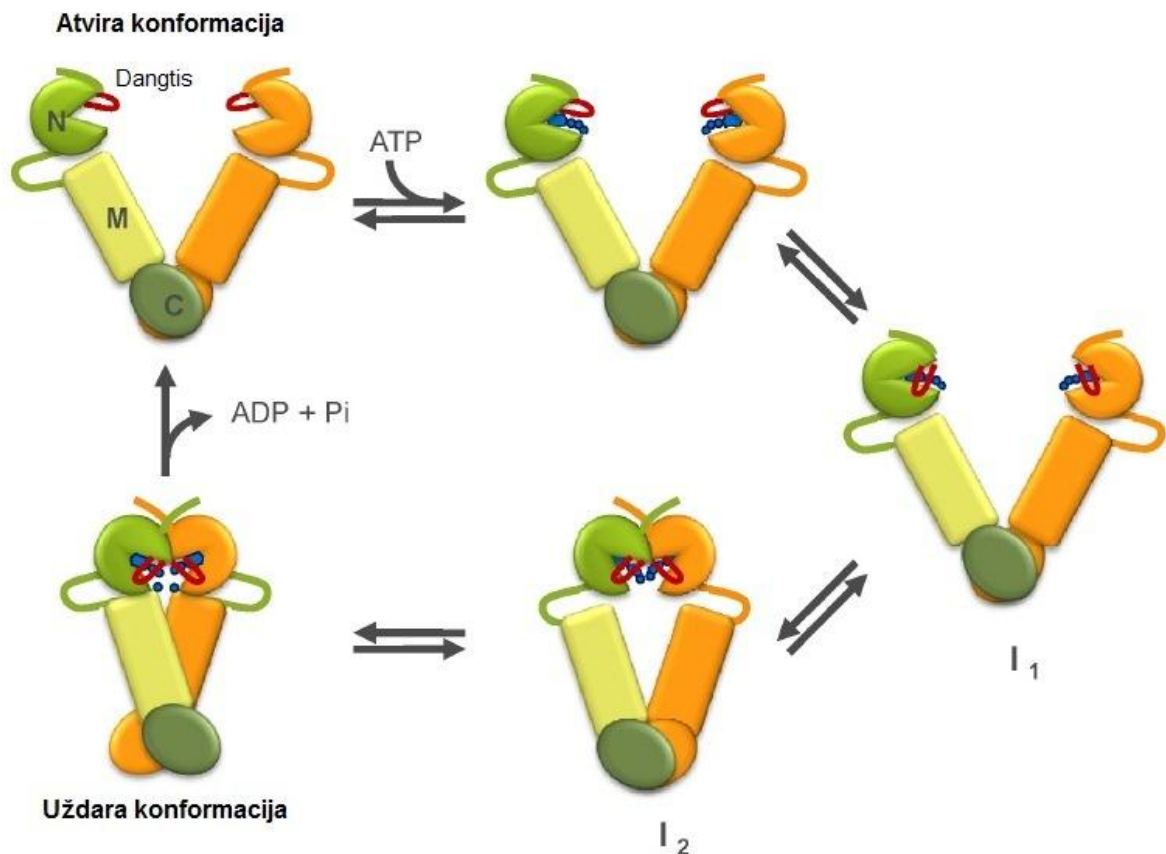
1.1 pav. Hsp90 domenų struktūros: a) Hsp90 domenų struktūra; b) Pilno ilgio Hsp90 baltymų iš *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (abu citozoliniai Hsp90) ir *Canis familiaris* (endoplazminio tinklo Hsp90) struktūros. Skirtingos spalvos žymi skirtingus domenus. (Taipale et al., 2010)



1.2 pav. Hsp90 α N-galo domenas susijungęs su ATP aktyviajame centre. Geltonai pažymėtos aktyvaus centro dangtį sudarančios aminorūgštys. Rodyklė rodo dangtį sudarančios kilpos pasisukimą prisijungus ATP. Kairiajame paveiksle matoma baltymo tretinė struktūra, dešiniajame - sumodeliuotas baltymo paviršius su ATP prijungiančia kišene (struktūra iš PDB duomenų bazės, struktūros kodas 3T0Z, sumodeliuota naudojantis Accelerys Discovery Studio 3.1 programa).

1.2. ATP hidrolizės ciklas

ATP hidrolizės metu išsiskyrusi energija yra panaudojama tam, kad Hsp90 galėtų padėti kitiems baltymams įgyti ir/ar palaikyti natyvią konformaciją. Vieno ciklo metu yra hidrolizuojamos dvi ATP molekulės. Prie atviros konformacijos Hsp90 prisijungus dviem ATP molekulėms, aktyvaus centro dangtį sudaranti kilpa pasisuka maždaug 120° kampą ir uždaro ATP jungimosi kišenę. Aktyvaus centro uždarymas paskatina N-galo domenų asociaciją ir tolimesnius konformacinius pokyčius, po kurių baltymas pereina į uždara konformaciją. Uždaroje konformacijoje įvyksta ATP hidrolizė, Hsp90 baltymas grįžta į atvirą konformaciją ir ciklas gali būti kartojamas iš naujo (1.3 pav.) (Hahn, 2009).

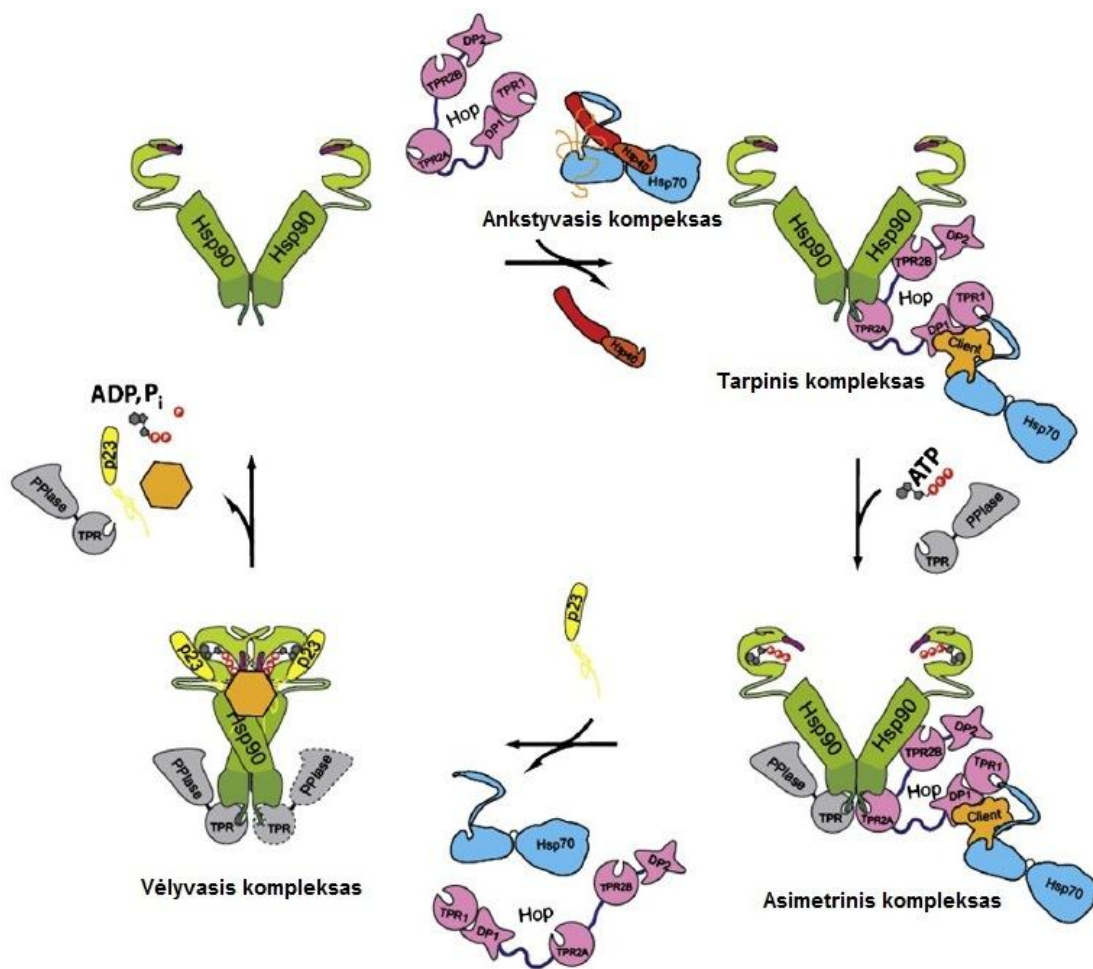


1.3 pav. Hsp90 ATP hidrolizės ciklas (pagal Hahn, 2009)

1.3. Hsp90 ir košaperonai

Eukariotinėse ląstelėse yra atrasta daugiau nei 20 skirtingų košaperonų. Citozolinis Hsp90 baltymas su baltymais „klientais“ sąveikauja tam tikru tvarkingu nuo ATP priklausomu keliu. Šis kelias priklauso nuo papildomų šaperonų Hsp70 ir Hsp40 ir daugybės košaperonų, kurie reguliuoja Hsp90 funkciją *in vivo* ir *in vitro*. Košaperonai gali jungtis prie bet kurio iš Hsp90 domenų, todėl jų veikimo mechanizmai skiriasi: vieni košaperonai reguliuoja baltymo Hsp90 ATPazinį aktyvumą, kiti lokalizuoja, perneša ir reguliuoja sąveiką su baltymais „klientais“ (Johnson, Brown, 2008).

Nenatyvios konformacijos baltymas (pavyzdžiui kinazė ar steroidų receptorių) jungiasi prie šaperonų Hsp70 ir Hsp40 ir suformuoja ankstyvąjį kompleksą. Baltymas „klientas“ yra pernešamas prie Hsp90, Hsp40 atsiskiria nuo ankstyvojo komplekso. Hsp70 su baltymu „klientu“ jungiasi prie Hsp90 per adapterinį baltymą Hop (Hsp90-Hsp70 organizuojantis baltymas), kuris prisijungia prie vieno iš Hsp90 dimero C-galo. Suformuojamas tarpinis kompleksas. Baltymo Hsp90 N-galo domenai prisijungia ATP, prie laisvo C-galo jungiasi peptidilprolilizomerazė (PPIazė). Sudaromas asimetrinis kompleksas. Nuo komplekso atsiskiria Hsp70, dėl prisijungto ATP Hsp90 pereina iš atviros į uždarą konformaciją. Prie komplekso jungiasi p23 baltymas, kuris stabilizuoja uždarą Hsp90 konformaciją, o tai susilpnina Hsp90 ir Hop sąveiką, todėl Hop pasišalina iš komplekso. Galbūt prie atsiradusio laisvo Hsp90 C-galo jungiasi dar viena peptidilprolilizomerazė. Susidaro vėlyvasis kompleksas. Toliau vyksta ATP hidrolizė ir konformaciniai pokyčiai, kurie padeda substratui įgyti natyvią ir aktyvią struktūrą. Peptidilprolilizomerazė, p23, sulankstytas baltymas „klientas“, ADP ir fosfatas atsiskiria nuo komplekso ir ciklas gali kartotis iš naujo (1.4 pav.) (Li et al., 2012). Įvairūs kofaktoriai reguliuoja šį ciklą: Cdc37 slopina baltymo Hsp90 ATPazinį aktyvumą, Hop slopina N-galų dimerizaciją, Aha1 skatina ATP hidrolizę, o p23 stabilizuoja Hsp90 dimerą prieš ATP hidrolizę (Hartl et al., 2011).



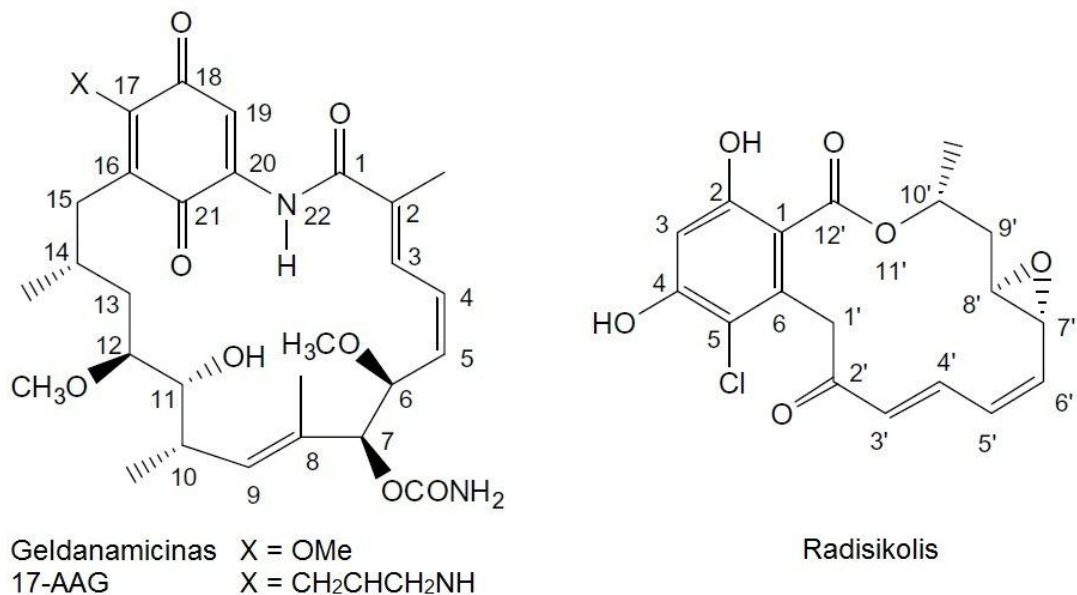
1.4 pav. Hsp90 ATP hidrolizės ir košaperonų veikimo ciklas. Galimai prisijungianti antra peptidilprolilizomeražė pažymėta brūkšnine linija (pagal Li et al., 2012).

