

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Botanikos ir genetikos katedra

**AISTĖ DAGYTĖ**

**Parazitinių pirmuonių Hsp90 baltymų N-galo domenų klonavimas,  
gryninimas ir charakteristika**

Genetikos bakalauro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas VU Biotechnologijos institute  
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Darbo vadovas

D. D. Timm

Darbo konsultantė

A. Mickevičiūtė

Vilnius 2015

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	3
ĮVADAS .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	7
1.1. Šiluminio šoko baltymų apžvalga.....	7
1.2. Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90) .....	8
1.3. <i>Trypanosoma brucei</i> Hsp90 ( <i>TbHsp90</i> ) .....	12
1.4. <i>Trypanosoma cruzi</i> Hsp90 ( <i>TcHsp90</i> ).....	14
1.5. <i>Toxoplasma gondii</i> Hsp90 ( <i>TgHsp90</i> ).....	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	21
2.1. Medžiagos, rinkiniai, tirpalai ir kitos naudotos priemonės.....	21
2.1.1. Medžiagos ir rinkiniai.....	21
2.1.2. Terpės ir tirpalai.....	21
2.1.3. Naudoti kamieniai, vektoriai, pradmenys .....	24
2.2. Metodai.....	26
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	35
3.1. <i>TbHsp90N</i> , <i>TcHsp90N</i> ir <i>TgHsp90N</i> DNR klonavimas.....	35
3.2. Gautų konstrukčių raiškos patikrinimas ir baltymų gryninimas.....	37
3.2.1. <i>TbHsp90N</i> geno raiškos patikrinimas ir baltymo gryninimas .....	37
3.2.2. <i>TcHsp90N</i> geno raiškos patikrinimas ir baltymo gryninimas .....	40
3.2.3. <i>TgHsp90N</i> geno raiškos patikrinimas ir baltymo gryninimas .....	41
3.3. <i>TbHsp90N</i> baltymo charakterizavimas.....	42
3.3.1. <i>TbHsp90N</i> ir žmogaus Hsp90 $\alpha$ N baltymų slopinimo ICPD 47 slopikliu palyginimas naudojant terminio poslinkio metodą.....	42
IŠVADOS.....	45
SANTRAUKA .....	46
SUMMARY .....	47
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	48
PADĖKA .....	53

## SANTRUMPOS

AHA1 – Hsp90 ATP-azinio aktyvumo induktorius (angl. *Activator of Hsp90 ATPase protein 1*);

Amp – ampicilinas;

ANS – 1-anilino-8-naftaleno sulfonatas (angl. *1-anilino-8-naphthalene sulfonate*);

APS – amonio persulfatas;

aps./min. – apsisukimai per minutę;

c-FLIPL – ląstelinis FLICE baltymo slopiklis (angl. *Cellular FLICE-inhibitory protein*);

Cm – chloramfenikolis;

Cpn10 – šaperoninas 10;

DnaJ – šiluminio šoko baltymas J, Hsp40 homologas;

DNFR – dihidrofoliato reduktazė (angl. *Dihydrofolate reductase*);

dNTP – deoksiribonukleotidas;

DTT – ditionitritolis (angl. *Dithiothreitol*);

EDTA – etileno diamino tetra-acto rūgštis (angl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*);

ErbB2 – receptorių tirozino kinazė;

FK228 – romidepsinas (histonų deacetilazės slopiklis);

FKBP52 – Peptidil-prolit cis-trans izomerazė (angl. *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP52*);

Grp94/Grp96 –94/96 kD nuo gliukozės priklausomas baltymas (angl. *94/96 kD glucose - regulated protein*);

HIP – su huntintinu sąveikaujantis baltymas (angl. *Huntingtin Interacting Protein*);

HOP – homologinio poravimo baltymas (angl. *Homologous-pairing protein*);

Hsc82 – Hsp90 konstitutyvi izoforma (angl. *Heat shock protein Hsp90 constitutive isoform*);

Hsp – šiluminio šoko baltymas (angl. *Heat Shock Protein*);

Hsp75/TRAP1 – šiluminio šoko baltymas 75 ir su TNF (angl. *tumor necrosis factor*) receptoriumi susijusio baltymo 1 kompleksas, turintis ATP-azinį aktyvumą;

HtpG – aukštos temperatūros baltymas G (angl. *High temperature protein G*);

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas;

LB – Luria/Miller lizogeninė mitybinė terpė (angl. *Lysogen broth*);

NDS – natrio dodecilsulfatas;

OD – optinis tankis (angl. *Optical density*);

p23 – tubuliną surišantis baltymas (angl. *Tubulin Binding Protein*);  
p53 – ląstelės piktybėjimo supresorius (angl. *Tumor Suppressor p53*);  
p60<sup>v-Scr</sup> – nereceptorinė tirozino kinazė;  
PGR – polimerazinė grandininė reakcija;  
PI3K – fosfotidilinositolio 3 kinazės (angl. *Phosphatidylinositol-3-kinases*).  
PMSF – Fenil-metil-sulfonil-fluoridas (angl. *Phenylmethylsulfonyl fluoride*);  
PVDF – polivinilideno fluoridas (angl. *Polyvinylidene fluoride*);  
Raf-1 – serino/treonino kinazė 1;  
S.O.C. – optimali mitybinė terpė (angl. *Super Optimal broth with Catabolite repression*);  
SAP – krevečių šarminė fosfatazė (angl. *Shrimp Alkaline Phosphatase*);  
TAE – buferis (angl. TRIS – acetate – EDTA);  
*TbHsp90N* – *Trypanosoma brucei* Hsp90 baltymo N-galo domenai;  
*TcHsp90N* – *Trypanosoma cruzi* Hsp90 baltymo N-galo domenai;  
TEMED – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;  
*TgHsp90 PPI* – *Toxoplasma gondii* Hsp90 baltymų tarpusavio sąveikų duomenų bazė (angl. *Protein-Protein Interaction Network Database*);  
*TgHsp90N* – *Toxoplasma gondii* Hsp90 baltymo N-galo domenai;  
TRAP1 – su TNF receptoriais susijęs baltymas 1 (angl. *TNF receptor-associated protein 1*);  
TRIS – Tris-(hidroksimetil) amino metanas (angl. *Tris(hydroxymethyl)aminomethane*).

## IVADAS

Šiluminio šoko baltymai (Hsp) naudodami ATP energiją dalyvauja įvairių baltymų-klientų lankstymo procesuose, ląstelių dalinimosi cikle, yra svarbūs baltymų pernašai per membranas.

Hsp baltymai yra labai konservatyvūs ir sutinkami beveik visuose gyvuose organizmuose. Šie baltymai pagal savo molekulinę masę yra skirstomi į šešias šeimas. Kadangi Hsp baltymai dalyvauja ląstelei labai svarbiuose procesuose, šių baltymų raiškos sutrikimai tampa įvairių ligų priežastimi. Ypač didelė Hsp baltymų raiška sutinkama įvairaus pobūdžio vėžinėse ląstelėse.

Šiuo metu mokslinė bendruomenė aktyviai domisi ir tyrinėja Hsp baltymus. Atliekama daugybė darbų, susijusių su šių baltymų slopinimu vėžinėse ląstelėse. Taip pat vis didesnis susidomėjimas šiais baltymais kyla gydant pirmuonių sukeltas ligas. Šiuo metu pirmuonių, tokių kaip *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* ir kitų, sukeltų ligų gydymui naudojami stiprius šalutinius poveikius sukeltantys vaistai. Prieš *T. gondii*, kuris sukelia toksoplazmozę, šiuo metu nėra efektyvių vaistų. Žmogus, užsikrėtęs šiuo parazitu, tampa jo nešiotoju visą likusį gyvenimą. *T. cruzi* sukelia amerikine tripanosomozė, dar vadinama Šagaso liga, turi ilgalaikių pasekmių – nepastebėjus infekcijos laiku, išsivysto įvairūs širdies ir virškinamojo trakto sutrikimai, kurie yra negrįžtami. Net ir pradėjus gydymą anksti, ne visuomet pavyksta sunaikinti visus ląstelėse esančius parazitus. *T. brucei* sukelia afrikinė tripanosomozė (miego liga), reikalauja ilgo specializuoto gydymo, būtina profesionali slaugos komanda. Negydoma ši liga pažeidžia centrinę nervų sistemą ir visuomet baigiasi mirtimi. Atsižvelgiant į tai, kad minėtas ligas yra labai sunku gydyti, pacientai patiria stiprius šalutinius poveikius, o gydymas ne visuomet užtikrina, kad tokie pacientai visiškai pasveiks, yra labai svarbu rasti naują vaistą. Toks vaistas turėtų nebūti toksiškas žmogaus organizmui ir užtikrintų visišką parazitinių pirmuonių pašalinimą iš organizmo. Vienas iš mokslinės bendruomenės parinktų taikinių šioms ligoms gydyti yra pirmuonių Hsp90 baltymas, kuris yra svarbus šių parazitų išgyvenimui. Šiuo metu norima atrasti veikliąją medžiagą, kuri galėtų slopinti pirmuonių Hsp baltymų ATP jungimosi domeną, ir taip sukeltų šių parazitinių pirmuonių mirtį. Šiam tikslui pasiekti reikia išsamesnių Hsp baltymų N-galo domeno ir jo sąveikos su ligandais, kurie vėliau galėtų būti panaudoti tokiems vaistams kurti, tyrimų.

DARBO TIKSLAS:

Klonuoti, išgryninti ir charakterizuoti parazitinių Hsp90 baltymų N-galo domenų.

DARBO UŽDAVINIAI:

1. Sukonstruoti Hsp90 baltymų N-galo domenų koduojančius genetinius konstruktus.
2. Nustatyti sąlygas šių konstrukčių raiškai *E. coli* bakterijose.
3. Išgryninti ekspresuotus Hsp90N baltymus.
4. Charakterizuoti išgrynintus baltymus.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Šiluminio šoko baltymų apžvalga

Šiluminio šoko baltymai (Hsp) – labai konservatyvūs, visuose gyvuose organizmuose aptinkami šaperonai (Li ir Srivastava, 2004). Daugumos Hsp baltymų raiškos lygis didėja veikiant aukštomis temperatūroms ar kitiems stresams, pavyzdžiui, pakitus aplinkos pH, esant deguonies trūkimui, kai ląstelė yra veikiamą laisvųjų deguonies radikalų, sunkiųjų metalų, etanolio ar amino rūgščių analogų, kilus infekcijoms, taip pat patyrus hemoraginį arba cirkuliacinį šoką (De Maio, 1999). Hsp100 baltymo raiška didėja dažniausiai jei ląstelėje sumažėja kitų Hsp, pavyzdžiui, Hsp90 (Graefe *et al*, 2002). Padidėjusi Hsp90 ir Hsp70 raiška aptinkama įvairaus pobūdžio navikuose ir dažnai siejama su padidėjusiu atsparumu chemoterapijai: Hsp baltymai saugo naviko ląsteles nuo apoptozės ir nekrozės signalų (Sherman ir Multhoff, 2007). Pavyzdžiui, žmogaus plaučių vėžinėse ląstelėse Hsp90 neleidžia įvykti c-FLIPL proteosominiam suskaidymui. Didelis c-FLIPL kiekis blokuoja nuo išorės signalų priklausančią apoptozę (Wang *et al*, 2012).

Įvairūs šiluminio šoko baltymai dalyvauja naujų (Hsp70) ir denatūravusių (Hsp90) baltymų sulankstyme. Jie grįžtamai jungiasi su hidrofobinėmis dar nesulankstytų, mažiau stabilių polipeptidų vietomis, taip neleisdami jiems agreguoti ar denatūruoti potransliacinių modifikacijų metu, t.y. užkertant kelią termodinamiškai nestabiliems tarpiniams produktams. Jie sumažina galimų neproduktyvių bei biologiškai neefektyvių polipeptido lankstymosi variantų kiekį, taip padidindami susilankstymo greitį ląstelėse (Walter ir Buchner, 2002; Borges ir Ramos, 2005). Jei vis tik įvyksta baltymų agregacija, tokius kompleksus gali ištirpdyti Hsp100 (Lund, 2001). Taip pat Hsp baltymai dalyvauja baltymų kompleksų surinkime, jų transportavime bei degradavime. Transportuojant baltymus per ląstelės plazminę, endoplazminio tinklo ir mitochondrijų membranas, dalyvauja grįžtamame lankstymėsi – baltymai pereidami minėtas membranas turi būti išlankstomi. Sutrikus Hsp baltymų veiklai baltymai-klientai gali įgyti netaisyklingą konformaciją, darytis atsparesni degradacijai ir imti kauptis ląstelėse. Taigi Hsp baltymai yra pagrindiniai veiksniai, užtikrinantys baltymų kokybės kontrolę ląstelėse (Walter ir Buchner, 2002; Borges ir Ramos, 2005).