1.4. Hsp90 slopikliai

Vėžinėse ląstelėse Hsp90 baltymo raiška yra padidėjusi, o tarp „klientų“ yra daug mutavusių onkogeninių baltymų, tokių kaip Her2, Akt, p53 mutantas, Cdk4, Raf-1, Bcr-Abl (Kamal et al., 2004). Todėl Hsp90 baltymas yra tiriamas kaip potencialus priešvėžinių vaistų taikiny. Patraukliu taikiniu slopinimui yra N-galo domene esanti labai konservatyvi nukleotidą prijungianti kišenė, kuri yra neįprastos struktūros ir skiriasi nuo kitų ATPazių (Chène, 2002).

Hsp90 vaidmuo vėžinėse ląstelėse buvo įvertintas tik atradus farmakologines priemones, kurios selektyviai slopina jo funkciją. Geldanamincinas (1.5 pav.), antibiotikas išskirtas iš *Streptomyces hygroscopicus*, yra pirmasis atrastas Hsp90 slopiklis, tačiau terapijoje jis netaikomas, nes yra citotoksiškas, metaboliškai ir chemiškai nestabilus bei mažai tirpus vandenyje. Geldanamicino pagrindu sukurtas kitas Hsp90 slopiklis 17-alilamino-17-

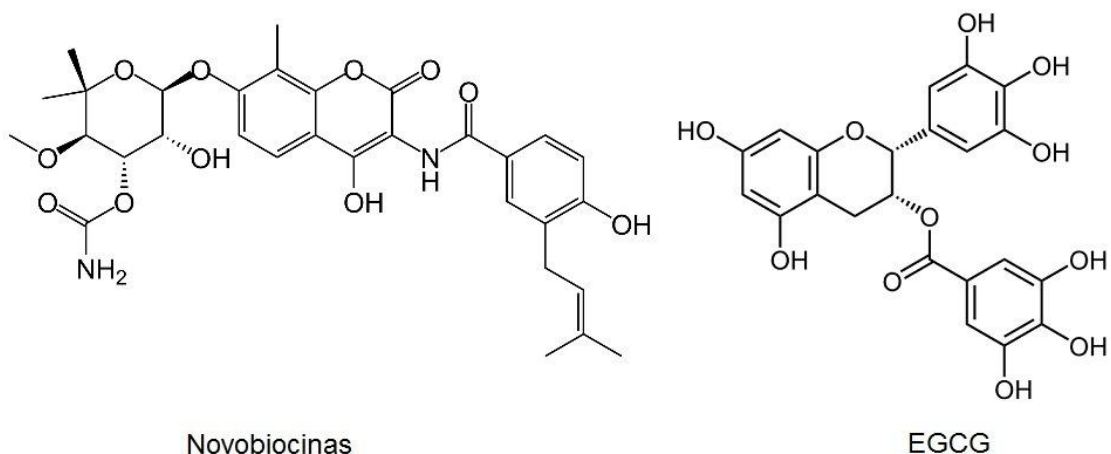
demetoksigeldanamicinas (17-AAG) (1.5 pav.), kuris yra mažiau citotoksiškas ir stabilesnis (Taldone et al., 2008). Nuo 2005 metų 17-AAG naudojamas pirmos ir antros fazės klinikiniuose tyrimuose (Banerji et al., 2005).



1.5 pav. Hsp90 slopiklių struktūros (pagal Taldone et al., 2008)

Kitas natūralus Hsp90 slopiklis yra radisikolis (1.5 pav.). Nors radisikolis yra netoksiškas, tačiau jis nestabilus kraujo serume ir dėl to neaktyvus *in vivo*. Dėl šių priežasčių radisikolio pagrindu kuriama daug naujų slopiklių (Porter et al., 2004). Nepaisant to, nei vienas slopiklis, kurtas radisikolio pagrindu nedalyvauja klinikiniuose tyrimuose.

Aptarti slopikliai jungiasi prie N-galo domeno ATP prijungiančios kišenės, tačiau yra atrasta dar viena ATP jungimosi vieta C-galo domene (Young et al., 1998). Prie C-galo domene esančios ATP prijungiančios kišenės jungiasi tokie slopikliai kaip novobiocinas, epigallocatechin-3-galatas (EGCG) (1.6 pav.), cis-platina, taksolis (Donnelly, Blagg, 2009).



1.6 pav. C-galo domeno slopikliai (pagal Donnelly, Blagg, 2009)

2012 metų gegužės mėnesio duomenimis Jungtinėse Amerikos Valstijose vyko 49 įvairių fazių klinikiniai tyrimai (iš kurių 33 aktyvūs) naudojant įvairius Hsp90 slopiklius (pagal <http://clinicaltrials.gov/>), tuo tarpu Europoje vyko tik vienas klinikinis tyrimas (pagal <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>).

1.5. Terminio poslinkio metodas

Terminio poslinkio metodas, taip pat žinomas kaip diferencinė žvalgos fluorimetrija (DSC anglų k. differential scanning fluorimetry) ir ThermoFluor®, yra nebrangus ir greitas metodas, kuriuo galima nustatyti ligandus, kurie jungiasi prie baltymų ir juos stabilizuoja ar destabilizuoja (Niesen et al., 2007). Vienu metu galima tirti 36, 72 ar net 384 mėginius. Šiuo metodu matuojamas baltymo stabilumas lėtai keliant temperatūrą, esant skirtingoms ligando koncentracijoms. Stabilumas matuojamas ne tiesiogiai, o stebint su baltymu susijungusio dažo fluorescencijos kitimą. Vienas tokių dažų yra 8-anilino-1-naftaleno sulfonatas (ANS). Vandeninėje aplinkoje ANS fluorescencija yra maža. Keliant temperatūrą, baltymas išsivynioja, dažas gali jungtis prie atsivėrusių baltymo hidrofobinių sričių ir fluorescencija didėja. Didžiausia fluorescencija pasiekama baltymui pilnai denatūravus, o toliau keliant temperatūrą fluorescencija vėl mažėja (Matulis, 2008).

Dauguma termodinaminių matavimų remiasi jungimosi konstantos pusiausvyros sąlygomis nustatymu. Standartinė grįžtamoji makromolekulės (M) jungimosi su ligandu (L) reakcija aprašoma:



Tada jungimosi konstanta:

$$K_b = \frac{[ML]}{[M][L]}; \quad (2)$$

kur $[M]$ – makromolekulės, $[L]$ – ligando, $[ML]$ – makromolekulės – ligando komplekso koncentracijos pusiausvyros sąlygomis.

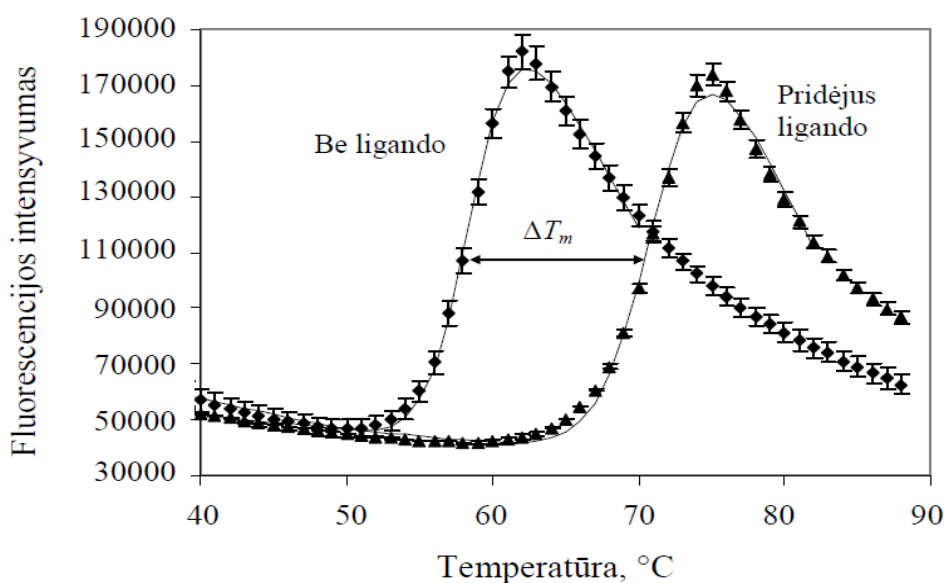
Ligando (slopiklio) disocijacijos konstanta K_d yra atvirkščiai proporcinga jungimosi konstantai:

$$K_d = \frac{1}{K_b}. \quad (3)$$

Ligandas gali jungtis prie natyvos struktūros ir/ar išsivyniojusio baltymo. Tiriant baltymo stabilumą terminio poslinkio metodu galima įvertinti ligando poveikį baltymo stabilumui. Reakcijos mišinio temperatūra keliama 1°C per minutę greičiu. Kylant temperatūrai baltymas denatūruoja, tačiau jį gali stabilizuoti prisijungęs ligandas. Jei ligandas stipriau jungiasi prie išsivyniojusio baltymo, tai baltymas yra destabilizuojamas. Šios jungimosi reakcijos gali būti pavaizduotos kaip susijusios pusiausvyros:



kur $[U]$ – laisvo išsivyniojusio baltymo koncentracija, $[L]$ – laisvo ligando koncentracija, $[N]$ – laisvo natyvos struktūros baltymo koncentracija ir $[NL]$ – natyvos struktūros baltymo ir ligando komplekso koncentracija (Cimpmperman et al., 2008).



1.7 pav. Terminio poslinkio metodu gautos baltymo denatūracijos kreivės (Matulis, 2008)

1.7 pav. pavaizduotos baltymo denatūracijos kreivės, gautos matuojant jaučio antrąją karboanhidrazę. Iš išsivyniojimo tranzicijos galima nustatyti baltymo lydymosi temperatūrą T_m . Esant lydymosi temperatūrai baltymas egzistuoja pusiausvyroje būsenoje tarp natyvios struktūros ir išsivyniojusio baltymo. Pridėjus ligando, tranzicija pasistūmė į didesnės temperatūros pusę, vadinasi ligandas stabilizavo baltymą.

Baltymo išsivyniojimo fluorescencijos kreivės yra aprašomos lygtimi:

$$y = y_N + \frac{y_U - y_N}{1 + e^{\frac{\Delta U G}{RT}}} = y_U + \frac{y_N - y_U}{1 + e^{-\frac{\Delta U G}{RT}}} \quad (5)$$

Baltymo lydymosi temperatūros gali būti nustatytos derinant baltymo lydymosi kreives pagal lygtį:

$$y(T) = y_{N,T_m} + m_N(T - T_m) + \frac{(y_{U,T_m} - y_{N,T_m}) + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{(\Delta U H_{T_m} + \Delta U C_p(T - T_m) - T(\Delta U S_{T_m} + \Delta U C_p \ln(T/T_m)))/RT}} \quad (6)$$

kur $y(T)$ apskaičiuota fluorescencija kaip funkcija nuo temperatūros; y_{N,T_m} yra dažo, prisijungusio prie susilanksčiusio natyvaus baltymo prieš tranziciją T_m , fluorescencija; y_{U,T_m} yra dažo, prisijungusio prie išsilanksčiusio baltymo po išsivyniojimo tranzicijos T_m , fluorescencija; m_N yra fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros, kai dažas prisijungęs prie susilanksčiusio natyvaus baltymo, nuokrypis; m_U yra fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros, kai dažas prisijungęs prie išsilanksčiusio baltymo, nuokrypis; $\Delta U H_{T_m}$ yra baltymo išsivyniojimo entalpija temperatūroje T_m ; $\Delta U S_{T_m}$ yra baltymo išsivyniojimo entropija temperatūroje T_m ; $\Delta U C_p$ yra baltymo išsivyniojimo šiluminė talpa, kurią priimta laikyti nuo temperatūros nepriklausoma tiriamame temperatūros intervale; R – universalioji dujų konstanta; T – temperatūra Kelvinais.

Ligando dozavimo kreivės yra apibūdinamos lygtimi (7):

$$L_t = (K_{U,T_m} - 1) \left(\frac{P_t}{2K_{U,T_m}} + \frac{1}{K_{b,T_m}} \right) = \left(e^{\frac{\Delta U H_{T_r} + \Delta U C_p(T_m - T_r) - T_m(\Delta U S_{T_r} + \Delta U C_p \ln(T_m/T_r))}{RT_m}} - 1 \right) \times \left[\frac{P_r}{2} \frac{1}{e^{\frac{\Delta U H_{T_r} + \Delta U C_p(T_m - T_r) - T_m(\Delta U S_{T_r} + \Delta U C_p \ln(T_m/T_r))}{RT_m}}} + \frac{1}{e^{\frac{\Delta_b H_{T_0} + \Delta_b C_p(T_m - T_0) - T_m(\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b C_p \ln(T_m/T_0))}{RT_m}}} \right]$$

L_t yra bendra pridėto ligando koncentracija, K_{U,T_m} yra baltymo išsivyniojimo pusiausvyroji konstanta temperatūroje T_m ; P_t yra bendra baltymo koncentracija; K_{b,T_m} yra ligando jungimosi konstanta temperatūroje T_m ; $\Delta U H_{T_r}$ yra baltymo išsivyniojimo entalpija

temperatūroje T_r ; T_r yra baltymo išsivyniojimo temperatūra, kai mišinyje nėra ligando; $\Delta_U S_{T_r}$ yra baltymo išsivyniojimo entropija temperatūroje T_r ; $\Delta_U C_p$ yra baltymo išsivyniojimo šiluminė talpa, kurią priimta laikyti nuo temperatūros nepriklausoma tiriamame temperatūros intervale; $\Delta_b H_{T_0}$ ligando jungimosi entalpija temperatūroje T_0 ; T_0 yra temperatūra, kurioje tiriamas jungimosi procesas (dažniausiai 37 °C); $\Delta_b S_{T_0}$ yra ligando jungimosi entropija temperatūroje T_0 ; $\Delta_b C_p$ yra ligando jungimosi šiluminė talpa, kurią priimta laikyti nuo temperatūros nepriklausoma tiriamame temperatūros intervale.

Jungimosi konstanta fiziologinėje temperatūroje T_0 yra apibrėžta naudojant:

$$K_{b,T_0} = e^{-(\Delta_b H_{T_0} - T_0 \Delta_b S_{T_0})/RT_0} \quad (8)$$

Terminio poslinkio metodui reikia tik kelių mikrogramų baltymo, o nustatamai jungimosi konstantai nėra viršutinės ar apatinės ribos. Vienintelė riba yra vandens užvirimo temperatūra (Petrikaitė, Matulis, 2011).

1.6. Izoterminio titravimo kalorimetrija

Iš visų termodinaminių parametrų, eksperimentiškai lengviausia pamatuoti entalpijos pokytį baltymui pereinant iš laisvos į su ligandu susijungusią būseną. Izoterminio titravimo kalorimetrijos (ITK) metodu tiesiogiai matuojama entalpija. ITK yra vienintelis metodas, kuriuo galima tiesiogiai ir pakankamai tiksliai pamatuoti beveik bet kurio bimolekulinio proceso sąveikos entalpiją. Parinkus tinkamas sąlygas, nustatoma ir reakcijos jungimosi konstanta ir stecheometrija (Matulis 2008, Baranauskienė 2009).

ITK eksperimento metu kiuvetėje esantis baltymas titruojamas ligando tirpalu (arba atvirkščiai). Po kiekvienos ligando injekcijos registruojama išsiskyrusi šiluma (lyginama su vandeniu užpildyta kiuvete, kurioje temperatūra nekinta), o kalorimetras, priklausomai nuo reakcijos, šildo arba šaldo mėginio kiuvetę, kad temperatūra išliktų pastovi. Tarp injekcijų parenkamas toks laiko tarpas, kad sistema spėtų pasiekti pusiausvyrą. Eksperimentui planuojama 20 – 50 injekcijų, taip, kad jungimosi reakcija vyktų maždaug pusėje iš injekcijų, o toliau reakcija nebevyktų (stebimos tik skiedimosi šilumos).

Kalorimetrinio titravimo metu išsiskyrusi ar sugerta šiluma yra proporcinga susijungusiai ligando daliai. Todėl labai svarbu tiksliai nustatyti pradines baltymo ir ligando koncentracijas. Pirmųjų injekcijų metu, visas ligandas susijungia su baltymu, todėl stebimi

palyginti dideli egzoterminiai ar endoterminiai signalai. Didėjant ligando koncentracijai, baltymas įsisotina ligandu, todėl su kiekviena ligando injekcija išsiskiria arba sugerama vis mažiau šilumos. Šilumos pokytis po kiekvienos ligando injekcijos gali būti išreiškiamas formule:

$$q = V_0 \Delta H_b [M_t] K_b [L] / (1 + K_b [L]) \quad (9)$$

kur V_0 yra kiuvetės tūris; ΔH_b yra jungimosi entalpija moliui ligando; $[M_t]$ yra bendra baltymo koncentracija (laisvo ir susijungusio su ligandu); K_b yra jungimosi konstanta; $[L]$ yra laisvo ligando koncentracija.

Bendras šilumos kiekis po i -tosios injekcijos gali būti apskaičiuojamas pagal (Pierce et al., 1999):

$$Q = V_0 [M_t] \sum (n_i \Delta H_i K_{bi} [L]) / (1 + K_{bi} [L]) \quad (10)$$

Tam, kad ITK eksperimentas pavyktų ir būtų gauta tiksli jungimosi konstanta, labai svarbus koeficientas c . Šis koeficientas lygus baltymo ir ligando jungimosi stecheometrijos, baltymo molinės koncentracijos ir jungimosi konstantos sandaugai:

$$c = n M_t K_b \quad (11)$$

Tam, kad būtų gauti geri matavimo rezultatai, koeficiento c reikšmė turėtų būti tarp 5 ir 500 (Petrikaitė, Matulis, 2011).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos ir tirpalai

2.1.1. Naudoti prietaisai

Darbui atlikti buvo naudojami šie prietaisai:

- analitinės svarstyklės;
- autoklavas;
- elektrinė plytelė;
- gryninimo sistema „AKTA explorer“;
- horizontalios elektroforezės aparatas „Sigma-Aldrich“ ir jo priedai;
- kalorimetras „Microcal VP-ITC“;
- laminarinė spinta;
- magnetinė maišyklė „BIOSAN“;
- maišyklė „BIOSAN“;
- pH-metras „LaboChema“;
- poliakrilamidinio gelio elektroforezės aparatas „BIO-RAD“ ir jo priedai;
- polimerazinės grandininės reakcijos aparatas „Eppendorf Mastercycler personal“;
- purtyklė „BIOSAN Multi-vortex V-32“;
- realaus laiko PGR aparatas „Rotor-Gene 6000 (QIAGEN Rotor-Gene Q) spectrofluorimeter“;
- spektrofotometras „Jenway 6305“;
- spektrofotometras „NanoDrop“;
- šaldoma centrifuga „Beckmann“;
- šaldoma mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“;
- termostatas „Eppendorf ThermoStat plus“;
- termostatuojama purtyklė „LaboChema“;
- transiliuminatorius „ULTRA-LUM“;
- ultragarso šaltinis „Bandolin Sonopuls“.

2.1.2. Naudotos medžiagos

Darbe naudotos medžiagos ir rinkiniai pateikti pagal gamintoją:

- Acros Organics: NiCl_2 ;
- AlfaAesar: gliukozė, HCl ;
- BioRad: TEMED;
- Fermentas: IPTG, molekulinų masių standartai (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix ir Protein Molecular Weight Marker SM0431), 6X Orange DNA Loading Dye dažas, fermentai PGR (Pfu polimerazė ir jos buferis, dNTP), fermentai klonavimui (BamHI, NdeI, XhoI, SAP, T4 DNR ligazė ir jų buferiai), GeneJET™ Gel Extraction Kit, GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, GeneJET™ PCR Purification Kit rinkiniai;
- Fluka: etidžio bromidas, Coomassie Brilliant Blue R-250, N,N'-metilen-Bisakrilamidas, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 ;
- GE Healthcare: IDA sefarozė, DEAE sefarozė;
- Labochemia: karbamidas;
- Roche: PMSF;
- Roth: agaras, akrilamidas, amonio persulfatas, ampicilinas, DMSO, EDTA, HEPES, LB medium (Luria/Miller) terpė, MgCl_2 ;
- Sigma: imidazolas, Tris, NDS, NaCl , KCl , MgSO_4 .

Pradmenys:

RCH1 (5'-CAGCCATATGCCGGAGGAAACCCAGACCCAAG-3') – tiesioginis pradmuo Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio geno padauginimui su NdeI kirpimo vieta.

RCH2 (5'-ACCGGATCCTTATTTGTCTTCCTTTTCTTCAGC-3') – atvirkštinis pradmuo Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio geno padauginimui su BamHI kirpimo vieta.

RCH16 (5'-TACTCGAGTTTGTCTTCCTTTTCTTCAGC-3') – atvirkštinis pradmuo Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio geno padauginimui su XhoI kirpimo vieta.

T7-Prom (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') – tiesioginis pradmuo konstrukto sekoms nustatyti sekoskaitos metodu.

T7-Term (5'-GGGGTTATGCTAGTTATTGC-3') – atvirkštinis pradmuo konstrukto sekoms nustatyti sekoskaitos metodu.

Genetiniai konstruktai:

pET28a-6xHis-Hsp90 α (lidless d115-135a.) plazmidė su genu, koduojančiu Hsp90 α be aktyvaus centro dangčio. Sukonstruota ir gauta iš Johannes Buchner laboratorijos Miunchene.

Bakterijų kamienai:

E. coli XLI-blue (Startagene) bakterijų kamienas naudotas plazmidinės DNR padauginimui ir išskyrimui.

Baltymų ekspresijai naudotas bakterijų kamienas *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen).

2.1.3. Naudotos terpės ir tirpalai**Terpės:**

LB mitybinė terpė (sudėtis: 10 g/l triptono, 5 g/l mielių ekstrakto ir 10 g/l NaCl). 25 g terpės ištirpinami 1 litre distiliuoto vandens. Autoklavuojama 1 atm slėgyje 20 minučių.

Agarizuota LB terpė: 25 g LB terpės ir 15 g agar-agaro ištirpinama viename litre dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 1 atm slėgyje 20 minučių.

SOC mitybinė terpė: 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės. Triptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami 100 ml dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 1 atm slėgyje 20 minučių. Ataušinus iki kambario temperatūros, pridedama Mg druskų ir gliukozės. Terpė išpilstoma po 1 ml ir laikoma -20 °C.

Tirpalai:

Akrilamidas/Bis-akrilamidas 30 %: 29,2 g akrilamido ir 0,8 g N,N'-metilen-bisakrilamido ištirpinama 70 ml dejonizuoto vandens. Tirpalas filtruojamas ir laikomas tamsiame inde 4°C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

APS 10 %: 100 mg amonio persulfato tirpalo tirpinama 1 ml dejonizuoto vandens. Laikoma -20 °C temperatūroje.

Ampicilino tirpalas: 1 g ampicilino tirpinamas 10 ml dejonizuoto vandens. Tirpalo koncentracija 100 µg/µl. Steriliai nufiltruojama, išpilstoma po 1 ml ir laikoma -20 °C temperatūroje.

Baltymų elektroforezės buferinis tirpalas (10X): 25 mM TRIS, 1,9 M glicino ir 35 mM NDS, pH 8,3 – 8,6 (nekoreguojamas). Laikoma 4 °C temperatūroje.

Baltymų elektroforezės dažas (6X): 60 mg bromfenolio mėlio, 92,5 mg DTT, 6 mL glicerolio, 4 mM NDS ir 3 mM TRIS ištirpinami 10 mL dejonizuoto vandens. Išpilstoma po 1 mL ir laikoma -20°C temperatūroje.

Biomassės ardymo buferinis tirpalas: 20 mM HEPES, 0,15 M NaCl, pH=8,0. Laikoma 4 °C temperatūroje.

IPTG tirpalas: 5 g IPTG tirpinama 21 ml dejonizuoto vandens (koncentracija 1 M). Tirpalas steriliai nufiltruojamas, išpilstoma po 1 ml ir laikoma -20 °C temperatūroje.

NDS-PAAG dažo tirpalas: 0,62 g R-250 ištirpinama 113 ml 95 % etanolio, pridedama 23 ml ledinės acto rūgšties. Praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 250 ml. Laikoma kambario temperatūroje.

TAE buferinis tirpalas (50X): 242 g TRIS, 100 ml 0,5 M EDTA, 57,1 ml acto rūgšties, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki vieno litro. Laikoma kambario temperatūroje.

2.2 Metodai

2.2.1. Geno klonavimas

Polimerazinė grandininė reakcija

Polimerazinė grandininė reakcija yra metodas, leidžiantis padauginti norimą DNR fragmentą. Reakcijos metu galima sukurti restrikcijos endonukleazų taikinius dauginamo DNR fragmento galuose. DNR fragmentų dauginimui naudojami 20 – 30 bazių porų ilgio pradmenys, kurie yra komplementarūs tikslinei plazmidei. PGR mišinio sudėtis (reakcijos tūris 50 µl):

- 10 kartų koncentruotas Pfu polimerazės buferis su magnio sulfatu;
- 1,25 vnt. Pfu polimerazės;
- tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys (po 0,5 µM);
- matricinės (pET28a-6xHis-Hsp90α(lidless d115-135a.)) DNR tirpalas (0,5 ng);
- dNTP tirpalas (0,2 mM);
- sterilus dejonizuotas vanduo.

PGR atlikta termocikleryje naudojant tokią programą:

1. Pradinė DNR denatūracija 94 °C temperatūroje 2 minutes.
2. DNR denatūracija 94 °C temperatūroje 30 sekundžių.
3. Pradmenų prilydymas 56 °C temperatūroje 30 sekundžių.
4. DNR sintezė 72 °C temperatūroje 1 minutę.
5. Galutinė išsikišusių DNR galų sintezė 72 °C temperatūroje 7 minutes.

2 – 4 stadijos kartojamos 30 kartų.

Vykdant elektroforezę 1,5 % agarozės gelio elektroforezę, patikrinami reakcijos produktai. DNR gryninama naudojant „GeneJET™ PCR Purification Kit“ rinkinį. Gryninama pagal gamintojo pateikiamą protokolą.

Elektroforezė 1,5% agaroziniame gelyje

TAE buferyje paruošiamas 1,5% agarozinis gelis, turintis 0,5 µg/ml etidžio bromido. Elektroforezė vykdoma esant 100 V įtampai. Gelis analizuojamas ultravioletinėje šviesoje.

DNR restrikcija

Reakcijos mišinį sudaro:

- 10 kartų koncentruotas restrikcijos buferis;
- specifinės restrikcijos endonukleazės (po 1 vnt.);
- DNR tirpalas (apie 200 ng DNR);
- sterilus dejonizuotas vanduo.

Restrikcijos mišinys laikomas 37 °C temperatūroje 2 valandas. Po restrikcijos fermentai inaktyvuojami 80 °C temperatūroje 20 minučių.

DNR defosforilinimas

Po restrikcijos vektorius yra defosforilinamas: į restrikcijos mišinį įpilama 10 kartų koncentruoto šarminės krevečių fosfatazės buferio ir šarminės krevečių fosfatazės. Mišinys laikomas 37 °C temperatūroje 30 minučių. Šarminė krevečių fosfatazė inaktyvuojama 80 °C temperatūroje 20 minučių.

DNR gryninimas iš agarozinio gelio

Reikiamas DNR fragmentas išpjaunamas iš gelio. Gryninama naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ rinkinį pagal gamintojo pateikiamą protokolą.

DNR ligavimas

Ligavimui ruošiamas mišinys, kurį sudaro:

- liguojamo geno fragmentas;
- linearizuotas vektorius;
- 5 kartus koncentruotas ligavimo reakcijos buferis;
- T4 DNR ligazė (1 vnt.);
- sterilus dejonizuotas vanduo.

Mišinys laikomas 22 °C temperatūroje 5 minutes. Ligazė inaktyvuojama 65 °C temperatūroje 10 minučių. Ligavimo mišinys naudojamas transformacijai į kompetentines ląsteles.