Dažniausiai Hsp baltymai yra klasifikuojami į keletą šeimų pagal jų apytiksliai molekulinę masę: Hsp10 (10 kDa), Hsp40 (40 kDa), Hsp60 (60kDa), Hsp70 (70kDa), Hsp90 (90kDa) ir Hsp100 (100kDa) (pdbj.org).

Hsp10, dar žinomas kaip šaperoninas 10 (cpn10) arba ankstyvo nėštumo veiksnys (angl. *Early pregnancy factor* - EPF), sudarydamas kompleksą su Hsp60 dalyvauja

mitochondrinių baltymų sulankstyme, yra siejamas su nėštumo palaikymu, vėžinių ląstelių išgyvenamumu ir autoimuninio atsako slopinimu (Haibo *et al*, 2011). Hsp10 prokariotinėse ir eukariotinėse ląstelėse yra svarbus apsaugant ląsteles nuo stresų, kuriuos sukelia infekcijos ar uždegiminės reakcijos (Johnson *et al*, 2005).

Hsp40, dar žinomas kaip šaperonas DnaJ, yra svarbus padidinant Hsp70 baltymų ATP-azinį aktyvumą (Fan *et al*, 2003). Tam, kad Hsp40 galėtų sudaryti kompleksą su Hsp70, yra svarbus Hsp40 baltymuose esantis J domenas, sudarytas iš 70-ies amino rūgščių. Būtent šio domeno dėka yra padidinamas ATP-azinis aktyvumas ir sudaroma jungtis su Hsp70 (Hennessy *et al*, 2005).

Hsp60 arba kitaip – mitochondrinio matrikso baltymas P1, kaip ir dauguma šiluminio šoko baltymų, yra atsakingas už 15-30% visų ląstelės baltymų sulankstymą ir konformacijos palaikymą, dalyvauja baltymų transportavime iš citoplazmos į mitochondrijas (Ranford *et al*, 2000).

Hsp70 pagrindinės funkcijos yra dalyvauti naujų baltymų sulankstyme, išlankstyti agregavusius, neteisingai sulankstytus ar kinetiškai neveiklius baltymus, dalyvauti įvairių sekrecinių baltymų transportavime per membranas bei kontroliuoti reguliacinių polipeptidų veiklą. Buvo pastebėta, kad šios Hsp70 šeimos narių raiška labai padidėja esant tokių sunkiųjų metalų kaip arsenas, kadmis ar gyvsidabris poveikiui (Bukau ir Horwich, 1998).

Hsp90 pagrindinės funkcijos yra padėti kitiems Hsp taisyklingai atlikti baltymų lankstymo procesą, stabilizuoti baltymus esant aukštai temperatūrai ir prisidėti prie baltymų degradacijos (Csermely *et al*, 1998).

Hsp100 turi savybę ištirpinti įvairių tipų baltymus, kurie agregavosi dėl patirto ypač didelio streso. Normalaus augimo metu ląstelės šio baltymo nesintetina, jis ekspresuojamas tik jei ląstelės susiduria su ypač aukšta temperatūra arba kitais stipriais stresais (Lund, 2001).

## **1.2. Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90)**

Hsp90 baltymų šeima yra labai konservatyvi. Šiai šeimai priklauso HtpG (aukštos temperatūros baltymas G), aptinkami bakterijų citozolyje, eukariotų endoplazminio tinklo Grp94/Grp96 (94-96 kDa nuo gliukozės priklausomas baltymas), Hsp75/TRAP1 (Hsp75 ir su TNF receptoriumi susijęs baltymas 1), sutinkami mitochondrijų matrikse, ir Hsp90, randami eukariotų citozolyje. Citozoliniai Hsp90 baltymų homologai mielėse vadinami Hsc82 ir Hsp82, vaisinėje muselėje Hsp83, pelėse Hsp86 ir Hsp84. Hsp90 $\alpha$  ir Hsp90 $\beta$  yra izoformos, randamos žmoguje. Visi šie homologai dalinasi panašia struktūra ir turi panašų veikimo mechanizmą (Young *et al*, 2001). Genai, koduojantys Hsp90 šeimos baltymus, evoliucijos



eigoje patyrė keletą duplikacijų, kai kurie homologai skirtingose rūšyse buvo prarasti. Žemesniuose eukariotuose, pavyzdžiui *Saccharomyces cerevisiae*, yra tik vienas citozolinis Hsp90, kuris yra būtinas šio organizmo išgyvenimui. Dauguma eukariotų turi bent du genus, koduojančius labai artimas, homologines citozolinio Hsp90 formas, kurias, manoma, galėjo atsirasti dėl atskirai įvykusių geno duplikacijų. Bakterijos dažniausiai turi po vieną Hsp90 homologą - HtpG. Yra žinoma keletas bakterijų rūšių, turinčių du homologiškus Hsp90 genus, pavyzdžiui *Streptomyces coelicolor*, nors šių genų panašumas yra tik 30%. Aukštesnieji augalai dažniausiai turi daugiau nei du genus, kurie koduoja Hsp90 baltymus. Prieinamų Hsp90 sekų lyginamoji analizė leido nustatyti kai kurių homologų evoliucijos eigą. Tyrimo išvados teigia, jog eukariotų endoplazminio tinklo Grp94 greičiausiai atsirado anktyvosios eukariotų evoliucijos metu, įvykus geno duplikacijai ir vėliau buvo prarastas grybuose. Chloroplastų Hsp90 greičiausiai kilo iš duplikuotos Grp94 formos, kuri dėl mutacijos įgijo chloroplasto lyderinę seką. Mitochondrinio TRAP1 kilmė nėra tokia aiški, vyrauja dvi teorijos. Pirmoji teigia, jog keturios citoplazminio Hsp90 linijos kilo įvykus vieno bakterinio HtpG geno duplikacijoms. Antroji teigia, kad šios keturios linijos kilo iš dviejų skirtingų HtpG genų, iš kurių vienas evoliucionavo į mitochondrinį TRAP1, o kitas – į citozolinį, endoplazminio tinklo ir chloroplastų Hsp90. Evoliuciškai Hsp90 yra giminingas DNR girazėms, II-o ir IV-o tipo DNR topoizomerazėms. Taip pat verta paminėti, jog skirtingi Hsp90 homologai gali būti slopinami tais pačiais cheminiais junginiais. Tai – radisikolis, geldanamycinas ir jo dariniai, pavyzdžiui, 17-AAG (Johnson, 2012). Tiesa, skirtingi slopikliai prie Hsp90 jungiasi nevienodu stiprumu (Kamal *et al*, 2003). Geldanamycinas yra natūralus junginys, kurį gamina bakterijos *Streptomyces hygroscopicus*. Minėtos cheminės medžiagos jungiasi su N-galo domene esančia ATP jungimosi kišene ir neleidžia vykti ATP hidrolizei. Vienintelis žinomas organizmas, kurio Hsp90 veiklai geldanamycinas neturi įtakos ir nesukelia augimo defektų, yra *Caenorhabditis elegans*. Kadangi *C. elegans* ir *S. hygroscopicus*, kuris išskiria geldanamyciną, gyvena dirvoje, manoma, kad toks *C. elegans* atsparumas šiam junginiui turėtų būti evoliucijos pasekmė (Johnson, 2012).

Hsp90 baltymų ilgis svyruoja nuo 588 iki 854 aminorūgščių (Johnson, 2012). Struktūriškai, Hsp90 yra homodimeras, kurio kiekvienas vienetas yra sudarytas iš trijų tarpusavyje lanksčiai susietų regionų: N-galo ATP surišančio domeno, vidurio katalitinio domeno ir C-galo dimerizacijos domeno (Ali *et al*, 2006). Eukariotiniai organizmai tarp N-galo ir vidurio domenų papildomai turi keleto amino rūgščių tiltelį (Dutta ir Inouye, 2000). Šis tiltelis Hsp90 baltymams yra svarbus prisijungiant baltymams-klientams, jame įvykus delecijoms Hsp90

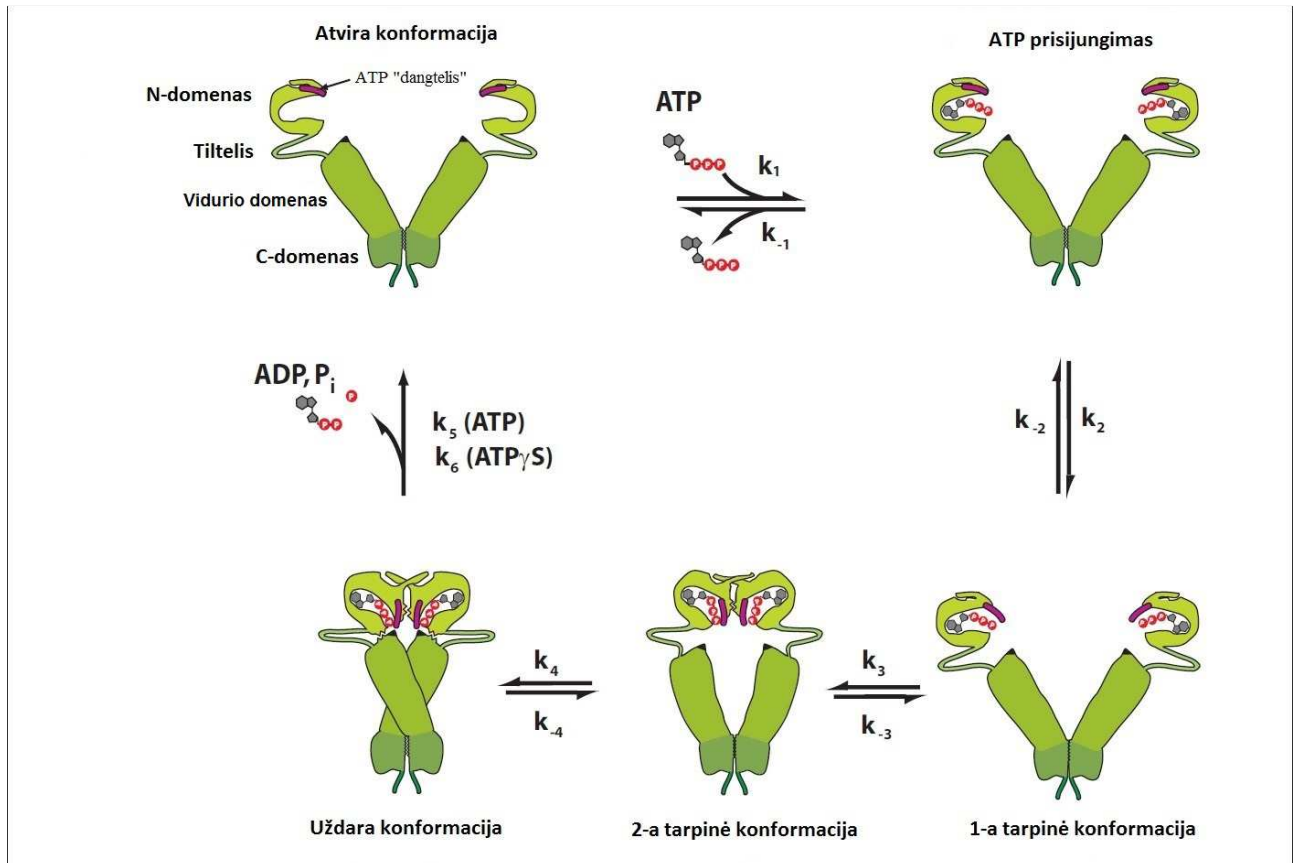
tampa jautrus aukštesnėms temperatūroms (Hainzl *et al*, 2009). Nepaisant jo, minėta domenu organizacija yra konservatyvi nuo bakterijos iki žmogaus (Dutta ir Inouye, 2000).

ATP prijungimo domeniui būdingas iš keleto konservatyvių amino rūgščių sudarytas „dangtelis“. Įvykus ATP prisijungimui šis „dangtelis“ uždaro nukleotido prisijungimo vietą. Įvykus ATP hidrolizei „dangtelis“ atidaromas (Ali *et al*, 2006). Šis „dangtelis“ yra svarbus uždarai Hsp90 konformacijai susidaryti ir ATP hidrolizei įvykti (Zhang *et al*, 2015; Li ir Buchner, 2013 ).

Vidurio domenai taip pat dalyvauja ATP hidrolizės procese. Šio domeno sudėtyje yra amino rūgščių liekanos, kurios padeda suformuoti sudėtinę ATP prisijungimo vietą. Taip pat vidurio domenai prisideda prie sąveikų su baltymais-klientais ir kai kuriais košaperonais (Meyer *et al*, 2004).

C-galo domenai yra svarbūs dimerizacijai įvykti. Taip pat šio domeno gale yra konservatyvus MEEVD motyvas, kuris yra prisijungimo vieta košaperonams, turintiems tetratrikopeptidinį (TPR) pasikartojimą (Scheufler *et al*, 2000).

Hsp90 baltymai gali būti dviejų konformacijų – atviros ir uždaros. Kai Hsp90 yra atviros konformacijos, C-galo domene yra atidengiamos kelios hidrofobinės amino rūgščių liekanos, prie kurių gali prisijungti dar nebaigti lankstyti baltymai arba baltymai, turintys netaisyklingą konformaciją, kuriems taip pat yra būdingi didelė trauka pasižymintys hidrofobiniai regionai (Xu *et al*, 1997). Kai substratas yra prisitvirtinęs tinkamai, energijos išlaisvinimas iš ATP hidrolizės vietos inicijuoja konformacinius pokyčius, kurių metu Hsp90 stipriai sujungiamas su substratu. Stipri Hsp90 sąveika su kitais baltymais neleidžia jiems agreguotis, suteikia galimybę juos transportuoti per membranas bei dalyvauti jų lankstyme (Wegele *et al*, 2004). ATP inicijuojamas Hsp90 konformacijos kitimas vyksta keliais žingsniais (1 pav.): pirma pasikeičia N-galo domene esančio „dangtelio“ pozicija, tuomet N-galo ir vidurio domenai pakeičia orientaciją, galiausiai įvyksta homodimerą sudarančių N-galo domenu susijungimas. Hsp90 įgyja vadinamąją uždarą konformaciją (Ali *et al*, 2006; Shiau *et al*, 2006). Uždara konformacija pasiekama per dvi tarpines stadijas. Po greito ATP prisijungimo Hsp90 pamažu įgyja pirmąją tarpinę stadiją, kurios metu ATP „dangtelis“ yra uždarytas, bet N-galo domenu susijungimas dar neįvykęs. Minėtų domenu susijungimas veda prie antrosios tarpinės stadijos, kurios metu pasikeičia vidurio domeno orientacija ir jis gali sąveikauti su N-galo domenu. Kai Hsp90 pasiekia uždarą konformaciją, įvyksta ATP hidrolizė. Įvykus hidrolizei, N-galo domenai disocijuoja, nuo komplekso atitrūksta ADP, fosfatas ir sulankstytas baltymas-klientas, o Hsp90 įgyja atvirą „V“ formos konformaciją (Hessling *et al*, 2009).



**1 pav.** Hsp90 konformacijos kitimo ciklas (pritaikyta pagal Hessling *et al*, 2009).

Hsp90 vaidina pagrindinį vaidmenį daugelyje svarbių ląstelėse vykstančių procesų. Tarp jų ląstelės ciklo kontrolėje, išgyvenime, signaliniuose keliuose, baltymų transportavime ir degradavime, taip pat Hsp90 yra svarbūs ląstelės atsakui į stresą ir homeostazės palaikymui (Jackson, 2013). Kitaip nei kiti šaperonai, Hsp90 nedalyvauja kaip tik susintetintų baltymų lankstyme. Jie jungiasi prie baltymų-klientų, kurie jau yra beveik įgavę aktyvią formą, vėlesniuose baltymų lankstymo etapuose (Young *et al*, 2001). Hsp90 baltymai-klientai – tai įvairios kinazės, transkripcijos veiksniai, pavyzdžiui, p53, ir steroidinių hormonų receptoriai (Zhao *et al*, 2005).

Eukariotinėje ląstelėje, kuri nepatiria streso, Hsp90 sudaro 1-2% visų tirpių ląstelės baltymų. Kai ląstelės patiria karščio šoką, šių baltymų kiekis padidėja ir sudaro apie 4-6% visų tirpių baltymų (Crevel *et al*, 2001). Remiantis *Saccharomyces cerevisiae* genomo studijomis, manoma, kad net 10% visų šio organizmo baltymų funkcijų tiesiogiai arba ne yra priklausomos nuo Hsp90 (Johnson, 2012).

Hsp90 yra vienas svarbiausių su karščio šoko atsaku susijusių baltymų. Hsp90 aptinkami bakterijose ir visuose eukariotiniuose organizmuose. Šių baltymų neturi tik archėjos (Chen *et al*, 2006). Citoplazminis Hsp90 eukariotiniuose organizmuose yra gyvybiškai būtinas

nepriklausomai nuo to, ar ląstelės yra stresinėse situacijose ar ne, tuo tarpu Hsp90 homologas HtpG bakterijose nėra būtinas, kai prokariotinės ląstelės nepatiria karščio šoko (Thomas ir Baneyx, 1998).

Per pastaruosius dešimt metų Hsp90 baltymai tapo pagrindiniu taikiniu vėžio terapijoje. Šiuo metu vis didesnis susidomėjimas kyla šių baltymų kaip taikinių gydant neurodegeneracines, virusines ligas. Ypač didelis dėmesys sutelktas į Hsp90 kaip taikinį gydant pirmuonių sukeltas ligas (Jackson, 2013). Tokie parazitinių pirmuonių sukelti susirgimai kaip miego liga, Šagaso liga ir toksoplazmozė kasmet nusineša dešimtis tūkstančių gyvybių, milijonai žmonių gyvena rizikos zonoje, o saugaus ir veiksmingo vaisto prieš šias ligas vis dar nėra. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis yra spėjama, jog netgi iki 55 % Lietuvos populiacijos gali būti parazito, sukeliančio toksoplazmozę, nešiotojai (who.int).

### 1.3. *Trypanosoma brucei* Hsp90 (TbHsp90)

*Trypanosoma brucei* yra parazitinis kraujo pirmuonis, kuris sukelia žmogaus afrikinę tripanosomozę, kitaip dar vadinamą miego ligą. Šios ligos sukėlėjas platina *Glossina* genčiai priklausančios musės cėcė (Pizarro *et al*, 2013). Parazitai į žmogaus organizmą patenka įkandimo metu. Liga gali būti perduodama ir iš motinos vaisiui, nes tripanosomos gali pereiti per placentą. Miego liga yra paplitusi ten, kur yra sutinkamos musės cėcė: Vidurio Afrikoje, tarp Sacharos ir Kalahario dykumų. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis ši liga yra endeminė 36-iose Afrikos šalyse, net 60 mln. žmonių gyvena rizikos zonoje (2 pav.) (ulac.lt).



**2 pav.** Afrikinės tripanosomozės paplitimo vietos, parazitinius pirmuonis pernešanti musė cėcė ir *Trypanosoma brucei* parazitai matomi mikroskopu (stanford.edu).

Išskiriamos dvi žmogaus afrikinės tripanosomozės ligos stadijos. Pirmosios metu į

organizmą patekę pirmuonys dauginasi kraujyje ir limfoje. Užsikrėtusiajam pakyla temperatūra, kankina galvos ir sąnarių skausmai. Antrosios stadijos metu parazitai kerta hematoencefalinį smegenų barjerą ir sukelia infekciją centrinėje nervų sistemoje. Šioje ligos stadijoje pasikeičia sergančiojo elgesys, pastebimi koordinacijos ir miego ciklo sutrikimai. Netaikant gydymo ši liga yra mirtina.

*Trypanosoma brucei* per savo gyvenimo ciklą gali įgyti keletą morfologinių formų: ilgos „lieknos“ formos, trumpos „kresnos“ formos, prociklinės tripanosomos, ilgos arba trumpos epimastigotos ir metaciklinės tripanosomos (Langousis ir Hill, 2014).

Musei cėcė įkandus žinduoliui į jo kraują patenka metaciklinių tripanosomų, šios keičia morfologiją į ilgą „liesą“ formą, kuri sukelia infekciją. Parazitai po kiek laiko pro kraujagyslių sienelės ima skverbtis į audinius, taip patekdami ir į centrinę nervų sistemą. Kaip kinta šių parazitų morfologija audiniuose nėra gerai žinoma. Kraujyje ilgos „liesos“ formos parazitai, keičiasi į trumpą „kresną“ formą. Tokios formos parazituose ląstelės ciklas yra sustabdytas, parazitas pasiruošęs patekimui ir išgyvenimui musėje cėcė. Šiai musei mintant tokiu krauju trumpos „kresnos“ formos parazitai patenka į jos viduriniąją žarną, kurioje virsta į prociklines tripomastigotas. Šios besidalindamos sukelia vidurinėsios žarnos infekciją. Tuomet vyksta prociklinių tripomastigotų migracija iš vidurinėsios žarnos į seilių liaukas. Pakeliui įvyksta asimetrinis prociklinių tripomastigotų pasidalijimasis, kurio metu sukuriama dvi ląstelės – viena ilga ir viena trumpa epimastigota. Trumposios epimastigotos prisitvirtina prie seilių liaukų epitelio. Prisitvirtinusios epimastigotos dauginasi asimetriškai, yra sukuriama metaciklinės tripomastigotos, kurios nėra prisitvirtinusios prie seilių liaukų epitelio ir įkandimo metu su seilėmis lengvai patenka į naują šeimininką (Langousis ir Hill, 2014). Ilgosios epimastigotos, manoma, kad neišgyvena (Van Den Abbeele *et al*, 1999).

Hsp90 *T. brucei* parazitams yra būtinas normaliam ląstelių augimui ir dalinimuisi. Vykdamas tyrimus *in vivo* buvo nustatyta, kad slopinant Hsp90 baltymą su 17-N-alylamino-17-demotoksigidanamicinu (17-AAG) mažėja ląstelių S fazėje, nevyksta branduolio dalijimasis, citokinezė. Po 5 valandų poveikio 17-AAG yra stebimas visiškai kraujyje esančių parazitų dalijimosi sustojimas bei sulėtėjęs parazitų, esančių ląstelėse, dalinimasis. Veikiant *T. brucei* parazitus geldanamicinu, po 24 valandų buvo stebimas ląstelės ciklo areštas G1 arba G2 stadijoje. Todėl manoma, kad *TbHsp90* slopinimas 17-AAG ir geldanamicinu paveikia kitus ląstelės dalinimosi cikle dalyvaujančius baltymus (Meyer ir Shapiro, 2013).

Šiuo metu priklausomai nuo to, kokia yra ligos stadija, paskiriami atitinkami vaistai. Antrojoje ligos stadijoje naudojami tokie vaistai, kurie gali kirsti hematoencefalinį barjerą. Tokie medikamentai dažniausiai yra labai toksiški. Pirmajai ligos stadijai gydyti naudojami

pentamidinas arba suraminas, antrajai – melarsoprolis, nifurtimoksas (who.int). Pentamidino naudojimas sukelia tokius šalutinius poveikius kaip cukrinį diabetą, kepenų ar inkstų pažeidimus, hipertenziją, leukocitų kiekio sumažėjimą. Vykdamas *in vitro* tyrimus su žinduolių ir parazito *Crithidia oncopelti* ląstelėmis, buvo nustatyta, jog pentamidinas naikina parazitus sutrikdydamas jų DNR, RNR, baltymų ir fosfolipidų sintezę (drugbank.ca). Suramino naudojimas gali sukelti inkstų nepakankamumą, anafilaksinį šoką, nervų sistemos sutrikimus. Tyrimais buvo nustatyta, jog suraminas slopina NADH oksidaciją, dėl to parazitas galiausiai nebeturi energijos ir žūsta (who.int). Melarsoprolis priskiriamas organiniams arseno junginiams (britannica.com). Šis vaistas inaktyvuoja piruvato kinazę ir taip yra sutrikdoma ATP gamyba. Vartojant melarsoprolį pasireiškia tokie šalutiniai poveikiai kaip periferinė neuropatija, kepenų funkcijų sutrikimai, nesioriantavimas aplinkoje, kartais pacientai praranda sąmonę (drugs.com). Nifurtimokso tikslus veikimo mechanizmas nėra žinomas, tačiau manoma, kad nifurtimokso metabolitas reaguoja su parazito DNR ir sukelia jos trūkius. Kita teorija teigia, jog nifurtimoksas sukelia vandenilio peroksido susidarymą ir slopina tam tikrų reduktazių ir peroksidazių veikimą. Tokiu būdu vandenilio peroksido kiekis parazito ląstelėje tampa citotoksiškas ir parazitinis pirmuonis žūsta (drugs.com).