Kompetentinių *E.coli* ląstelių paruošimas:

1. Viena *E.coli* ląstelių kolonija iš lėkštelės užsėjama į 10 ml LB terpės ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 16 valandų.
2. Į kolbą, su 250 ml LB terpės perkeliama 2,5 ml pradinės kultūros. Inkubuojama 37 °C temperatūroje purtant 250 aps./min greičiu, tol kol ląstelių tirpalo optinis tankis ($\lambda = 600 \text{ nm}$) pasiekia apie 0,55.
3. Kolba perkeliama į ledo vonią, inkubuojama 10 minučių.
4. Ląstelių kultūra centrifuguojama 6000 aps./min greičiu 4 °C temperatūroje 10 minučių.
5. Terpė nupilama, apversta kolba statoma ant popierinio rankšluosčio ir laikoma apie 2 minutes, kad nubėgtų terpės likučiai.
6. Ląstelės atsargiai suspenduojamos 80 ml šalto transformacijos buferio.
7. Pakartojami 4 – 5 etapai.
8. Ląstelės atsargiai suspenduojamos 20 ml šalto transformacijos buferio.
9. Pridedama 1,5 ml DMSO. Pamašoma ir 10 minučių laikoma ledų vonioje.
10. Kompetentinės ląstelės greitai išpilstomos į atšaldytus ependorfinius mėgintuvėlius po 200 μl ir užšaldomos skystame azote. Toliau laikomos -80 °C temperatūroje.

Kompetentinių *E.coli* ląstelių transformacija:

- Paruoštos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe ir ampicilinu pašildomos 37 °C temperatūroje.
- Į 50 µl kompetentinių ląstelių įdedama 3 µl ligavimo mišinio ir laikoma ledo vonioje 30 minučių.
- Ląstelėms vykdomas temperatūrinis šokas: 90 sekundžių laikoma 42 °C temperatūroje, tada mišinys perkeliamas atgal į ledo vonią 2 minutėms.
- Į mišinį įpilama 400 µl skystos SOC terpės ir ląstelės laikomos termostatuojamoje purtyklėje 37 °C temperatūroje 30 minučių, 130 aps./min.
- Ląstelės centrifuguojamos 2 minutes 6000 aps./min, terpė nupilama, o likutis suspenduojamas ir užsėjamas ant pašildytos Petri lėkštelės. Auginama 37 °C temperatūros termostate per naktį.

Plazmidinės DNR išskyrimas

Į 10 ml LB terpės su ampicilinu (galutinė koncentracija 100 µg/ml) užsėjama transformuota *E.coli* bakterijų XLI-blue kamieno kolonija. Auginama 37 °C temperatūroje per naktį, purtant 250 aps./min greičiu. Plazmidinė DNR gryninama naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį. Gryninama pagal gamintojo pateikiamą protokolą. DNR koncentracija nustatoma „NanoDrop“ spektrofotometru.

2.2.2. Baltymo raiška, tirpumo patikrinimas ir gryninimas

Baltymo raiška *E.coli* bakterijų BL21 (DE3) kamiene

1. Į LB terpę su ampicilinu užsėjama viena kolonija iš Petri lėkštelės, kurioje buvo užsėtos transformuotos ląstelės. Per naktį auginama termostatuojamoje purtyklėje 37 °C temperatūroje 250 aps./min.
2. Ši kultūra persėjama į didesnę terpės su ampicilinu tūrį, skiedžiant santykiu 1:50. Auginama tokiomis pačiomis sąlygomis iki kol pasiekiamas 0,5 – 0,7 optinis tankis (600 nm bangos ilgyje).
3. Prieš indukciją paimamas 300 µl ląstelių suspensijos (su visais ląstelės baltymais) mėginys. Indukuojama pridedant 1mM IPTG. Toliau auginama tokiomis pačiomis sąlygomis 3 valandas.

4. Po 3 valandų imamas 300 µl mėginys. Bakterijų kultūra centrifuguojama 15 minučių 6000 aps./min greičiu, supernatantas nupilamas, biomasė saugoma -20 °C temperatūroje.
5. Mėginiai centrifuguojami 2 minutes 6000 aps./min greičiu. Supernatantas nusiurbiamas, nuosėdos tirpinamos 30 µl baltymų elektroforezės dažo (1X). Mėginiai pakaitinami 5 minutes 100 °C temperatūroje.
6. Mėginiai, paimti prieš ir po indukcijos, analizuojami NDS-PAAG elektroforezės būdu.

Baltymų elektroforezė NDS-PAAG

Ląstelės baltymai išskirstomi atliekant elektroforezę denatūruojančiomis sąlygomis. Ruošiamas gelis.

Apatinis skiriamasis 12 % gelis:

- Vanduo 1,585 ml;
- 30 % AA/BAA 2 ml;
- 1,5M Tris (pH=8,8) 1,25 ml;
- 10 % NDS 50 µl;
- 10 % APS 25 µl;
- TEMED 2,5 µl.

Viršutinis koncentruojamasis 4 % gelis:

- Vanduo 1,5 ml;
- 30 % AA/BAA 0,335 ml;
- 1,5M Tris (pH=6,8) 0,625 ml;
- 10 % NDS 25 µl;
- 10 % APS 12,5 µl;
- TEMED 2,5 µl.

Paruoštas apatinio skiriamojo gelio tirpalas pilamas į gelio formą ir atsargiai užsluoksniuojamas vandeniu. Paliekama polimerizuotis mažiausiai 40 minučių. Geliui sustingus, vanduo nupilamas, gelio paviršius nusausinamas filtriniu popieriumi. Užpilamas viršutinis koncentruojamasis gelis ir įstatomos „šukutės“. Paliekama polimerizuotis bent 30 minučių. Geliui sustingus, plokštelės su geliu statomos į elektroforezės aparatą, aparatas užpildomas baltymų elektroforezės buferiu, iš gelio išimamos „šukutės“. Į susidariusius gelio šulinėlius įpilami mėginiai. Elektroforezė vykdoma 50 mA srovėje, kol dažo frontas pasiekia skiriamojo gelio apačią. Gelis dažomas Kumasi dažu 20 minučių ir blukinamas verdančiame vandenyje 5 – 10 minučių.

Tirpių ir netirpių baltymų nustatymas

1. 0,25 g bakterijų biomasės homogenizuojama su 6 ml ardymo buferio.
2. Įpilama 60 µl 100 mM PMSF (galutinė koncentracija 1 mM) ir maišoma 4 °C temperatūroje 1 valandą.
3. Biomasė ardoma ultragarsu ledo vonelėje 10 minučių kas 60 sekundžių darant 60 sekundžių pertraukas esant 50 % amplitudei.
4. Lizatas centrifuguojamas 4 °C temperatūroje 20 minučių 20000 aps./min greičiu.
5. Supernatante esančių baltymų koncentracija matuojama Bredfordo metodu.
6. Nuosėdos tirpinamos 2 ml 8 M karbamido, matuojama baltymų koncentracija Bredfordo metodu.
7. Ruošiami mėginiai: imama po 30 µl tirpios ir netirpios baltymo frakcijos tirpalo, į juos pilama po 5 µl baltymų elektroforezės dažo (6X). Mėginiai pakaitinami 5 minutes 100 °C temperatūroje.
8. Mėginiai analizuojami NDS–PAAG elektroforezės būdu.

Baltymų gryninimas

Biomasė homogenizuojama su ardymo buferiu (25 mM Tris, 0,1 M NaCl, 50 mM imidazolo, pH=7,0). Įpilama 1 mM PMSF, maišoma 4 °C temperatūroje 1 valandą. Biomasė ardoma ultragarsu ledo vonelėje 13 minučių kas 60 sekundžių darant 60 sekundžių pertraukas esant 70 % amplitudei. Centrifuguojama 4 °C temperatūroje 20 minučių 20000 aps./min greičiu.

Supernatantas su ištirpusiu tiksliniu baltymu leidžiamas per IDA sefarozės chromatografijos kolonėlę (10 ml) su imobilizuotais Ni²⁺ jonais. Kolonėlės pusiausvyrinimui naudojamas 25 mM Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 M imidazolo buferinis tirpalas, kurio pH=7. Nuo kolonėlės baltymas desorbuojamas palaipsniui didinant imidazolo koncentraciją iki 0,5 M. Chromatografijos frakcijose esantys baltymai tikrinami NDS–PAAG elektroforezės būdu. Frakcijos, turinčios tikslinį baltymą, sujungiamos dializei. Baltymo tirpalas dializuojamas 4 °C temperatūroje per naktį naudojant 20 mM HEPES, 1 mM EDTA buferinį tirpalą, kurio pH=7,0.

Norint gauti grynesnį baltymą, baltymų tirpalas leidžiamas per jonų mainų chromatografinę kolonėlę, užpildytą DEAE sefaroze. Kolonėlės pusiausvyrinimui naudojamas 20 mM HEPES buferinis tirpalas, kurio pH=7,0. Baltymas nuo kolonėlės desorbuojamas palaipsniui didinant NaCl koncentraciją iki 1 M. Chromatografijos frakcijose esantys baltymai tikrinami NDS–PAAG elektroforezės būdu. Frakcijos, turinčios daugiausiai tikslinio baltymo, apjungiamos dializei. Baltymo tirpalas per naktį dializuojamas 20 mM HEPES

buferiniame tirpale, kurio pH=7,0. Ryte dializės buferis pakeičiamas į 20 mM HEPES buferinį tirpalą su 50 mM NaCl, pH=7. Dializuojama dar bent 2 valandas. Baltymo tirpalas steriliai nufiltruojamas ir išpilstomas, toliau laikomas -80 °C temperatūroje.

2.2.3. Baltymo jungimosi su slopikliais tyrimas

Terminio poslinkio metodo matavimai

Atskirai ruošiami baltymo ir ligando tirpalai.

Ligandas tirpinamas DMSO ir skiedžiamas iki norimos koncentracijos. DMSO koncentracija galutiniame tirpale (išpilsčius su baltymu) turi būti ne didesnė nei 2 %. Ruošiami 2 kartus koncentruoti 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM ir 0 µM ligando tirpalai, turintys 4 % DMSO.

Ruošiamas 2 kartus koncentruotas (20 µM) baltymo tirpalas fosfatiniame buferyje, turintis 100 µM ANS ir 100 µM NaCl.

Į plonasienius mėgintuvėlius supilstoma po 10 µl baltymo tirpalo ir po 10 µl tam tikros koncentracijos ligando tirpalo.

Matavimai atliekami realaus laiko PGR aparatu „Rotor-Gene 6000 (QIAGEN Rotor-Gene Q) spectrofluorimeter“ keliant temperatūrą 1 °C per minutę greičiu nuo 25 °C iki 99 °C. 365 ± 5 nm UV šviesa naudojama mėginių sužaditimui, ANS fluorescencijos emisija registruojama esant 460 ± 5 nm bangos ilgiui.

Izoterminio titravimo kalorimetrijos matavimai

Ruošiama 2,5 ml baltymo ir 1 ml ligando tirpalo.

Naudojamas baltymo ir ligando koncentracijų santykis 1:10. Baltymo koncentracija – 5 µM. Baltymo ir ligando tirpalus sudaro vienodos pagalbinių medžiagų koncentracijos – 50 mM fosfatinio buferio (pH nuo 6,5 iki 8,0), 100 mM NaCl, 2 % DMSO.

Eksperimentas atliekamas MicroCal VP-ITC kalorimetru. Paruoštu baltymo tirpalu užpildoma kiuvetė, ligando tirpalu – švirkštas. Švirkštas įstatomas į kiuvetę. Eksperimentas atliekamas 37 °C temperatūroje, maišymo greitis – 260 aps./min, suleidžiamos 28 injekcijos, vienos injekcijos tūris – 10 µl, injekcijos suleidžiamos kas 200 sekundžių.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Klonavimas

Sukonstruoti du Hsp90 α N-galo domeno mutanto be aktyvaus centro dangčio konstruktai:

1. pET15b-6xHis-Hsp90 α N(lidless);
2. pET21b-Hsp90 α N(lidless)-6xHis.