#### **1.4. *Trypanosoma cruzi* Hsp90 (TcHsp90)**

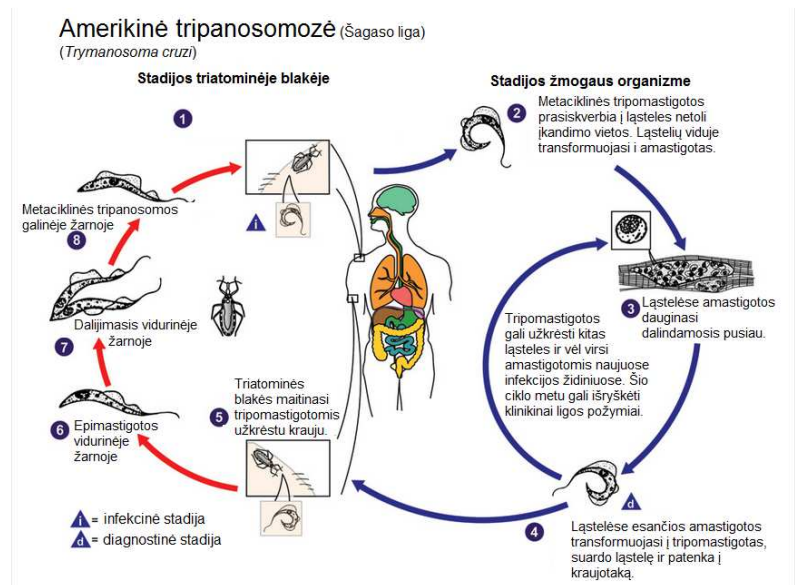
*Trypanosoma cruzi* – parazitinis kraujo pirmuonis, sukeliantis amerikine tripanosomozę, kitaip dar vadinamą Šagaso ligą (Bern *et al*, 2011). Ligos sukėlėjas perneša krauju mintančios triatominės blakės. Užsikrėsti taip pat įmanoma nuo sergančių žmonių ir kitų žinduolių, perpilant kraują, transplantuojant organus ar audinius bei per placentą, taip pat vartojant šiais pirmuonimis užterštą vandenį ar maistą. Amerikine tripanosomozė paplitusi Pietų Amerikoje, kur yra sutinkamos *T. cruzi* pernešančios blakės (3 pav.) (ulac.lt).



**3 pav.** Šagaso ligos paplitimo vietos 1996 m., triatomė blakė *Rhodnius prolixus* platinanti šią ligą, Šagaso ligos sukėlėjas *Trypanosoma cruzi* (stanford.edu; who.int; triatominae.tripod.com).

Manoma, jog užsikėtusiųjų šia liga gali būti 12-18 mln., kasmet nuo šios ligos miršta apie 50 tūkst. žmonių. Po blakės įkandimo praėjus 4-8 savaitėms gali prasidėti ūmi infekcinė reakcija, kurios metu žmogus karščiuoja, netenka apetito, vemia, viduriuoja. Parazitams patekus į smegenis, jos yra pažeidžiamos, o tai dažniausiai baigiasi užsikrėtusiojo mirtimi. Lėtinė šios ligos forma pastebima praėjus 10-40 metų po užsikrėtimo. Jai būdingi tokie širdies sutrikimai kaip aritmija, širdies nepakankamumas, padidėjusi širdis, taip pat gali sukelti virškinamojo trakto megasindromus (stanford.edu).

*T. cruzi* per savo gyvavimo ciklą gali įgyti keletą skirtingų morfologinių formų: epimastigotos, amastigotos, tripomastigotos, metaciklinės tripomastigotos (Graefe *et al*, 2013). Triatominė blakė maitindamasi krauju netoli įkandimo vietos palieka savo išmatų, kuriose yra *T. cruzi* metaciklinių tripomastigotų. Žmogui kasantis jos patenka į organizmą ir užpuola ląsteles netoli įkandimo vietos. Patekusios į ląsteles šios metaciklinės tripomastigotos virsta amastigotomis. Šios morfologinės formos parazitai ląstelėse gali dalintis pusiau, tuomet pakeisti morfologiją į tripomastigotos, vėl patekti į kraują ir užkrėsti kitas ląsteles. Blakei pasimaitinus tokiu krauju su tripomastigotomis, parazitai šios blakės vidurinėje žarnoje keičia morfologiją į epimastigotos. Šios stadijos metu parazitai vėl gali dalinti pusiau. Epimastigotoms patekus į galinę žarną jos virsta metaciklinėmis tripomastigotomis, kurios yra infekcinės (4 pav.) (Clayton, 2011).



**4 pav.** *T. cruzi* gyvenimo ciklas. (pritaikyta pagal Clayton, 2010).

Hsp90 šiems parazitams yra reikalingas epimastigotoms transformuotis į metaciklines tripomastigotas. *Trypanosoma cruzi* epimastigotas paveikus geldanamicinu, Hsp90 slopikliu, buvo pastebėta, jog jose G1 stadijoje yra sustabdomas dalinimasis, nebegali vykti morfologijos perjungimas. Geldanamicinu paveikus tripomastigotas, šios rodė požymius pokyčių į sferomastigotas, tačiau jų virsmas į epimastigotas buvo visiskai sustabdytas (Graefe *et al*, 2013).

Vykdam tyrimą *T. cruzi* epimastigotos buvo veikiamos skirtingais kiekiais geldanamicino, kuris yra Hsp90 slopiklis. Buvo nustatyta, jog slopinant *TgHsp90* ląstelėse padidėjo bent trijų kitų Hsp baltymų kiekis. Toks Hsp baltymų kiekio didėjimas yra indikacija, jog ląstelės patiria stresą. Taip pat buvo nustatyta, jog epimastigotų dalijimasis yra visiškai sustabdomas jas auginant terpėje su 200 ng ml<sup>-1</sup> geldanamicino. Nedidelis kiekis epimastigotų turėjo du branduolius, kurių nebuvo pastebėta kontrolinėse kultūrose. Tripomastigotų dalijimasis buvo visiskai stabdomas su 50 ng ml<sup>-1</sup> geldanamicino. Tripomastigotų morfologinis kitimas į epimastigotas terpėje esant geldanamicino buvo sutrikdyta. Tripomastigotos po 2-3 dienų įgavo ne epimastigotos formą, o apvalių sferomastigotų. Buvo nustatyta, jog tripomastigotų dalijimasis yra sustabdomas G1 stadijoje (Graefe *et al*, 2002).

Šagaso liga šiuo metu gydoma benznidazolu ir nifurtimoksu, abu šie vaistai 100% veiksmingi, jei juos pacientai gauna iš karto po užsikrėtimo (who.int). Nifurtimoksas yra pirmasis pasirinkimas gydant Šagaso ligą, tačiau kaip jau buvo minėta anksčiau, jis sukelia stiprius šalutinius poveikius. Benznidazolas yra alternatyva nifurtimoksui. Benznidazolas sukelia tokius šalutinius poveikius kaip periferinę neuropatiją, purpurinį dermatitą, traukulius.



Nors šio vaisto veikimas nėra gerai išstudijuotas, manoma, kad benzimidazolas sutrikdo baltymų ir RNR sintezę *T. cruzi* parazite (drugs.com).

### 1.5. *Toxoplasma gondii* Hsp90 (TgHsp90)

*Toxoplasma gondii* – vienaląstis parazitinis pirmuonis, sukiantis toksoplazmozę (parasitesinhumans.org). *T. gondii* yra paplitęs visame pasaulyje, ypač karšto ir drėgno klimato šalyse. Manoma, kad apie du milijardai žmonių yra užsikrėtę šiuo parazitu. Įvairiose šalyse užsikrėtusiųjų šiuo *T. gondii* kiekis gali svyruoti nuo 6% iki 94%, tačiau tik nedaugelis jų serga toksoplazmoze, t.y. jiems pasireiškia ligos simptomai. Lietuvoje, manoma, kad šiuo parazitu yra užsikrėtę 40-55 % asmenų. 2012 metais didžiausias sergamumas toksoplazmoze buvo registruotas tarp mieste gyvenančių 25-34 metų moterų. Jos šia infekcija sirgo septynis kartus dažniau nei vyrai ir keturis kartus dažniau nei kaime gyvenančios moterys (ulac.lt). Šis parazitas gali sukelti sunkią infekciją žmogui ir gyvūnams, jei jų imuninė sistema yra nusilpusi ar nevisiškai išsivysčiusi (Ahn *et al*, 2003). Aktyvi parazito forma, vadinamasis tachizoitas, gali sukelti encefalitą ir kitas neurologines ligas, gali paveikti širdį, kepenis, pažeisti vidinę ausį, akis. *T. gondii* prasiskverbęs pro placentą gali sukelti persileidimus arba naujagimiai gali turėti įgimtų defektų (Angel *et al*, 2014). Jei žmogus visiškai sveikas, imuninė sistema sugeba apsaugoti organizmą nuo ligos vystymosi (ulac.lt). *T. gondii* gali užsikrėsti visi šiltak kraujai gyvūnai, tačiau parazitas gali sudaryti gametas ir daugintis lytiškai tik katinių (*Felidae*) šeimai priklausančiuose gyvūnuose (Webster *et al*, 2013). Apsikrėsti šiais parazitais įmanoma vartojant nepakankamai termiškai apdorotą mėsą, ypač kiaulieną, ėrieną ir elnieną, geriant šiais parazitais užterštą vandenį, per kontaktą su kačių ekskrementais, persodinus *T. gondii* užkrėstus organus, perpilant kraują, taip pat šiuos parazitus įmanoma perduoti iš motinos vaisiui (cdc.gov). Dėl pastarosios priežasties šios kačių platinamos ligos ypač turėtų saugotis nėščios moterys – nelaikyti katės namuose, ar laikant vengti pačioms keisti katės kraiką, neleisti naminės katės į lauką, neturėti kontakto su svetimomis, ypač beglobėmis katėmis (ulac.lt).

Šie parazitai vykstant lytiniam ir nelytiniam dauginimuisi gali įgyti tris morfologines formas: tachizoitų, bradizoitų ir oocistų (Black ir Boothroyd, 2000). Lytinis šių parazitų dauginimasis prasideda, kai į katinių šeimoms atstovo organizmą patenka oocistų arba bradizoitų. Patekę į gyvūno žarnyną, šie parazitai gali pradėti lytinį dauginimąsi – oocistų formavimą. Susiformavę oocistos pašalinamos į aplinką kartu su ekskrementais (Vėbraité *et al*, 2013). Ši parazito forma turi dvigubą apvalkalą, kuris apsaugo nuo nepalankių sąlygų ir suteikia galimybę išlikti gyvybingai iki vienerių metų (Black ir Boothroyd, 2000). Oocistoms

patekus į įvairių kitų žinduolių, kurie nepriklauso katinių šeimai, taip pat žmogaus organizmą, prasideda šių parazitų nelytinis dauginimasis (Vėbraitė *et al*, 2013). Iš oocistų yra išlaisvinami du susiformavę sporozoitai, kurie užkrečia plonųjų žarnų epitelines ląsteles ir čia pradeda vystytis į greitai besidalijančius tachizoitus (Black ir Boothroyd, 2000). Tachizoitai prasiskverbia į kraujotaką ir patekę į makrofagų vidų išplinta po visą organizmą. Patekę į smegenų, širdies, griaučių raumenų, tinkainės audinius tachizoitai virsta į bradizoitus – neaktyvią parazito formą. Minėtuose audiniuose neaktyvios formos parazitai sudaro audinių cistas, kurios nusilpus imunitetui gali plyšti ir parazitas iš neaktyvios formos gali vėl virsti į aktyvią formą – tachizoitą (Vėbraitė *et al*, 2013).

Atliekant tyrimą, kurio metu tachizoitai buvo inkubuojami su geldanamicinu, buvo pastebėtas didelis dalijimosi greičio sumažėjimas (Angel *et al*, 2014). Geldanamicinas dideliu efektyvumu jungiasi prie Hsp90 N-galo domene esančios ATP jungimosi kišenės ir neleidžia vyksti ATP hidrolizei (Schulte *et al*, 1998). Ląsteles šeimininkes veikiant PI3K kinazių slopikliais taip pat buvo pastebėtas sumažėjęs tachizoitų dalijimasis. Naudojantis TgHsp90 PPI duomenų baze buvo rasta keletas potencialių kinazių ir fosfatazių, kurios galėtų būti siejamos su ląstelės signalų valdymu. Manoma, kad jos galėtų būti susiję būtent su Hsp90 ir ląstelės ciklo valdymu (Angel *et al*, 2014).

*Toxoplasma gondii* greit besidalinantiems tachizoitams virstant į bradizoitus, vyksta eilė morfologinių ir metabolinių pakitimų, kuriems turi įtakos pakitusi genų raiška. Remiantis TgHsp90 PPI duomenų bazės informacija, yra manoma, kad TgHsp90 baltymas dalyvauja ATP metabolizmo kelyje, baltymų sintezėje ir degradavime, rRNR brendime. Bradizoito stadijoje mitochondrijos genų raiška būna labai sumažėjusi, tuo tarpu greit besidalijančiuose tachizoituose oksidacinis fosforilimas yra būtinas ATP gamybai (Angel *et al*, 2014).

Hsp90 yra svarbus *T. gondii* patekimui į šeimininko ląsteles. Tyrimo metu geldanamicinu paveiktų tachizoitų galimybė patekti į Vero ląsteles (Afrikos žaliųjų beždžionių inkstų epitelio ląsteles) per 4 valandas sumažėjo net 75%, taip pat buvo stebimas sulėtėjęs parazitų, kurie pateko į Vero ląsteles, dalijimasis (Ahn *et al*, 2003).

TgHsp90 gali sudaryti heterokompleksus su įvairiais košaperonais, kurie moduliuoja Hsp90 ATP-azinį aktyvumą. Tyrimais buvo nustatyta ankstyvasis/tarpinis ir vėlyvasis TgHsp90 kompleksas panašus į randamus aukštesniuose eukariotuose. Ankstyvasis/tarpinis TgHsp90 kompleksas sudarytas iš HIP-Hsp70-TgHsp90 baltymų, vėlyvasis – p23-TgHsp90. p23 ir TgHsp90 kompleksas tachizoituose yra randamas citozolyje, bradizoituose – citozolyje ir branduolyje. Dėl to manoma, kad p23 ir TgHsp90 baltymai turėtų

būti susiję su didelių baltymų kompleksų susidarymu, kaip ir aukštesniuose eukariotuose (Angel *et al*, 2014).

Hsp90 funkcijos gali būti paveikiamos įvairių potransliacinių modifikacijų: fosforilinimo, acetilinimo, S-nitrozilinimo, oksidacijos ir ubikvitilino. TgHsp90 yra fosforilintas keliuose sekos vietose, daugelis jų sutampa su Hsp90 ortologų žmonėse ir mielėse fosforilinimu. Nors fosforilinimo reišmė *T. gondii* parazituose nėra tirta, žinoma, kad Hsp90 fosforilinimas kituose organizmuose vaidina svarbų vaidmenį šio baltymo struktūros ir funkcijų reguliavime. Kai kuriais atvejais fosforilinimas sumažina baltymų-klientų trauką, kai kuriais – padidina. Mažas žmogaus Hsp90 baltymo jungties regionio fosforilinimas padidina tam tikrų košaperonų jungimąsi. Mielėse treonino 22-ojo fosforilinimas paveikia Hsp90 ATP-azinį aktyvumą ir funkciją kai kurių baltymų atžvilgiu. Taigi Hsp90 fosforilinimas svarbus Hsp90 funkcijoms bei kompleksų susidarymui (Angel *et al*, 2014).

Acetilinimas yra potransliacinė modifikacija, kurios metu dažniausiai prie lizino liekanų yra pridamos acetilo grupės (Mollapour, 2012). Žmogaus Hsp90 turi keletą acetilintų lizinų. Už šio baltymo acetilinimą yra atsakingos histonų acetil-transferazė ir histonų deacetilazė. Acetilinimas Hsp90 funkciją paveikia neigiamai. Vėžines ląsteles paveikus histonų deacetilazės inhibitoriumi FK228 buvo pastebėta, jog Hsp90 nebegali sudaryti komplekso su tokiais svarbiais ląstelės ciklo reguliatoriais kaip p53 ir Raf-1. TgHsp90 baltymo sekoje yra du acetilinti lizinai (K384 ir K559). Šie lizinai yra konservatyvūs ir taip pat aptinkami žmogaus Hsp90α baltyme, vienas iš jų irgi yra acetilintas. Acetilintų žmogaus Hsp90α ir *T. gondii* Hsp90 mutacijos sukelia tokias pat pasekmes. Lizino pakeitimas alaninu labai sumažina Hsp90 sąveiką su kinazėmis ErbB2 ir p60<sup>v-Scr</sup>. Sumažėjusios sąveikos pastebimos ir su tokiais košaperonais kaip AHA1, FKBP52, HOP (Angel *et al*, 2014).

S-nitrozilinimas yra kovalentinis azoto monoksido prijungimas prie cisteino. Ši potransliacinė modifikacija nebuvo tirta *T. gondii* Hsp90, tačiau buvo nustatyta žmogaus Hsp90α baltymo C-galo domene ant cisteino 597-ojo liekanos, kuri sutinkama ir TgHsp90 baltyme. Minėtas žmogaus Hsp90α baltymo nitrozilinimas slopina jo aktyvumą (Angel *et al*, 2014).

Šiuo metu kovojant su toksoplazmoze naudojami sulfodiazinas ir pirimetaminas (cdc.gov). Šie vaistai yra folio rūgšties antagonistai (mayoclinic.org). Pirimetaminas stabdo tetrahidrofolio rūgšties sintezę iš folio rūgšties slopindamas dihidrofoliato reduktazę (DHFR). Tetrahidrofolio rūgštis yra reikalinga DNR ir RNR sintezei daugelyje organizmų, taip pat ir pirmuonių. Pirimetaminas pirmuonių, tarp jų ir *T. gondii*, DHFR slopina stipriau nei žinduolių

DHFR. Slopinama DHFR nebesintetina tetrahidrofolio rūgštis, kuri yra svarbus kofermentas nukleorūgštims susidaryti, sutrikdoma baltymų sintezė ir sustoja branduolio dalinimasis tachizoituose (ebs.tga.gov.au). Nepaisant to, jog šie vaistai yra efektyvūs, kai kuriais atvejais pacientai patiria stiprių šalutinių poveikių. Be to, vis dar nėra rasta vaistų, kurie veiktų prieš lėtinę šios ligos formą – kai parazitas audiniuose suformuoja cistas. Manoma, kad specifiniai parazito baltymai, kurie yra susiję su svarbiais parazito išgyvenimui procesais, galėtų būti naujais taikiniai gydant toksoplazmozę. Vienas iš šių taikinių gydant ne tik ūminę toksoplazmozę, bet ir lėtinę, galėtų būti Hsp90 baltymas (Angel *et al*, 2014). Manoma, kad Hsp90 *T. gondii* parazitams padeda patekti į šeimininkų ląsteles, yra svarbus dalinimuisi vyksti ir šiems parazitams keičiant morfologinę formą iš trachizoito į bradizoitą (Angel *et al*, 2014).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos, rinkiniai, tirpalai ir kitos naudotos priemonės

#### 2.1.1. Medžiagos ir rinkiniai

Naudotos medžiagos ir rinkiniai pateikti pagal gamintoją:

- *BioRad*: TEMED, glicinas, bromfenolio mëlis;
- *Fluka*: LB mitybinë terpë, bisakrilamidas, Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, HCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O;
- *GE Healthcare*: sefarozë;
- *Boehringer Mannheim*: DTT;
- *Ferak Berlin*: Tritonas – X100;
- *Roche*: chloramfenikolis, glicerolis, proteazių slopiklis;
- *Roth*: akrilamidas, ampicilinas, APS, LB mitybinë terpë, MgCl<sub>2</sub>, mielių ekstraktas, NaCl, triptonas;
- *Aldrich Chem. Co.* – 1,8-anilino nafataleno sulfonatas (ANS).
- *Sigma*: CH<sub>3</sub>COOH, EDTA, imidazolas, KCl, TRIS;
- *Thermo Fisher Scientific*: agarozë, IPTG, baltymų dydžio žymuo #SM 0431 (Protein Molecular Weight Marker), DNR dydžio žymuo # SM 0331 (GeneRuler™ DNA Ladder Mix), DNR 6x mëginių dažas (6X Orange Loading Dye), fermentai klonavimui: restrikcijos endonukleazës (NdeI, XhoI), T4 DNR ligazë ir jos buferinis tirpalas (Rapid T4 ligase buffer), dNTP mišinys, SAP šarminë fosfatazë ir jos buferinis tirpalas, *Pfu* DNR polimerazë ir jos buferinis tirpalas, *Phusion* polimerazë ir jos buferinis tirpalas. DNR gryninimo rinkiniai: „GeneJET™Gel Extraction Kit“, „GeneJET™Plasmid Miniprep Kit“.

#### 2.1.2. Terpës ir tirpalai

*Skysta LB (Luria/Miller) mitybinë terpë (1 L):*

25 g terpës ištirpinami distiliuotame vandenyje. Tirpalas autoklavuojamas 20 min. 1 atm slëgyje, 120°C temperatūroje.

*Agarizuota LB (Luria/Miller) mitybinë terpë (1 L):*

Į 1 L skystos LB terpës dedama 15 g agar-agaro. Tirpalas autoklavuojamas 20 min. 1 atm slëgyje, 120°C temperatūroje.

*S.O.C. terpė (1 L):*

20 g peptono ir 5 g mielių ekstrakto ištirpinama distiliuotame vandenyje, pridedama 10 mM NaCl ir 3,5 mM KCl. Tirpalas autoklavuojamas 20 min. 1 atm slėgyje, 120°C temperatūroje. Tirpalui atvėsus pridedama 10 mM MgCl<sub>2</sub> ir 20 mM gliukozės. Terpė filtruojama per 0,2 μm PVDF filtrą su polipropilenu, išpilstoma mažais tūriais ir laikoma -20°C temperatūroje.

**1 lentelė.**Baltymų elektroforezės poliakrilamido gelis.

Skiriamasis (apatinis) gelis 12,5% (5 mL)	
30 % Akrilamido/bis-akrilamido tirpalas	2 ml
1,5 M TRIS-HCl pH=8,8	1,25 ml
10 % NDS	50 μL
Distiliuotas vanduo	1,585 mL
10 % APS	25 μL
TEMED	2,5 μL
Koncentruotas (viršutinis) gelis 4% (2,5 mL)	
30 % Akrilamido/bis-akrilamido tirpalas	335 μL
1,5 M TRIS-HCl pH=6,8	625 μL
10 % NDS	25 μL
Distiliuotas vanduo	1,5 mL
10 % APS	12,5 μL
TEMED	2,5 μL

*Akrilamido/bis-akrilamido tirpalas (30%)(100 mL):*

29,2 g akrilamido ir 0,8 g bisakrilamido ištirpinama 70 mL distiliuoto vandens. Tirpalas filtruojamas per stiklinį filtrą ir supilamas į tamsų stiklinį indą. Laikoma +4°C temperatūroje.