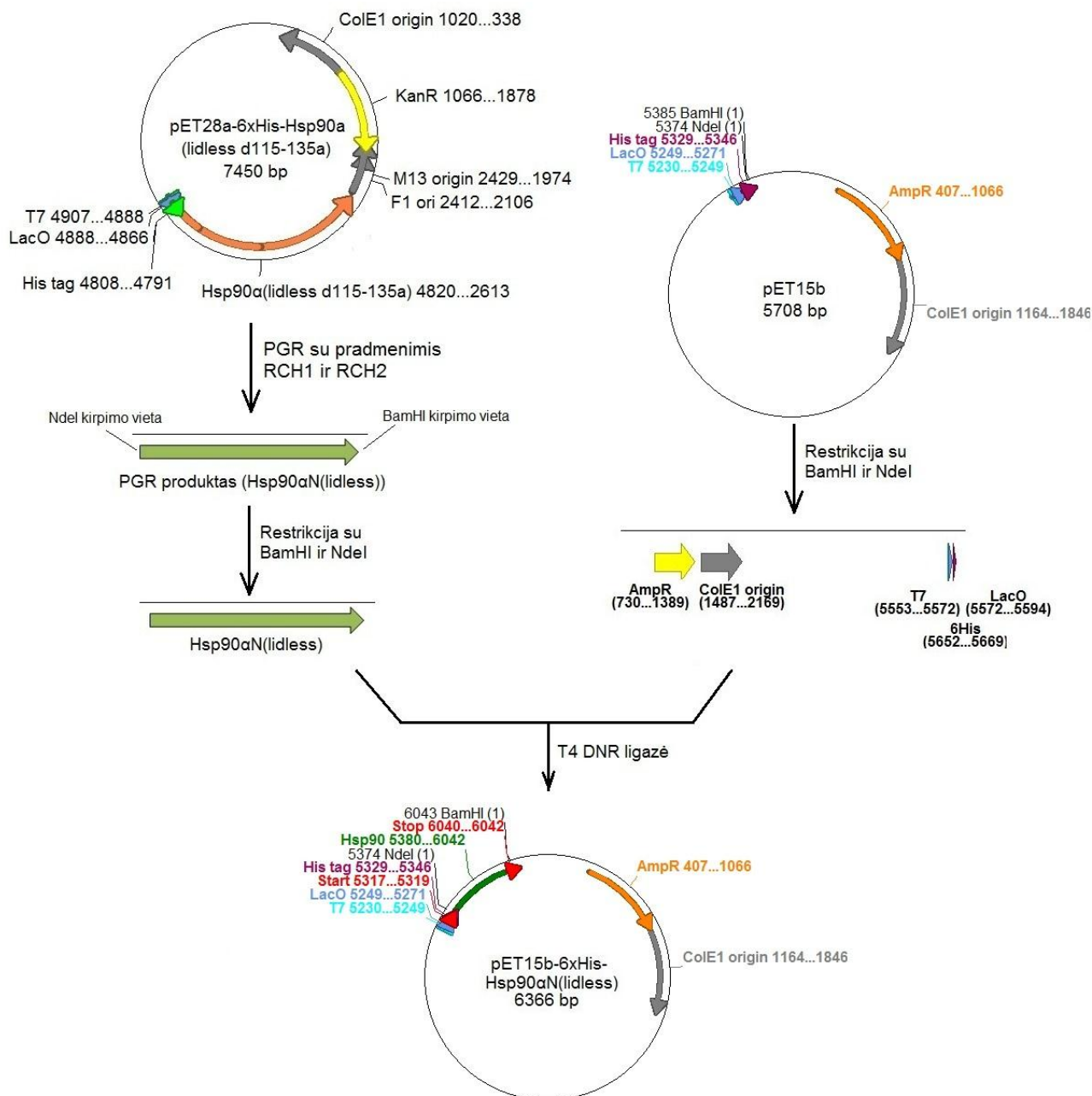
Konstruktai skiriasi tik šešių histidinių uodegėlės, reikalingos gryninimui, vieta baltyme. Pirmuoju atveju histidino uodegėlė yra baltymo N-gale, antruoju – C-gale. Abiejų konstrukty sekose, lyginant su pilno Hsp90 α baltymo seka (P07900 UniProtKB duomenų bazėje), trūksta nuo 115 iki 135 aminorūgštis, o 114-ta aminorūgštis treoninas pakeistas serinu (3.1 pav.)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
P07900	MPEETQTQDQPHEEEVETFAFQAEIAQLHSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDPKLSGSKELHINLPNKQDRTLTIYDTGIGTKADLINNLGTI													
6xHis-Hsp90 α N(lid)	MPEETQTQDQPHEEEVETFAFQAEIAQLHSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDPKLSGSKELHINLPNKQDRTLTIYDTGIGTKADLINNLGTI													
Hsp90 α N(lid)-6xHis	MPEETQTQDQPHEEEVETFAFQAEIAQLHSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDPKLSGSKELHINLPNKQDRTLTIYDTGIGTKADLINNLGTI													
Consensus	MPEETQTQDQPHEEEVETFAFQAEIAQLHSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDPKLSGSKELHINLPNKQDRTLTIYDTGIGTKADLINNLGTI													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
P07900	AKSGTKAFHEALQAGADISMIGQFVGIFYRAYLYAEKYVYITKHNDDQYAMSSAGGSFTVTRDTGEPHGRGTVKYLHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKSQFIGYPITLFEKERDKEYSDDEREEKED													
6xHis-Hsp90 α N(lid)	AKSGTKAFHEALQAGADISMIGQFVGIFYRAYLYAEKYVYITKHNDDQYAMSSAGGSFTVTRDTGEPHGRGTVKYLHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKSQFIGYPITLFEKERDKEYSDDEREEKED													
Hsp90 α N(lid)-6xHis	AKSGTKAFHEALQAGADISMIGQFVGIFYRAYLYAEKYVYITKHNDDQYAMSSAGGSFTVTRDTGEPHGRGTVKYLHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKSQFIGYPITLFEKERDKEYSDDEREEKED													
Consensus	AKSGTKAFHEALQAGADISMIGQFVGIFYRAYLYAEKYVYITKHNDDQYAMSSAGGSFTVTRDTGEPHGRGTVKYLHLKEDQTEYLEERRIKEIVKKSQFIGYPITLFEKERDKEYSDDEREEKED													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
P07900	KEEKEKEKEESEDKPEIEDYGSDEEEKKDGGKKKKKKIKEYIDQEELNKTPIINTRNPDDITWEEYGEFYKSLTNDWEDHLAYKHFVSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLFENRKKKNNIKLYRRVFI													
6xHis-Hsp90 α N(lid)	KEEKEKEKEESEDKPEIEDYGSDEEEKKDGGKKKKKKIKEYIDQEELNKTPIINTRNPDDITWEEYGEFYKSLTNDWEDHLAYKHFVSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLFENRKKKNNIKLYRRVFI													
Hsp90 α N(lid)-6xHis	KEEKEKEKEESEDKPEIEDYGSDEEEKKDGGKKKKKKIKEYIDQEELNKTPIINTRNPDDITWEEYGEFYKSLTNDWEDHLAYKHFVSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLFENRKKKNNIKLYRRVFI													
Consensus	KEEKEKEKEESEDKPEIEDYGSDEEEKKDGGKKKKKKIKEYIDQEELNKTPIINTRNPDDITWEEYGEFYKSLTNDWEDHLAYKHFVSVEGQLEFRALLFVPRRAPFDLFENRKKKNNIKLYRRVFI													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
P07900	MNCCEELIPEYLNFIKGVVDSDELPLNISREHLQQSKILKVRKNLVKKCLELFTLAEADKENYKKFYEQFSKNIKLGIHEDSQNRKKLSELLRYTTSASGDEHVSLLKDYCTRHNENQKHYYITGETKD													
6xHis-Hsp90 α N(lid)	MNCCEELIPEYLNFIKGVVDSDELPLNISREHLQQSKILKVRKNLVKKCLELFTLAEADKENYKKFYEQFSKNIKLGIHEDSQNRKKLSELLRYTTSASGDEHVSLLKDYCTRHNENQKHYYITGETKD													
Hsp90 α N(lid)-6xHis	MNCCEELIPEYLNFIKGVVDSDELPLNISREHLQQSKILKVRKNLVKKCLELFTLAEADKENYKKFYEQFSKNIKLGIHEDSQNRKKLSELLRYTTSASGDEHVSLLKDYCTRHNENQKHYYITGETKD													
Consensus	MNCCEELIPEYLNFIKGVVDSDELPLNISREHLQQSKILKVRKNLVKKCLELFTLAEADKENYKKFYEQFSKNIKLGIHEDSQNRKKLSELLRYTTSASGDEHVSLLKDYCTRHNENQKHYYITGETKD													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
P07900	QVANSAFYERLRKHGLEVIYMIETIDEYCVQLKEFGKTLVSYTKEGLEPEDEEEKKKQEEKTKFENLCKIMKDILEKKVEKYVVSNNRLVTSPPCCISTYTGHTANMERINAKALRDNSTHGYHAA													
6xHis-Hsp90 α N(lid)	QVANSAFYERLRKHGLEVIYMIETIDEYCVQLKEFGKTLVSYTKEGLEPEDEEEKKKQEEKTKFENLCKIMKDILEKKVEKYVVSNNRLVTSPPCCISTYTGHTANMERINAKALRDNSTHGYHAA													
Hsp90 α N(lid)-6xHis	QVANSAFYERLRKHGLEVIYMIETIDEYCVQLKEFGKTLVSYTKEGLEPEDEEEKKKQEEKTKFENLCKIMKDILEKKVEKYVVSNNRLVTSPPCCISTYTGHTANMERINAKALRDNSTHGYHAA													
Consensus	QVANSAFYERLRKHGLEVIYMIETIDEYCVQLKEFGKTLVSYTKEGLEPEDEEEKKKQEEKTKFENLCKIMKDILEKKVEKYVVSNNRLVTSPPCCISTYTGHTANMERINAKALRDNSTHGYHAA													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	762		
P07900	KKHLEINPDHSIIETLRQKAERADKDKSVKDLVILLYETALLSSGFSEDPQTHANRIYRNILGLGIDEODPTADDTSAHYTEEMPLEGGDDTSRMEVD													
6xHis-Hsp90 α N(lid)	KKHLEINPDHSIIETLRQKAERADKDKSVKDLVILLYETALLSSGFSEDPQTHANRIYRNILGLGIDEODPTADDTSAHYTEEMPLEGGDDTSRMEVD													
Hsp90 α N(lid)-6xHis	KKHLEINPDHSIIETLRQKAERADKDKSVKDLVILLYETALLSSGFSEDPQTHANRIYRNILGLGIDEODPTADDTSAHYTEEMPLEGGDDTSRMEVD													
Consensus	KKHLEINPDHSIIETLRQKAERADKDKSVKDLVILLYETALLSSGFSEDPQTHANRIYRNILGLGIDEODPTADDTSAHYTEEMPLEGGDDTSRMEVD													

3.1 pav. Hsp90 α , 6xHis-Hsp90 α N(lidless) ir Hsp90 α N(lidless)-6xHis sekų palyginimas. Raudonai pažymėtos sutampančios aminorūgštys.

3.1.1. pET15b-6xHis-Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio klonavimas

Principinė pET15b-6xHis-Hsp90α be aktyvaus centro dangčio N-galo domeno klonavimo schema pateikta 3.2 pav.



3.2 pav. pET15b-6x-His-Hsp90α be aktyvaus centro dangčio N-galo domeno klonavimo principinė schema.

Polimerazės grandininės reakcijos metodu padaugintas Hsp90α N-galo domenas be aktyvaus centro dangčio, kartu įterpiant restrikcijos endonukleazių BamHI ir NdeI kirpimo sekas galuose. Naudojami RCH1 ir RCH2 pradmenys (sekos pateiktos 2.1.2. skyrelyje) ir

plazmidė pET28a-6xHis-Hsp90 α (lidless d115-135a.). Polimerazės grandininės reakcijos programa aprašyta 2.2.1. skyrelyje.

Leidžiant elektroforezę agaroziniame gelyje patikrinta, ar pavyko padauginti norimą fragmentą. Po elektroforezės padaugintas DNR fragmentas išgrynintas naudojant GeneJET™ PCR Purification Kit rinkinį.

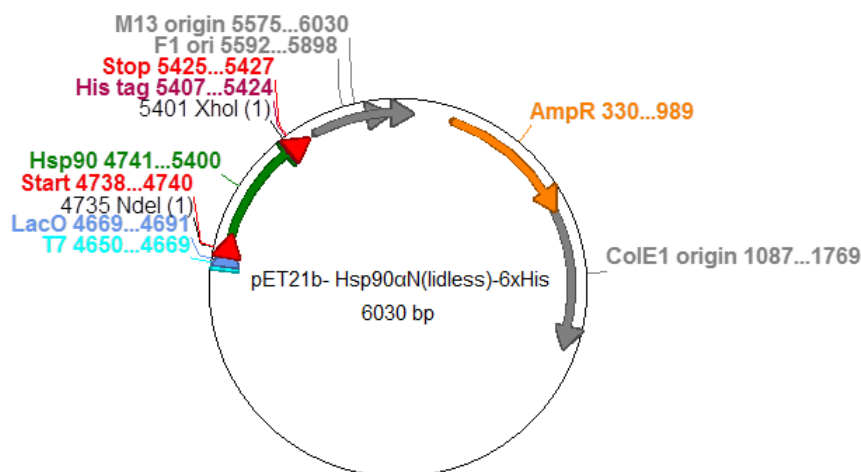
DNR, gauta po PGR, karpyta BamHI ir NdeI restrikcijos endonukleazėmis. Tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis karpytas ir pET15b vektorius, kuris turi atsparumo ampicilinui geną (AmpR) ir IPTG indukuojamą raiškos operatorių lacO. Po restrikcijos mėginiai buvo frakcionuoti agaroziniame gelyje, reikiami fragmentai iškirpti iš gelio ir išgryninti naudojant GeneJET™ Gel Extraction Kit.

Hsp90 α N(lidless) genas suklonuotas į pET15b plazmidę naudojant T4 DNR ligazę. Liguota 5 min 22 °C temperatūroje. Kompetentinės *E.coli* XLI-blue ląstelės transformuotos ligacijos mišiniu ir išsėtos ant lėkštelės su agarizuota LB terpe ir ampicilinu (100 μ g/ml). Lėkštelė laikyta termostate 37 °C temperatūroje per naktį.

DNR išskyrimui kelios kolonijos iš lėkštelės perkeltos į nedidelius kiekius LB terpės. Plazmidės DNR išskirta naudojant GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit. Išskirta DNR patikrinta karpant restrikcijos endonukleazėmis BamHI ir NdeI. Tikslinio geno seka patikrinta BTI „Sekvenavimo centre“.

3.1.2. pET21b-Hsp90 α N-6xHis be aktyvaus centro dangčio klonavimas

pET21b-Hsp90 α -6xHis be aktyvaus centro dangčio N-galo domeno klonavimo eiga analogiška 3.1.1. skyriuje pateiktai eigai. Naudoti RCH1 ir RCH16 pradmenys, pET21b vektorius, NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazės. Principinė konstrukto schema pateikta 3.3 pav.



3.3 pav. pET21b- Hsp90 α -6xHis be aktyvaus centro dangčio N-galo domeno konstrukto principinė schema.

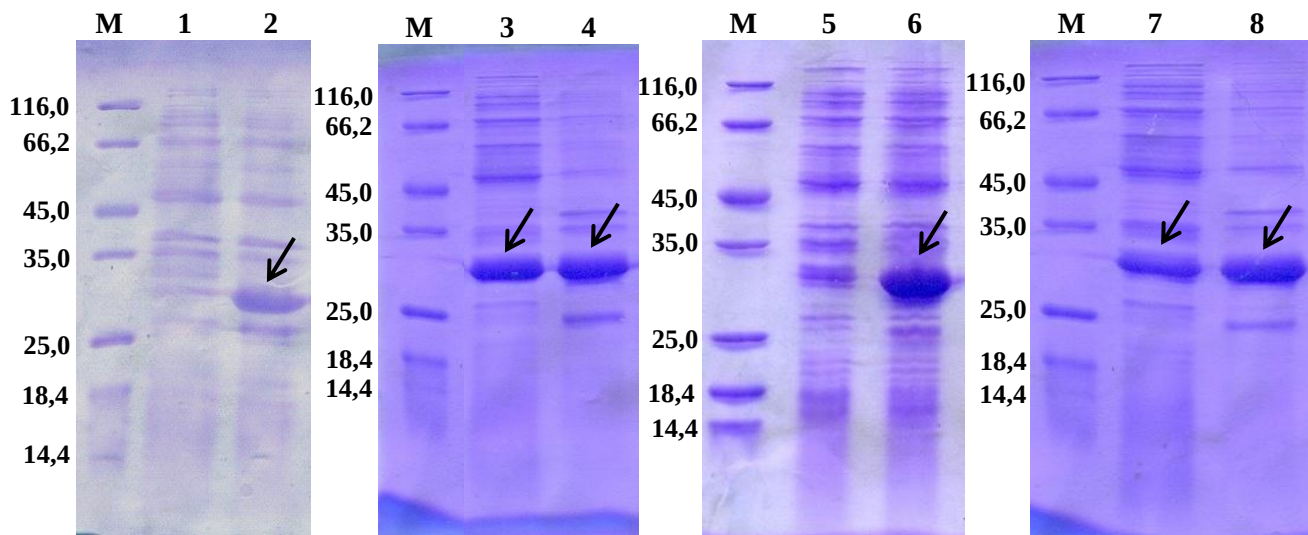
3.2. Baltymų raiškos ir tirpumo patikrinimas

Naudojantis Šveicarijos Bioinformatikos instituto internetiniame puslapyje pateikta programa „ProtParam“ apskaičiuotos baltymų molekulinės masės, teoriniai izoelektriniai taškai (pI) ir ekstinkcijos koeficientai. Duomenys pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Įvairūs baltymų Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio parametrai.

Baltymas	Molekulinė masė, kDa	Teorinis pI	Ekstinkcijos koeficientas, M ⁻¹ cm ⁻¹
6xHis-Hsp90αN(lidless)	27,28	5,05	15930
Hsp90αN(lidless)-6xHis	26,19	4,89	15930

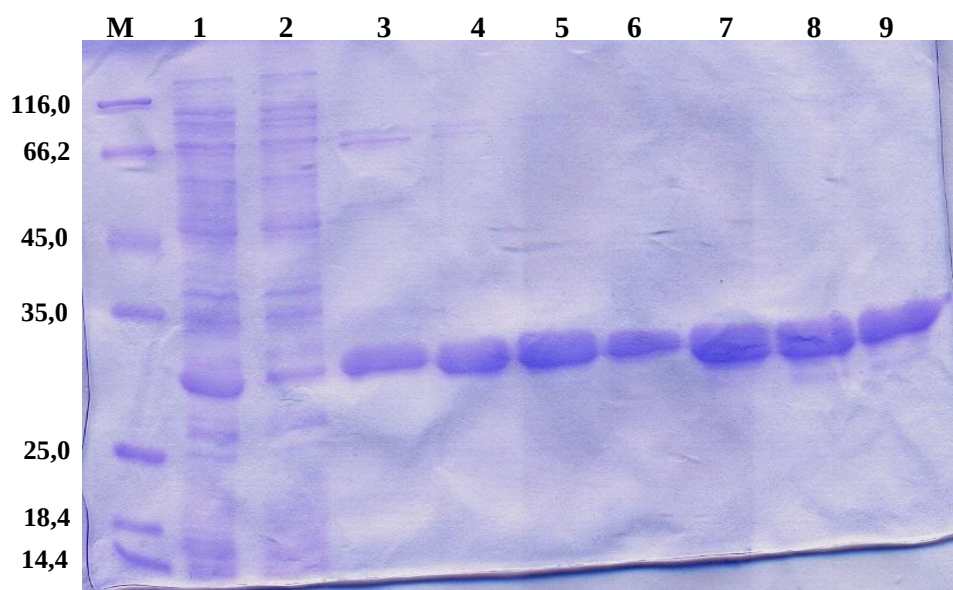
DNR plazmidės buvo transformuotos į kompetentines *E.coli* BL21 (DE3) ląsteles, patikrinta baltymų raiška ir tirpumas (3.4 pav.). Iki indukcijos ląstelės buvo auginamos 37 °C. Pasiekus 0,5 – 0,7 optinį tankį ($\lambda = 600$ nm) pridėta IPTG (galutinė koncentracija terpėje – 0,1 mM). Toliau auginama 37 °C temperatūroje 3 valandas. Prieš indukciją ir praėjus 3 valandoms po indukcijos paimti mėginiai, kurie analizuojami NDS–PAAG. Baltymų tirpumo patikrinimo metodas aprašytas 2.2.2. skyrelyje.



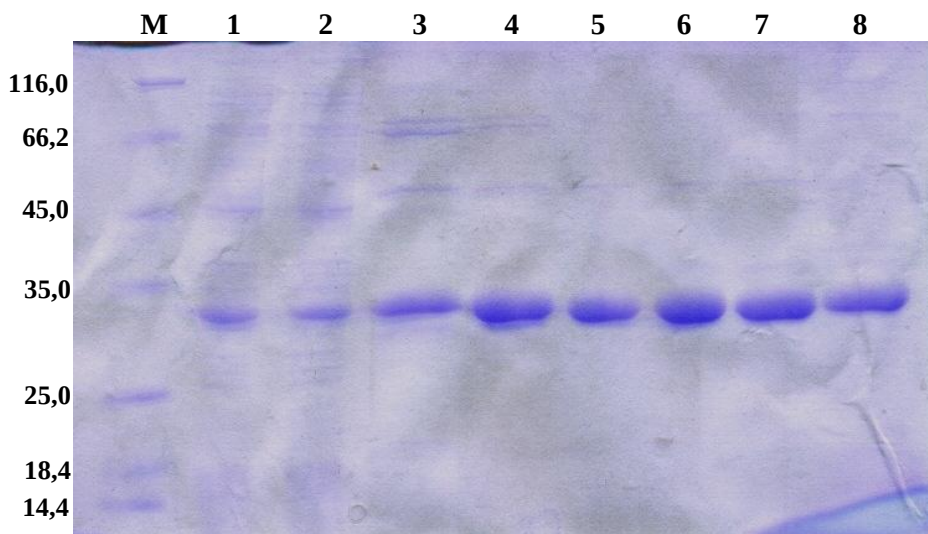
3.4 pav. Hsp90αN(lidless)-6xHis ir 6xHis-Hsp90αN(lidless) baltymų raiškos ir tirpumo patikrinimas. M – baltymų dydžių standartas; 1, 2 – mėginiai prieš ir po indukcijos (rodykle pažymėtas 26 kDa Hsp90αN(lidless)-6xHis); 3, 4 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (rodykle pažymėtas tirpus ir netirpus 26 kDa Hsp90αN(lidless)-6xHis); 5, 6 – mėginiai prieš ir po indukcijos (rodykle pažymėtas 27 kDa 6xHis-Hsp90αN(lidless)); 7, 8 – tirpių ir netirpių baltymų frakcijos (rodykle pažymėtas tirpus ir netirpus 27 kDa 6xHis-Hsp90αN(lidless)).

3.3. Baltymų gryninimas

Užauginti didesni kiekiai biomasės (7,3 g Hsp90αN(lidless)-6xHis ir 5,67 g 6xHis-Hsp90αN(lidless)) suardyti ultragarsu. Baltymai gryninti naudojant metalochelatinę chromatografinę kolonėlę. Chromatografijoje vyksta sąveika tarp sorbento ligando su imobilizuotais Ni^{+2} jonais ir baltymo šešių histidinių uodegėle susidarant koordinaciniams ryšiams. Nuo kolonėlės baltymai desorbuojami palaipsniui didinant imidazolo koncentraciją nuo 0,05 M iki 0,5 M. Imidazolas pakeičia baltymo šešių histidinių uodegėlę koordinaciniuose ryšiuose su Ni^{+2} jonais ir taip išlaisvina baltymą. Baltymo frakcijos analizuojamos NDS–PAAG (3.5 ir 3.6 pav.).

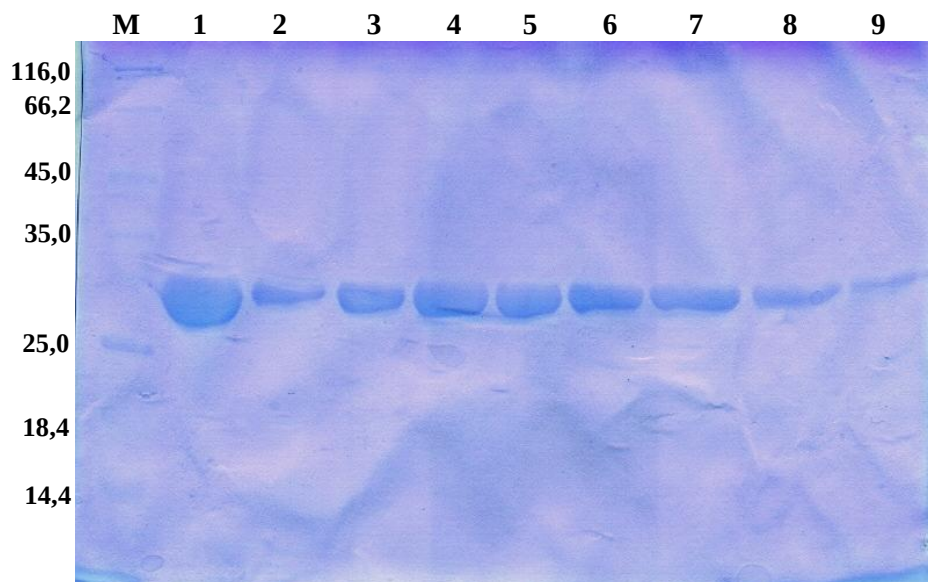


3.5 pav. Hsp90αN(lidless)-6xHis (26 kDa) gryninimo metalochelatinės chromatografijos metodu rezultatai. M – baltymų dydžių standartas; 1 – Hsp90αN(lidless)-6xHis prieš gryninimą; 2 – nesisorbavusi baltymo frakcija; 3 – 9 – frakcijos su tiksliniu baltymu po gryninimo.



3.6 pav. 6xHis-Hsp90αN(lidless) (27kDa) gryninimo metalochelatinės chromatografijos metodu rezultatai. M – baltymų dydžių standartas; 1 – 6xHis-Hsp90αN(lidless) prieš gryninimą; 2 – nesisorbavusi baltymo frakcija; 3 – 8 – frakcijos su tiksliniu baltymu po gryninimo.

Norint gauti švaresnį baltymą, 6xHis-Hsp90αN(lidless) papildomai grynintas naudojant jonų mainų chromatografinę kolonėlę. Baltymas nuo kolonėlės desorbuojamas palaipsniui didinant NaCl koncentraciją nuo 0 M iki 1M. Gautos baltymo frakcijos analizuojamos NDS–PAAG (3.7 pav.)



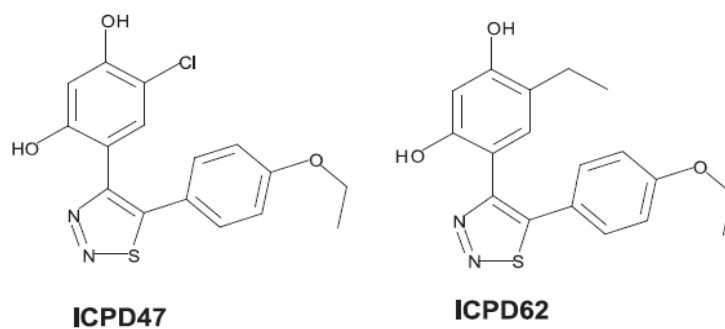
3.7 pav. Hsp90αN(lidless)-6xHis (26 kDa) gryninimo jonų mainų chromatografijos metu rezultatai. M – baltymų dydžių standartas; 1 - Hsp90αN(lidless)-6xHis prieš antrą gryninimą; 2 – 9 – frakcijos su tiksliniu baltymu po gryninimo.

Po gryninimų daugiausiai tikslinio baltymo turinčios frakcijos (3 – 5 Hsp90αN(lidless)-6xHis frakcijos ir 4 – 7 6xHis-Hsp90αN(lidless) frakcijos) apjungtos dializei. Po dializės baltymai buvo nufiltruoti, steriliai išpilstyti nedideliais kiekiais ir laikomi -80 °C temperatūroje.