*Akrilamidinių gelių dažas (250 mL):*

113 mL etanolio, 23 mL acto rūgšties ir 0,6 g Coomassie Brilliant Blue R-250 ištirpinama nedideliame kiekyje distiliuoto vandens. Gerai išmaišius tirpalas skiedžiamas iki 250 mL. Tirpalas laikomas kambario temperatūroje.

*6x baltymų mėginių dažas (10 mL):*

300 µL 1 M TRIS, 1,2 g NDS, 92,5 mg DTT, 6 mL glicerolio, 60 mg bromfenolio mėlio ištirpinama nedideliame kiekyje distiliuoto vandens. Po to tirpalas atskiedžiamas iki 10 mL. Dažas laikomas -20°C temperatūroje.

*50x TAE elektroforezės buferis (1 L):*

242 g TRIS bazės, 57,1 mL ledinės acto rūgšties ir 100 mL 0,5 M EDTA ištirpinama distiliuotame vandenyje. Buferis laikomas kambario temperatūroje.

*1 M IPTG tirpalas:*

5 g IPTG tirpinama 21 mL distiliuoto vandens. Filtruojama pro 0,2 µm PVDF filtrą su polipropilenu.

*Gryninimo buferis A*

25 mM Tris-HCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05 M imidazolo ištirpinama šaltame distiliuotame vandenyje. Naudojant HCl tirpalą (HCl:H<sub>2</sub>O=1:1) buferio pH privedamas iki 7.

*Gryninimo buferis B*

25 mM Tris-HCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 M imidazolo ištirpinama šaltame distiliuotame vandenyje, priversti pH iki 7 naudojant HCl tirpalą (HCl:H<sub>2</sub>O=1:1).

*Fosfatinis saugojimo buferis 50 mM*

0,94 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ištirpinti distiliuotame vandenyje, pridėti 0,1 M NaCl, priversti pH iki 7,5.

*ANS dažas 10 mM*

Ištirpinti 10 mM ANS distiliuotame vandenyje.

### 2.1.3. Naudoti kamieniai, vektoriai ir pradmenys

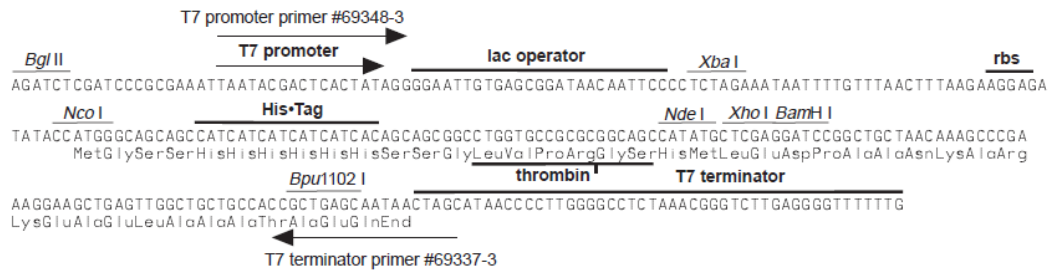
*Kamieniai:*

- Plazmidės DNR išskyrimui naudotas *E. coli* bakterijų kamienas XLI-blue (*Novagen*). Kamienas neturi atsparumo antibiotikams. Šios ląstelės labai tinkamos DNR padauginimui, nes neturi endonukleazų – tai padidina išskiriamos DNR kokybę, ir neatlieka rekombinacijos – tai padidina įkeliamo geno stabilumą.
- Hsp90 raiškai naudoti *E. coli* bakterijų kamieniai:
  - BL21(DE3)CodonPlus-RIL (*Sratagene*). Šis kamienas turi papildomas kopijas *argU*, *ileY* ir *leuW* genų, koduojančių tRNR, kurios atpažįsta arginino (AGA ir AGG), izoleucino (AUA) ir leucino (CUA) kodonus. Šie kodonai yra retai sutinkami *E. coli* bakterijose. Taip pat šis kamienas turi atsparumą chloramfenikoliui.
  - One shot BL21(DE3)pLysS (*Invitrogen*). Gamina λ DE3 lizogeną ir pLysS plazmidę, ekspresuojančią nedidelius kiekius T7 lizocimo, kuris sumažina bazinę rekombinantinių genų raišką, slopindamas T7 RNR polimerazę. Dažniausiai šį kamieną rekomenduojama naudoti ekspresuojant toksiškus baltymus. Taip pat šis kamienas turi atsparumą chloramfenikoliui.
  - One shot BL21(DE3) (*Invitrogen*). Gamina λ DE3 lizogeną. Šis kamienas neturi atsparumo antibiotikams.
  - One shot BL21(DE3) Star (*Invitrogen*). Turi mutaciją RNasės E gene, todėl turi mažesnius jos kiekius – nėra degraduojama tiek daug iRNR. Neturi *lon* ir išorinės membranos (*OmpT*) proteazių, todėl užtikrinama sumažinta heterologinių baltymų degradacija. Šis kamienas neturi atsparumo antibiotikams.
  - Shuffle T7 Express Competent *E. coli* (*EMD4Biosciences*). Ekspresuoja disulfidinių tiltelių izomerazę (*DcbC*), kuri padeda teisingai susiformuoti disulfidiniams tilteliams. Padeda tinkamai sulankstyti ir tuos baltymus, kuriems nereikia sudaryti disulfidinių tiltelių. Neturi atsparumo antibiotikams.
  - Rosetta2 (DE3) (*Novagen*). Šis kamienas turi tRNR, kurios yra skirtos *E. coli* retiems kodonams atpažinti: AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, ir CGG. Kamienas turi atsparumą chloramfenikoliui.



Genetinių konstrukcijų kūrimui naudotas vektorius:

- pET 15b (*Novagen*). Šis vektorius turi šešis histidinus koduojančią nukleotidų seką multikloninės sekos N gale, atsparumą antibiotikui ampicilinui, T7 promotorių (5 pav.)



### pET-15b cloning/expression region

5 pav. pET15b klonavimo/raiškos regionai.

- Pradmenys:
  - T7-Prom (5'–TAATACGACTCACTATAGGG–3') – tiesioginis pradmuo konstrukty sekoms nuskaityti sekoskaitos metu.
  - T7-Term (5'–GGGGTTATGCTAGTTATTGC–3') – atvirkštinis pradmuo konstrukty sekoms nuskaityti sekoskaitos metu.
  - Hsp90N-Prom (5'–GATCGCCCATATGGATTACAAAGATGAT–3') – tiesioginis pradmuo Hsp90N sekų padauginimui PGR metodu. CA'TATG – NdeI restriktazės kirpimo vieta.
  - TbHsp90N-Term (5'–CCTTCCTCGAGTTATTTGGCGGCCTCTTC–3') – atvirkštinis pradmuo TbHsp90N sekos padauginimui PGR metodu. C'TCGAG – XhoI restriktazės kirpimo vieta.
  - TgHsp90N-Term (5'–CTTCTCCTCGAGTTATTCAGCTGGCTTC–3') – atvirkštinis pradmuo TgHsp90N sekos padauginimui PGR metodu. C'TCGAG – XhoI restriktazės kirpimo vieta.
  - TcHsp90N-Term (5'–CCTCCTCGAGTTACGTGCCAGCC–3') – atvirkštinis pradmuo TcHsp90N sekos padauginimui PGR metodu. C'TCGAG – XhoI restriktazės kirpimo vieta.
- *T. brucei*, *T. cruzi* ir *T. gondii* cDNR gauta iš D. Picard laboratorijos (Ženeva, Šveicarija).

## 2.2. Metodai

### Polimerazinė grandininė reakcija (I)

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) naudojama *TbHsp90N* domeną koduojančios DNR sekos padauginimui nuo *TbHsp90* DNR. Reakcijos tūris 25 µL.

Reakcijos mišinį sudaro:

1x Pfu polimerazės buferinio tirpalo su MgSO<sub>4</sub> (2%);  
0,2 mM dNTP mišinio;  
25 ng matricinės *TbHsp90* DNR;  
0,5 mM Hsp90N-Prom;  
0,5 mM *TbHsp90N*-Term;  
1,25 fermentų aktyvumo vienetų Pfu DNR polimerazės;  
Distiliuoto vandens iki 25 µL.

Amplifikacijos programa:

1. Kaitinimas: 95°C, 5 min.;
2. Denatūracija: 95°C, 30 sek.;
3. Pradmenų prilydymas: 62°C, 30 sek.;
4. Sintezė: 72°C, 1 min.;
5. Galutinis galų sintetinis: 72°C, 10 min.

2-4 etapai kartojami 25 kartus.

### Polimerazinė grandininė reakcija (II)

Polimerazinė grandininė reakcija naudojama *TcHsp90N* ir *TgHsp90N* koduojančių DNR sekų padauginimui nuo *TcHsp90* ir *TgHsp90* DNR. Reakcijos tūris 50 µL.

Reakcijos mišinį sudaro:

5x „Phusion“ polimerazės GC buferinio tirpalo;  
0,2 mM dNTP mišinio;  
25 ng matricinių *TcHsp90*, *TgHsp90*;  
0,5 mM Hsp90N-Prom;  
0,5 mM *TcHsp90N*-Term arba *TgHsp90N*-Term;  
1 fermentų aktyvumo vieneto „Phusion“ DNR polimerazės;  
Distiliuoto vandens iki 50 µL.

Amplifikacijos programa:

1-as etapas:

1. Kaitinimas: 98°C, 30 sek.;
2. Denatūracija: 98°C, 10 sek.;
3. Pradmenų prilydymas: 62°C, 30 sek.;
4. Sintezė: 72°C, 30 sek.;
5. Galutinis galų sintetinis: 72°C, 10 min.;
6. Laikymas: 4°C, 10 min.

2-4 etapai kartojami 30 kartų.

2-as etapas:

1. Kaitinimas: 98°C, 30 sek.;
2. Denatūracija: 98°C, 10 sek.;
3. Pradmenų prilydymas ir sintezė: 72°C, 30 sek.;
4. Galutinis galų sintetinis: 72°C, 10 min.

2-3 etapai kartojami 30 kartų.

### **DNR elektroforezė**

PGR reakcijos produktai po restrikcijos analizuojami 1,5% agarozės gelyje. Gelis ruošiamas į 30 mL TAE buferio įberiant 0,45 g agarozės, kaitinama kol tirpalas užverda. Tirpalui ataušus įpilama 0,5 μg/mL etidžio bromido.

Į gelį įnešami DNR mėginiai dažyti su DNR 6x mėginių dažu ir DNR dydžio žymuo. Elektroforezė vykdoma naudojant 1x TAE buferinį tirpalą su 0,25 μg/mL etidžio bromido.

Elektroforezė vykdoma esant 8 V/cm<sup>3</sup> įtampai. Gelis analizuojamas UV šviesoje.

### **DNR karpymas restrikcijos endonukleazėmis**

Su mėginiais, kuriuos pavyko amplifikuoti, ir pET15b vektoriumi vykdoma restrikcija greito karpymo Xho ir NdeI restrikcijos endonukleazėmis, naudojant FD Green buferį.

Reakcijos mišinį sudaro (20 μL):

1000 ng DNR;

2 μL FD Green buferis;

1 μL Xho;

1 μL NdeI;

Distiliuotas vanduo iki 20 μL.

Reakcija vykdoma 30 min., 37°C.

### **Vektoriaus defosforilinimas**

Vektorius defosforilinamas naudojant šarminę fosfatazę, kuri pašalina fosfato grupę nuo 5' vektoriaus galo. Defosforilinimo reikia, kad vektorius vėl neįgautų žiedinės struktūros. Reakcija vykdoma po restrikcijos į restrikcijos mišinį pridėjus 1 fermento aktyvumo vienetą krevečių šarminės fosfatazės SAP ir 1x krevečių šarminės fosfatazės buferio. Reakcija vykdoma 30 min. 37°C temperatūroje. Pasibaigus reakcijai fermentas inaktyvuojamas palaikius mišinį 20 min. +80°C temperatūroje.

Baigus inaktyvuoti fermentus atliekama PGR produkto ir vektoriaus elektroforezė 1,5 % agarozės gelyje.

### **DNR išskyrimas iš agarozės gelio**

Mėginiai, kurie apšvietus UV turi žymę ties 714 bp (*TbHsp90N*), 719 bp (*TcHsp90*), 752 bp (*TgHsp90*) arba ties 5696 bp (pET15b) yra išpjaunami iš gelio ir jų DNR išgryninama naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ vadovaujantis gamintojo instrukcija, pamatuojama DNR koncentracija „NanoDrop“ spektrofotometru ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ).