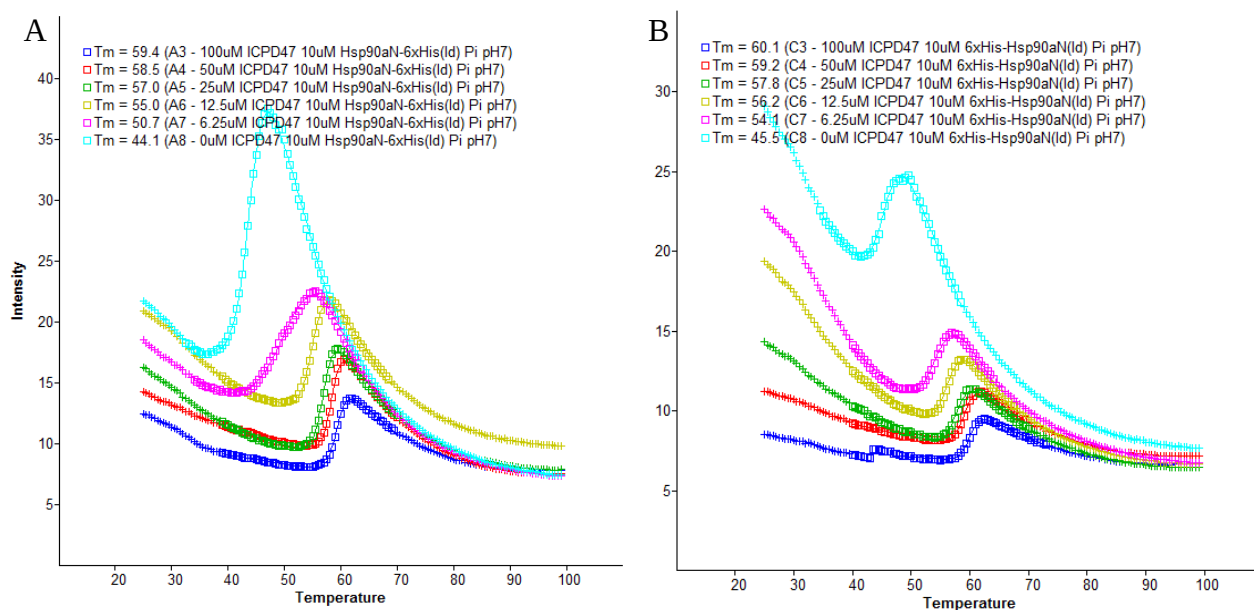
Išgrynintų baltymų mases masių spektrometru patikrino dr. Vytautas Smirnovas. Nustatytos baltymų masės sutampa su teorinėmis.

3.4. Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi su slopikliais matavimas terminio poslinkio metodu

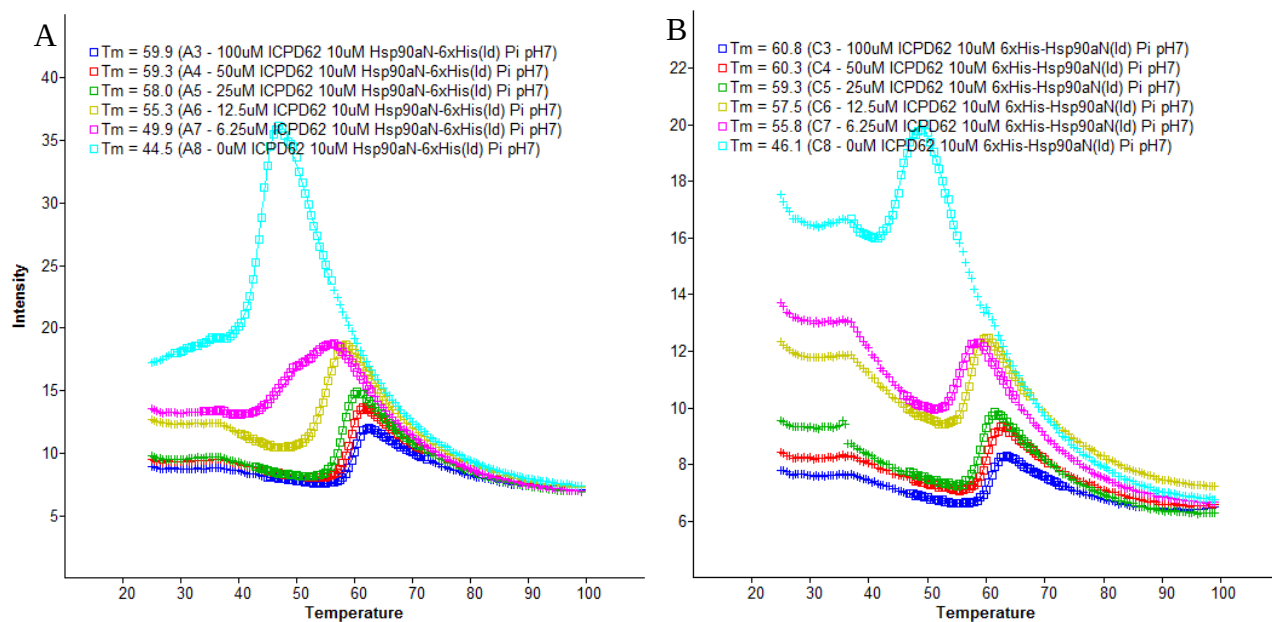
Buvo išmatuotas Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimasis su slopikliais terminio poslinkio metodu. Pirmiausiai buvo atlikti matavimai su sintetiniais slopikliais ICPD47 ir ICPD62 (slopikliai susintetinti Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje (Čikotienė et al., 2009), 3.8 pav.) fosfatiniame buferyje, tam, kad išsiaiškintume, kokią įtaką jungimuisi turi histidino uodegėlės vieta baltyme (3.9 - 3.12 pav.).



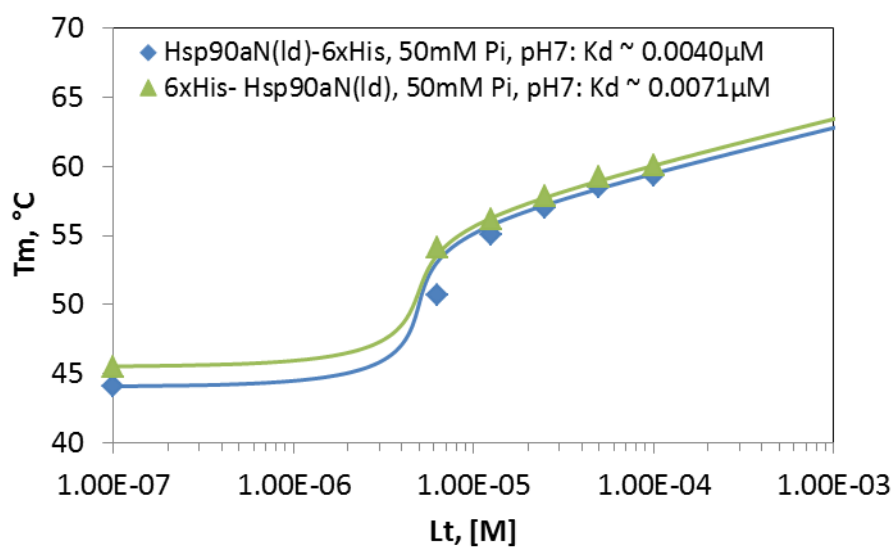
3.8 pav. Slopiklių ICPD47 ir ICPD62 struktūros (Kazlauskas et al., 2012)



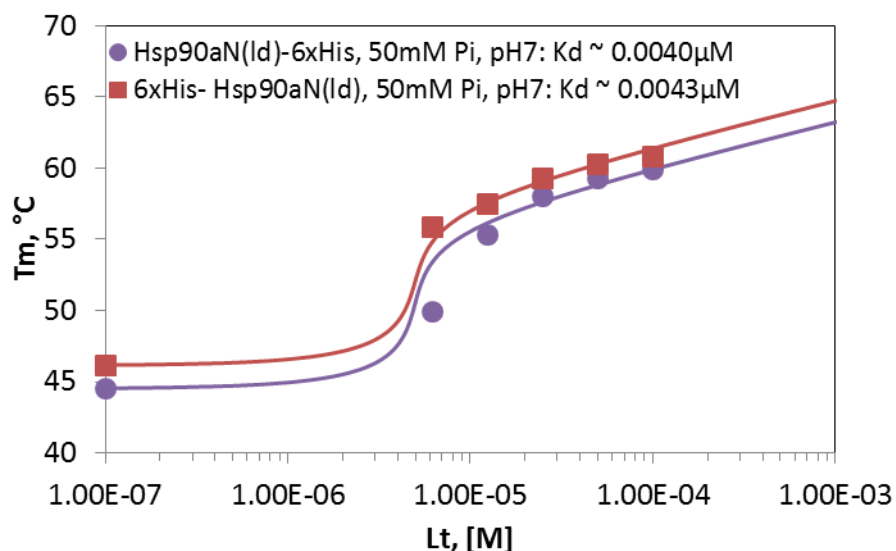
3.9 pav. A – Fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas, esant skirtingoms ICPD47 koncentracijoms, kai Hsp90αN(lidless)-6xHis koncentracija pastovi, fosfatinio buferio pH=7; B – Fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas, esant skirtingoms ICPD47 koncentracijoms, kai 6xHis-Hsp90αN(lidless) koncentracija pastovi, fosfatinio buferio pH=7.



3.10 pav. A – Fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas, esant skirtingoms ICPD62 koncentracijoms, kai Hsp90aN(lidless)-6xHis koncentracija pastovi, fosfatinio buferio pH=7; B – Fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas, esant skirtingoms ICPD62 koncentracijoms, kai 6xHis-Hsp90aN(lidless) koncentracija pastovi, fosfatinio buferio pH=7.



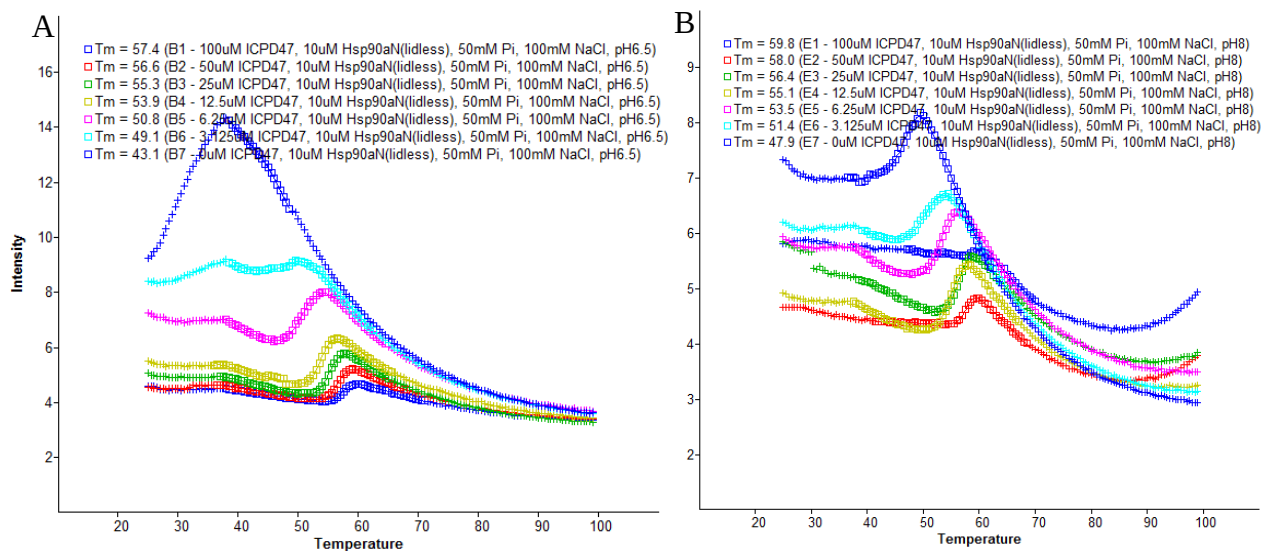
3.11 pav. Hsp90aN(lidless)-6xHis ir 6xHis- Hsp90aN(lidless) T_m priklausomybė nuo ICPD47 koncentracijos 37 °C temperatūroje.



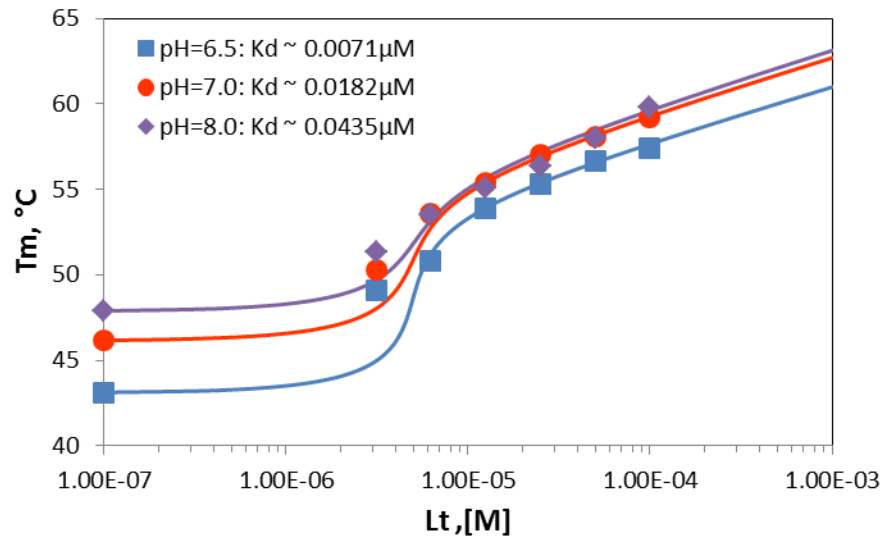
3.12 pav. Hsp90aN(lidless)-6xHis ir 6xHis- Hsp90aN(lidless) T_m priklausomybė nuo ICPD62 koncentracijos 37 °C temperatūroje.

Matome, kad abiejų baltymų jungimosi konstantos panašios (su ICPD47 – 0,0040 μM ir 0,0071 μM ; su ICPD62 – 0,0040 μM ir 0,0043 μM), todėl galima spręsti, kad histidino uodegėlės vieta baltyme jungimuisi su slopikliu įtakos neturi.

Tolimesniems matavimams pasirinktas baltymas, su histidino uodegėle baltymo N-gale ir ICPD47 slopiklis. Atlikti matavimai su slopikliu 50 mM fosfatiname buferyje keičiant pH vertes kas 0,5 intervale nuo 6,5 iki 8,0 (3.13 – 3.14 pav.).



3.13 pav. A – Fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas, esant skirtingoms ICPD47 koncentracijoms, kai 6xHis-Hsp90aN(lidless) koncentracija pastovi, fosfatinio buferio pH=6,5; B – Fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas, esant skirtingoms ICPD47 koncentracijoms, kai 6xHis-Hsp90aN(lidless) koncentracija pastovi, fosfatinio buferio pH=8.



3.14 pav. 6xHis- Hsp90αN(lidless) T_m priklausomybė nuo ICPD47 koncentracijos 37 °C temperatūroje, esant skirtingoms pH reikšmėms.

Matome, kad jungiantis baltymui ir ligandui, baltymas stabilizuojamas. Iš gautų kreivių nustatytos jungimosi konstantos, iš jų, naudojantis formule $\Delta_b G = -RT \ln K_b$, apskaičiuota laisvoji Gibso energija, kai baltymo išsivyniojimo entalpija (iš eksperimentinių duomenų) 540,32 kJ/mol (3.2 lentelė).

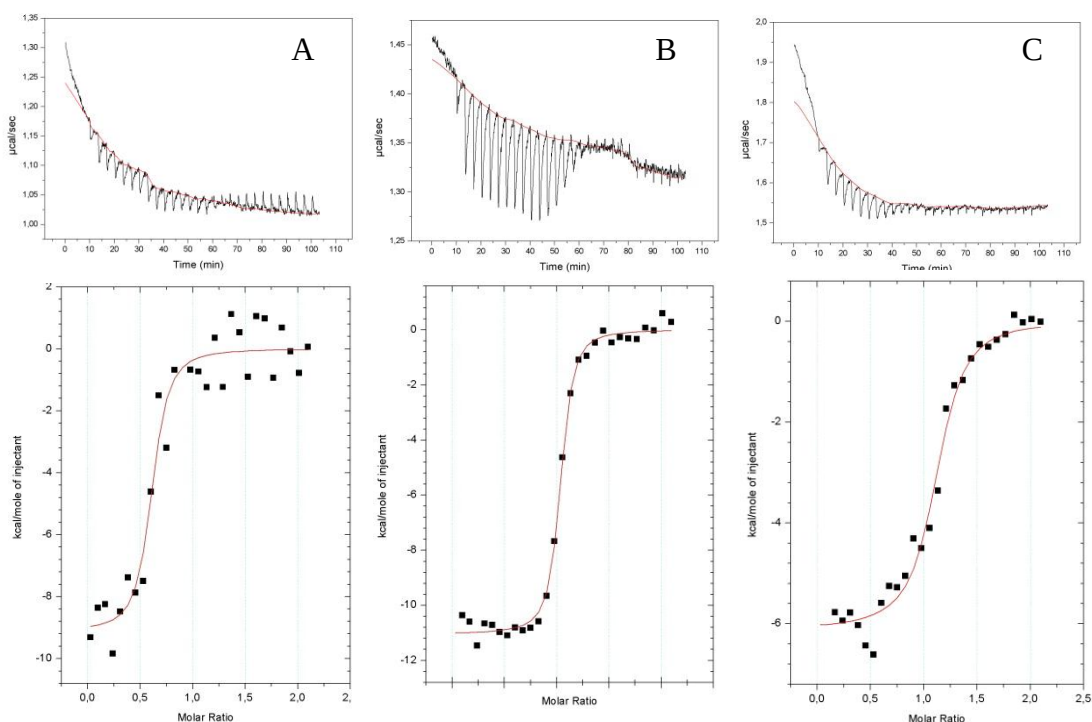
3.2 lentelė. 6xHis-Hsp90αN(lidless) jungimosi su ICPD47 esant skirtingoms pH reikšmėms terminio poslinkio metodu gauti parametrai

pH	$K_{b\text{-steb}}, M^{-1}$	K_d, nM	$\Delta_{b\text{-steb}}G, kJ/mol$
6,5	$1,4 \cdot 10^8$	7,14	-48,37
7,0	$5,5 \cdot 10^7$	18,2	-45,98
7,5	$7,0 \cdot 10^7$	14,3	-46,57
8,0	$2,3 \cdot 10^7$	43,5	-43,72

Iš šių duomenų matome, kad baltymas su slopikliu stipriausiai jungiasi, kai pH=6,5 – jungimosi konstanta $K_{b\text{-steb}} = 1,4 \cdot 10^8 M^{-1}$, $\Delta_{b\text{-steb}}G = -48,37 kJ/mol$; silpniausiai, kai pH=8,0 – $K_{b\text{-steb}} = 2,3 \cdot 10^7 M^{-1}$, $\Delta_{b\text{-steb}}G = -43,72 kJ/mol$.

3.5 Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimasis su slopikliu tyrimas izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu

Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi su ICPD47 slopikliu metu išsiskyrusi šiluma buvo išmatuota izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu. Jungimasis matuotas 50 mM fosfatiname buferiniame tirpale, pH vertėms kintant kas 0,5 intervale nuo 6,5 iki 8 (3.15 pav), esant 37 °C temperatūrai.



3.15 pav. Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi su ICPD47 fosfatiname buferiniame tirpale kreivės, gautos ITC metodu. A – duomenys gauti, kai pH=6,5; B – pH=7,0; C – pH=8,0. Viršuje patekti pirminiai duomenys, apačioje - integruoti duomenys.

Baltymo jungimosi su slopikliu parametrai pateikti 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi su ICPD47 fosfatiname buferiniame tirpale esant skirtingoms pH vertėms 37 °C temperatūroje ITC metodu gauti parametrai.

pH	K_{b-steb}, M^{-1}	K_d, nM	$\Delta H, kJ/mol$
6,5	$1,845 \cdot 10^7$	54,2	-38,19
7,0	$4,91 \cdot 10^6$	203,7	-46,15
7,5	$1,59 \cdot 10^7$	62,9	-34,44
8,0	$1,04 \cdot 10^7$	95,2	-25,56

Iš gautų duomenų matome, kad baltymas su slopikliu stipriausiai jungiasi, kai pH=6,5 – $K_{b-steb}=1,845 \cdot 10^7 M^{-1}$; silpniausiai, kai pH=7,0 – $K_{b-steb}=4,91 \cdot 10^6 M^{-1}$. Terminio poslinkio ir ITC metodais nustatytos jungimosi konstantos palygintos 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. Jungimosi konstantų, nustatytų teminio poslinkio ir izoterminio titravimo kalorimetrijos metodais, palyginimas

pH	K_{b-steb} , M ⁻¹	
	Terminio poslinkio metodas	Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas
6,5	$1,4 \cdot 10^8$	$1,845 \cdot 10^7$
7,0	$5,5 \cdot 10^7$	$4,91 \cdot 10^6$
7,5	$7,0 \cdot 10^7$	$1,59 \cdot 10^7$
8,0	$2,3 \cdot 10^7$	$1,04 \cdot 10^7$

Matome, kad jungimosi konstantos skiriasi. Tam, kad įvertintume, kurios konstantos patikimesnės, skaičiuojame $c = nM_t K_b$ faktorių (aprašyta 1.6 skyriuje). ITK metodu nustatytos jungimosi konstantos nebepatenka į intervalą tarp 5 ir 500. Todėl patikimesnėmis laikome terminio poslinkio metodu nustatytas jungimosi konstantas.

3.6. Hsp90αN ir Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi konstantų palyginimas

Išmatuotus jungimosi parametrus galima lyginti su Hsp90α N-galo domeno jungimosi parametrais (Kazlauskas et al., 2012), nustatytais izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu (3.5 lentelė).

3.5 lentelė. Hsp90αN ir Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi su ICPD47 gauti parametrai 37 °C temperatūroje. Nurodytos Hsp90αN(lidless) jungimosi konstantos gautos terminio poslinkio metodu, skliausteliuose – ITK metodu.

		Hsp90αN(lidless)	Hsp90αN
pH = 6,5	K_d , nM	7,14 (54,2)	4,13
	$\Delta_{b-steb}H$, kJ/mol	-38,19	-39,9
pH = 7,0	K_d , nM	18,2 (203,7)	6,80
	$\Delta_{b-steb}H$, kJ/mol	-46,15	-40,7
pH = 7,5	K_d , nM	14,3 (62,9)	6,17
	$\Delta_{b-steb}H$, kJ/mol	-34,44	-42,6
pH = 8,0	K_d , nM	43,5 (95,2)	14,5
	$\Delta_{b-steb}H$, kJ/mol	-25,56	-40,1

Matome, kad Hsp90αN ir Hsp90αN be aktyvaus centro dangčio jungimosi konstantos skiriasi 2 – 3 kartus. Remiantis šiais duomenimis galima teigti, kad aktyvaus centro dangtis turi nedidelę įtaką baltymo jungimuisi su slopikliu.

4. IŠVADOS

1. Sukonstruotos dvi plazmidės skirtos Hsp90 α N-galo domeno be molekulinio dangčio baltymo ekspresijai.
2. Išgryninti Hsp90 α N-galo domeno be molekulinio dangčio baltymai.
3. Terminio poslinkio ir izoterminio titravimo kalorimetrijos metodais nustatyta, kad Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio su ICPD47 slopikliu stipriausiai jungiasi esant pH = 6,5 (jungimosi konstanta $K_b = 1,4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$).
4. Palyginus Hsp90 α N be aktyvaus centro dangčio ir Hsp90 α N jungimosi konstantas galima teigti, kad aktyvaus centro dangtis turi nedidelę įtaką baltymo jungimuisi su slopikliu.

Cloning and Purification of Lidless Chaperone Hsp90 α N and the Measurements of Inhibitor Binding

SUMMARY

Molecular chaperone Hsp90 is a highly conserved protein that helps in maturation of a wide range of client proteins. There are two cytosolic Hsp90 isoforms – α and β . Under normal conditions Hsp90 constitutes around 1 – 2 % of all cellular proteins. However, in cancerous or stressed cells the amount of Hsp90 increases approximately 2 to 3 times. The energy of ATP binding and hydrolysis is used to fold client proteins. Various inhibitors can bind to ATP binding pocket and inhibit the function of Hsp90.

Lidless Hsp90 α N-terminal domain (amino acids 115 to 135 were deleted) was produced and binding with inhibitors was measured. Inhibitor ICP47 bound to lidless Hsp90 α N with highest affinity at pH 6.5 of the tested range of 6.5 – 8. Binding constants of native Hsp90 α N and lidless Hsp90 α N were compared and it was determined that the absence of lid had minor but detectable effect on the binding thermodynamic parameters.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Banerji U, O'Donnell A, Scurr M, Pacey S, Stapleton S, Asad Y, Simmons L, Maloney A, Raynaud F, Campbell M, Walton M, Lakhani S, Kaye S, Workman P, Judson I. Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin in Patients With Advanced Malignancies. *J Clin Oncol*. 2005; 23(18): 4152-61.
2. Baranauskienė L, Petrikaitė V, Matulienė J, Matulis D. Titration Calorimetry Standards and the Precision of Isothermal Titration Calorimetry Data. *Int J Mol Sci*. 2009; 10: 2752-62.
3. Chène P. ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1: 665-673.
4. Čikotienė I, Kazlauskas E, Matulienė J, Michailovienė V, Torresan J, Jachno J, Matulis D. 5-Aryl-4-(5-substituted-2,4-dihydroxyphenyl)-1,2,3-thiadiazoles as inhibitors of Hsp90 chaperone. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19 (4): 1089-92.
5. Cimmerman P, Baranauskienė L, Jachimovičiūtė S, Jachno J, Torresan J, Michailovienė V, Matulienė J, Sereikaitė J, Bumelis V, Matulis D. A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands. *Biophys J*. 2008; 95: 3222-31.
6. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G. The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacol. Ther.* 1998; 79 (2): 129-68.
7. Donnelly A, Blagg BSJ. Novobiocin and Additional Inhibitors of the Hsp90 C-Terminal Nucleotide-binding Pocket. *Curr Med Chem*. 2008; 15(26): 2702-17.
8. ExPASy ProtParam tool for computation of various physical and chemical parameters for a given protein [Interaktyvus] [Žiūrėta 2011 m. balandžio 1 d. ir rugsėjo 21d.]. Adresas: <http://web.expasy.org/protparam/>
9. Hahn JS. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep*. 2009; 42:623-30.
10. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011; 475: 324-32.
11. Young JC, Obermann WMJ, Hartl FU. Specific Binding of Tetrapeptide Repeat Proteins to the C-terminal 12-kDa Domain of hsp90. *J Biol Chem*. 1998; 273:18007-10.
12. Johnson JL, Brown C. Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress Chaperones*. 2009; 14: 83-94.

13. Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends Mol Med*. 2004; 10(6):283-90.
14. Kazlauskas E, Petrikaitė V, Michailovienė V, Revuckienė J, Matulienė J, Grinius L, Matulis D. Thermodynamics of Aryl-Dihydroxyphenyl-Thiadiazole Binding to Human Hsp90. *PLoS ONE*. 2012; 7(5): e36899.
15. Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1823:624-35.
16. Matulis D. Baltymų fizikinė chemija. Kaunas: Technologija, 2008. 149 p.
17. MultAlin: Multiple sequence alignment by Florence Corpet. [Interaktyvus] Atnaujinta 2000 m. kovo 28d. [Žiūrėta 2012 m. kovo 26d.]. Adresas: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
18. Nielsen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc*. 2007; 2(9): 2212-21.
19. Pearl LH, Prodromou C. Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. *Annu Rev Biochem*. 2006; 75: 271-94.
20. Petrikaite V, Matulis D. Thermodynamics of Natural and Synthetic Inhibitor Binding to Human Hsp90, Application of Thermodynamics to Biological and Materials Science, Prof. Mizutani Tadashi (Ed.). InTech; 2011. Adresas: <http://www.intechopen.com/books/application-of-thermodynamics-to-biological-and-materials-science/thermodynamics-of-natural-and-synthetic-inhibitor-binding-to-human-hsp90>
21. Pierce MM, Raman CS, Nall BT. Isothermal Titration Calorimetry of Protein – Protein Interactions. *Methods*. 1999; 19:213-21.
22. Porter JR, Fritz CC, Depew KM. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol*. 2010; 14: 412-20.
23. Protein Data Bank [duomenų bazė internete] [žiūrėta 2012 m. balandžio 16d.]. Adresas: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
24. Sreedhar AS, Kalmár É, Csermely P, Shen Y. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett*. 2004; 562:11-5.
25. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. Hsp90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11:515-28.
26. Taldone T, Sun W, Chiosis G. Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17: 2225-35.
27. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data [duomenų bazė internete]. [Žiūrėta 2012 m. kovo 26 d.]. Adresas: <http://www.uniprot.org/>