### **Ligavimas**

Atsižvelgiant į gautos DNR koncentraciją apskaičiuojama, kokio kiekio DNR reikės įterpimui į vektorių. Apskaičiuojama pagal formulę:  $\text{intarpo santykis su vektoriumi} \times (\text{Intarpo ilgis (kb) / Vektoriaus ilgis (kb)}) \times \text{vektoriaus kiekis (ng)} = \text{Intarpo kiekis (ng)}$ .

Reakcijos mišinį sudaro (20µL):

4 µL T4 DNR ligazės buferio;

25ng pET15b vektoriaus;

9,9 ng *TgHsp90N* arba 9,43 ng *TcHsp90N* arba 9,9 ng *TbHsp90N*.

5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės;

Distiliuoto vandens.

Reakcija vykdoma 5 min. 22°C.

### **Ląstelių transformacija**

1. Sumaišoma 50  $\mu\text{L}$  XLI-blue ląstelių plazmidės padauginimui ir 20  $\mu\text{L}$  DNR po ligavimo. Laikoma ledo vonioje 20 min.
2. Ląstelės 90 s laikomos 42°C.
3. Ląstelės gražinamos 2 min. į ledo vonią.
4. Pridedama 400  $\mu\text{L}$  S.O.C.
5. Purtoma 1 val., 37°C, 220 aps./min.
6. Ląstelės centrifuguojamos 2 min., 13000 aps./min greičiu, kambario temperatūroje. Ląstelių supernatantas nupilamas, nuosėdos resuspenduojamos ir užsėjamos į Petri lėkštelę su 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicilino. Auginama per naktį 37°C.

### **DNR išskyrimas**

Iš lėkštelės imama viena kolonija ląstelių ir užsėjama į 5 ml skystos LB terpės, turinčios 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicilino. Auginama per naktį 37°C, purtant 220 aps./min. greičiu. Ryte išskiriama DNR naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“, vadovaujantis gamintojo instrukcija. DNR koncentracija pamatuojama „NanoDrop“ spektrofotometru ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ). DNR vėl karpoma restrikcijos endonukleazėmis Xho ir NdeI, analizuojama 1,5 % agarozės gelyje, mėginių, turinčių žymę ties reikiamu bazių porų skaičiumi, sekos nustatomos VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre.

### **Biomasės auginimas**

Sukonstruoti pET15b-*TbHsp90N*, pET15b-*TcHsp90N* ir pET15b-*TgHsp90N* genetiniai konstruktai, neturintys mutacijų, naudojami *E. coli* bakterijų kamienams transformuoti. Po transformacijos po vieną koloniją iš Petri lėkštelių yra perkeliama į LB terpę su pET15b vektoriui ir transformuojamam kamienui (jei šis turi atsparumą antibiotikams) atrankiais antibiotikais. Auginama per naktį 37°C temperatūroje, purtant 220 aps./min. greičiu. Ryte po 8 mL naktinių kultūrų yra perkeliama į kolbas, kuriose yra 400 mL LB terpės ir reikiamas kiekis antibiotikų. Auginama 37°C temperatūroje, purtant 220 aps./min. greičiu, kol optinis tankis pasiekia apie 0,6 ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). Kai optinis tankis pasiekia reikiamą ribą, iš kiekvienos kolbos išsaugoma po 300  $\mu\text{L}$  terpės su biomase ir indukuojama raiška naudojant IPTG. IPTG jungiasi prie *lac* (laktozės) operono represoriaus, jis yra pašalinamas, tuomet prie T7 RNR polimerazės promotoriaus jungiasi T7 RNR polimerazė ir pradedama *lac* operonui priklausančių genų transkripcija, taip pat ir genų, koduojančių tikslius Hsp90N baltymus.

Auginama dar 3 valandas 37°C, 4 valandas 30°C arba per naktį 18°C temperatūroje, 220 aps./min. greičiu. Po atitinkamo auginimo laiko išsaugoma 300 µL terpės su biomase. Visa likusi terpė su biomase centrifuguojama „Beckman“ centrifuga, naudojant JA-10 rotorių, 20 min., 6000 aps./min. greičiu, +4°C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, biomasė užšaldoma -20°C temperatūroje. Detalios biomasių auginimo sąlygos pateiktos antroje lentelėje.

## 2 lentelė. Biomasės auginimo sąlygos.

Baltymas	Konstruktas	Kamienas	Auginimo sąlygos iki indukcijos	IPTG koncentracija	Auginimo sąlygos po indukcijos
TbHsp90N	pET15b-6xHis-TbHsp90N	<i>E. coli</i> BL21(DE3)CodonPlus-RIL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 34 µL/mL chloramfenikolio</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	1 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama 3 val. 37°C temperatūroje</li> </ul>
TcHsp90N	pET15b-6xHis-TcHsp90N	<i>E. coli</i> BL21(DE3)CodonPlus-RIL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 34 µL/mL chloramfenikolio</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	1 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama 3 val. 37°C temperatūroje</li> </ul>
TcHsp90N	pET15b-6xHis-TcHsp90N	<i>E. coli</i> BL21(DE3)CodonPlus-RIL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 34 µL/mL chloramfenikolio</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	0,5 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama per naktį 18 °C temperatūroje</li> </ul>
TcHsp90N	pET15b-6xHis-TcHsp90N	<i>E. coli</i> OneShotBL21(DE3)pLysS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 34 µL/mL chloramfenikolio</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	1 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama 3 val. 37°C temperatūroje</li> </ul>
TcHsp90N	pET15b-6xHis-TcHsp90N	<i>E. coli</i> One shot BL21(DE3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	0,5 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30°C temperatūroje auginama 4 val.</li> </ul>
TcHsp90N	pET15b-6xHis-TcHsp90N	<i>E. coli</i> One shot BL21(DE3) Star	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	0,5 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama 4 val. 30°C temperatūroje</li> </ul>
TgHsp90N	pET15b-6xHis-TgHsp90N	<i>E. coli</i> BL21(DE3)CodonPlus-RIL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 34 µL/mL chloramfenikolio</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	1 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama 3 val. 37°C temperatūroje</li> </ul>
TgHsp90N	pET15b-6xHis-TgHsp90N	<i>E. coli</i> One shot BL21(DE3) Star	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	1 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama per naktį 18 °C temperatūroje</li> </ul>
TgHsp90N	pET15b-6xHis-TgHsp90N	<i>E. coli</i> Shuffle T7 Express Competent	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	1 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama per naktį 18 °C temperatūroje</li> </ul>
TgHsp90N	pET15b-6xHis-TgHsp90N	<i>E. coli</i> Rosseta2 (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 µL/mL ampicilino</li> <li>• 34 µL/mL chloramfenikolio</li> <li>• 37°C temperatūroje auginama 3 val.</li> </ul>	1 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auginama per naktį 18 °C temperatūroje</li> </ul>

### Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje

Mėginiai, paimti prieš ir po indukcijos, centrifuguojami 2 min., 13000 aps./min. greičiu, kambario temperatūroje, supernatantas nupilamas, į nuosėdas pridedama 30 µL 1x baltymų mėginių dažo. Gauti mėginiai ir baltymų dydžio žymuo virinami 5 min., 95°C temperatūroje.

Paruošiamas baltymų elektroforezės gelis (1 lent.). Du stikliukai švarai nuvalomi etanoliu ir įstatomi į laikiklį. Supilamas apatinis gelis paliekant ~2 cm tarpą iki viršaus, užpilama distiliuoto vandens ir paliekama stingti 30 min. Geliui sustingus vanduo nupilamas ir užpilamas viršutinis gelis, įdedamos „šukutės“ ir paliekama stingti dar 30 min. Sumontuojamas elektroforezės aparatas, įpilama 400 mL 1x baltymų elektroforezės buferio, iš gelio išimamos „šukutės“ ir supilami mėginiai. Elektroforezė vykdoma maždaug 1 val 50 mA stiprumo ir 200 V įtampos srove. Po elektroforezės gelis dažomas 20 min., purtant 70 aps./min. greičiu, kambario temperatūroje. Vėliau gelis blukinamas verdant 10 min.

### **Baltymo tirpumo nustatymas**

Gauta ląstelių biomasė 1 val. šaltai maišoma buferyje A, pridėjus 1 mM PMSF. Po valandos ląstelių sienelės ardamos ultragarsu („Bandolin Sonopuls“, VS 70T antgaliu) 10 min., kas 60 sek. darant 60 sek. pertrauką, esant 70 % amplitudei. Suardytos ląstelės centrifuguojamos „Beckman“ centrifuga, naudojant JA-20 rotorių, 25 min., 18 000 aps./min. greičiu, +4°C temperatūroje. Supernatantas atskiriamas. Bradfordo būdu (Bradford, 1978) nustatoma tirpių baltymų koncentracija. Mėginiai nudažomi 6x baltymų dažu baltymų elektroforezei, gelyje analizuojama, ar yra tirpaus baltymo.

### **Baltymo gryninimas**

Gauta bakterijų biomasė 1 val. šaltai maišoma buferyje A, pridėjus 1 mM PMSF. Po valandos bakterijų sienelės ardamos ultragarsu („Bandolin Sonopuls“, VS 70T antgaliu) 10 min., kas 60 sek. darant 60 sek. pertrauką, esant 70 % amplitudei. Suardytos bakterijos centrifuguojamos „Beckman“ centrifuga, naudojant JA-20 rotorių, 25 min., 18000 aps./min. greičiu, +4°C temperatūroje.

Supernatantas gryninamas metalo chelatinės chromatografijos būdu naudojant kolonėlę, užpildytą chelatine sefaroze su imobilizuotais Ni<sup>+2</sup> jonais. Baltymas iš kolonėlės eliuojamas didinant imidazolo koncentraciją iki 0,5 M (naudojant gryninimo buferius A ir B). Koncentracija nustatoma Bradfordo metodu (Bradford, 1978). Chromatografijos frakcijos analizuojamos baltymų elektroforezės gelyje.

Remiantis kompiuterio ir gelio analizės duomenimis, frakcijos, kurios turi baltymo, yra sujungiamos ir per naktį vykdoma dializė fosfatiniame saugojimo buferiniame tirpale. Vėliau baltymas filtruojamas pro 0,2 μm PVDF filtrą su polipropilenu, išpilstomas nedideliais kiekiais ir užšaldomas -80°C temperatūroje.



### Šiluminio poslinkio metodas (angl. *Fluorecent Thermal Shift Assay*)

Šiam metodui atlikti pasiruošiami 12-os skirtingų koncentracijų Hsp90 slopiklio ICPD 47 (4-chloro-6[5-(4-etoksifenil)-1,2,3-tiadiazol-4il]benzeno-1,3-dioliu) tirpalai ir baltymo su ANS dažų tirpalas (3 lentelė). 20 mM koncentracijos ligando tirpalas skiedžiamas naudojant DMSO tam, kad visuose galutiniuose mėginiuose būtų išlaikoma vienoda DMSO koncentracija (3 lentelė, C<sub>1</sub> eilutė). Pirmosios koncentracijos tirpalai skiedžiami po 25 kartus, naudojant fosfatinį buferį (3 lentelė, C<sub>2</sub> eilutė). Gautos koncentracijos ligando tirpalai sumaišomi su baltymo tirpalu santykiu 1:1 (3 lentelė, C<sub>3</sub> eilutė). Baltymo koncentracija galutiniuose mėginiuose turi būti 10 μM. Kontrolei naudojamas baltymo ir fosfatinio buferio tirpalas be ICPD 47 (13-asis mėgintuvėlis).

Mėginių paruošimas pateikiamas 6 paveiksle:

I žingsnis: pasiruošiama 13-a tuščių mėgintuvėlių. Į visus juos išskyrus 1-ąjį pilama po 10 μL DMSO. Tuomet į 1-ąjį ir 2-ąjį įpilama po 20 μL ligando tirpalo. 2-ojo mėgintuvėlio turinys gerai išmaišomas, 20 μL šio tirpalo perkeliama į 3-ąjį mėgintuvėlį. Jo turinys gerai išmaišomas, 20 μL tirpalo perkaliama į 4-ąjį mėgintuvėlį. Kartojama iki 12-ojo mėgintuvėlio. Pastarojo turinys gerai išmaišomas ir 20 μL pašalinama kaip atliekos.

II žingsnis: pasiruošiama dar 12-a mėgintuvėlių. Į visus juos pilama po 48 μL fosfatinio buferio (P<sub>i</sub>). Iš pirmųjų 13-os mėgintuvėlių perkaliama po 2 μL tirpalų į mėgintuvėlius su P<sub>i</sub> buferiu.

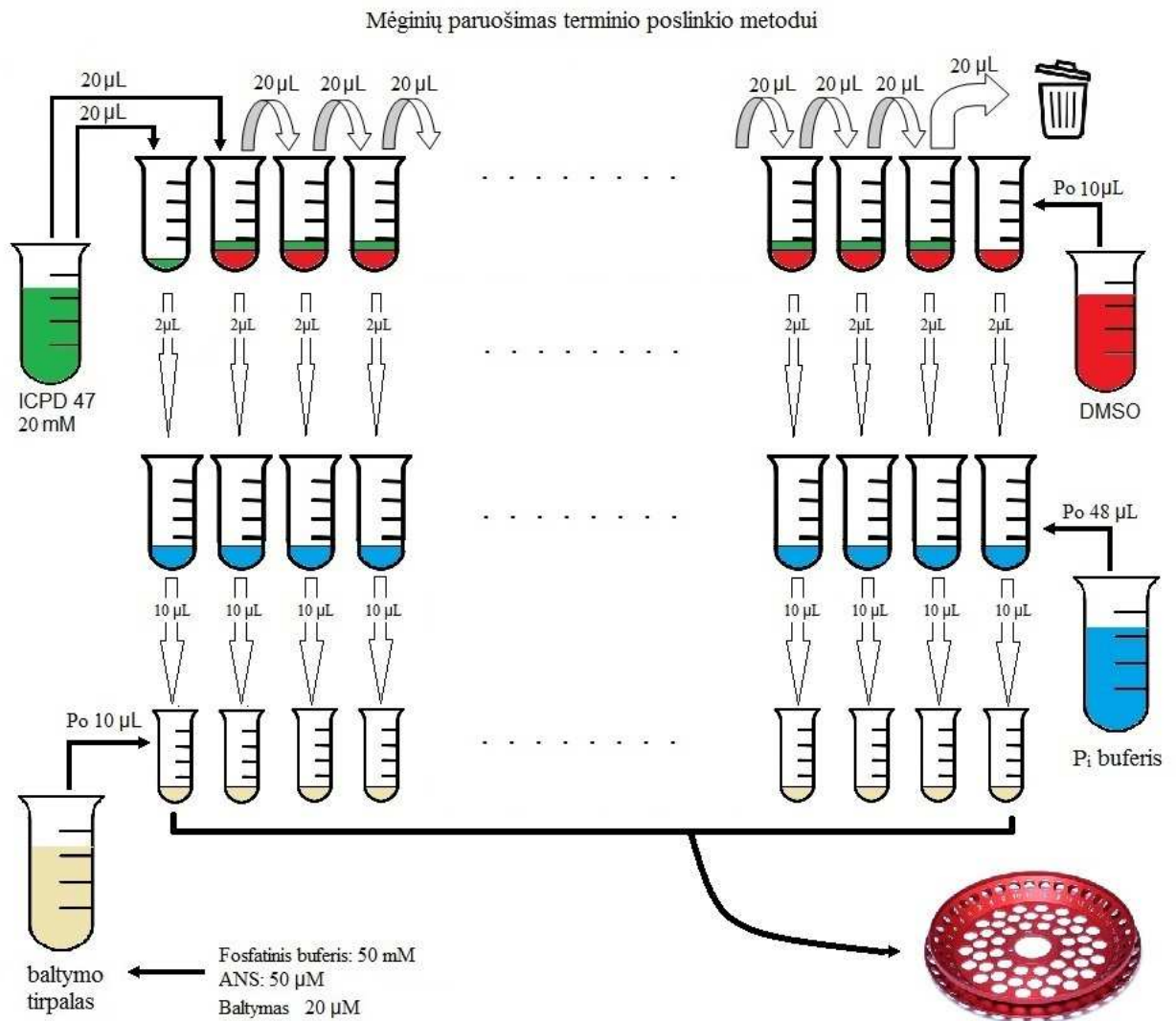
III žingsnis: pasiruošiama 13-a PGR mėgintuvėlių. Į visus juos pilama po 10 μL paruošto baltymo tirpalo (4 lentelė) ir po 10 μL tirpalo paruošto antrojo žingsnio metu. Paruošti mėginiai dedami į rotorių ir perkeliama į *Corbett research* realaus laiko PGR termociklerį ir įjungiama programa, kurios metu kas 30 sekundžių temperatūra keliama 0,5 °C. Tirpalai kaitinami nuo 25 iki 99°C.

**3 lentelė.** C<sub>1</sub> – ligando koncentracijos po pirmo skiedimo su DMSO; C<sub>2</sub> – ligando koncentracijos po skiedimo fosfatinio buferiu, C<sub>3</sub> – galutinės ligando koncentracijos sumaišius 10 μL baltymo tirpalo ir 10 μL C<sub>2</sub> ligando koncentracijos tirpalo.

Mėgn.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C <sub>1</sub>	20mM	13,3mM	8,9M	5,9mM	4mM	2,6mM	1,6mM	1,2mM	0,8mM	0,5mM	0,3mM	0,2mM
C <sub>2</sub>	800μM	533μM	355,6μM	237μM	158μM	105μM	70μM	47μM	31μM	21μM	14μM	0,01μM
C <sub>3</sub>	400μM	266μM	178μM	119μM	79μM	53μM	35μM	23μM	16μM	11μM	7μM	0,005μM

**4 lentelė.** Baltymo tirpalo sudėtis terminio poslinkio metodui.

Baltymo tirpalo sudėtis:	Koncentracija:
Fosfatinis buferis	50 mM
ANS	50 $\mu$ M
Baltymas	20 $\mu$ M



**6 pav.** Mėginių paruošimas terminio poslinkio metodui.

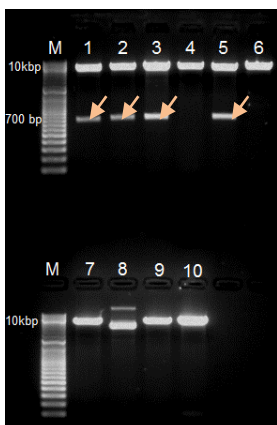
### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. *TbHsp90N*, *TcHsp90N* ir *TgHsp90N* DNR klonavimas

Sukonstruoti pET15b–6xHis–*TbHsp90N*, pET15b–6xHis–*TcHsp90N* ir pET15b–6xHis–*TgHsp90N* konstruktai (pav. 7), skirti *TbHsp90N*, *TcHsp90N* ir *TgHsp90N* genų raiškai *E.coli* bakterijose. Ar reikiama baltymą koduojanti seka įsiterpė į vektorių teisingai, buvo patikrinta vykdant konstrukto karpymą restrikcijos fermentais Xho ir NdeI ir atliekant DNR elektroforezę 1,5 % agarozės gelyje (pav. 8). Konstruktus karpant šiais fermentais gelyje tikimasi pamatyti iš vektoriaus iškirptą tikslinį baltymą koduojančios DNR segmentą ties maždaug 700 bazių porų žyme ir likusį vektorių tiek 10 kilobazių porų žyme.

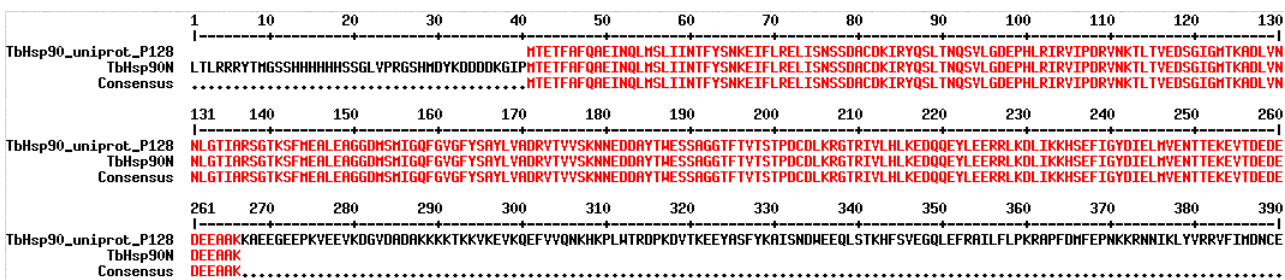


**7 pav.** pET15b–6xHis –*TbHsp90N*; pET15b–6xHis–*TcHsp90N*; pET15b–6xHis–*TgHsp90N* genetiniai konstruktai.



**8 pav.** *TgHsp90N* genetinio konstrukto karpymo restrikcijos fermentais *NdeI* ir *Xho* vaizdas 1,5% agarozės gelyje. M – DNR dydžio žymuo #SM0331, 1-10 – *TgHsp90N* genetinio konstrukto mėginiai karpyti restrikcijos fermentais. Rodyklėmis pažymėti DNR segmentai koduojantys *TgHsp90N* baltymo seką.

pET15b–6xHis–*TbHsp90N* konstrukto koduojama *TbHsp90N* rekombinantinio baltymo seka sutampa su *TbHsp90N* baltymo seka, paskelbta UniProtKB duomenų bazėje nuo 1 iki 276 aminorūgšties (identifikacijos nr. P12861). Nusekvenuoto konstrukto DNR seka buvo transliuota į aminorūgščių seką. Gauta baltymo seka palyginta su seka iš duomenų bazės, jos sutapo. Konstrukto koduojamo baltymo N-gale matoma 6 histidinių seka ir 22 pET15b vektoriaus koduojamų amino rūgščių (9 pav.).



**9 pav.** *TbHsp90N* baltymo sekos iš UniProt duomenų bazės ir sekvenuotos DNR sekos, transliuotos į baltymo seką, palyginimas.

pET15b–6xHis–*TcHsp90N* konstrukto koduojama *TcHsp90N* rekombinantinio baltymo seka sutampa su *TcHsp90N* baltymo seka, paskelbta UniProtKB duomenų bazėje nuo 1 iki 258 aminorūgšties (identifikacijos nr. P06660). Nusekvenuoto konstrukto DNR seka buvo transliuota į aminorūgščių seką. Gauta baltymo seka palyginta su seka iš duomenų bazės, jos sutapo. Konstrukto baltymo N-gale matoma 6 histidinių seka ir 22 pET15b vektoriaus koduojamų amino rūgščių. Taip pat sekos 117 amino rūgštis valinas (V) yra pakeista į aminorūgštį leuciną (L) dėl vieno nukleotido polimorfizmo. Remiantis informacija iš D.

Picard laboratorijos, iš kurios buvo gautos Hsp90 cDNR sekos, valino pakaita į leuciną įtakos baltymo struktūrai ar veikimui neturi (10 pav.).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
TcHsp90_uniprot_P066	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----														
TcHsp90N	XLTLRRRYTHGSSHHHHSSGLVPRGSHMDYKDDDDKGI	HTETFAFQAEINQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDRCDKIRYQSLTNRQAVLGDESHLRIRVYPPDKANKTLTLEDTGIGTKAELV													
Consensus	.....	HTETFAFQAEINQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDRCDKIRYQSLTNRQAVLGDESHLRIRVYPPDKANKTLTLEDTGIGTKAELV													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
TcHsp90_uniprot_P066	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----														
TcHsp90N	NNLGTIARSGTKAFMEALEAGGDMSHIGQFVGFYSAYLVADRVTVYVSKNNDDEARYTHSSAGGTFVYTPPCDLKRGTRIVLHLKEDQEQYLEERLKDILKXKHEFVIGYDIELMVEKATEKEVYTD	NNLGTIARSGTKAFMEALEAGGDMSHIGQFVGFYSAYLVADRVTVYVSKNNDDEARYTHSSAGGTFVYTPPCDLKRGTRIVLHLKEDQEQYLEERLKDILKXKHEFVIGYDIELMVEKATEKEVYTD													
Consensus	.....	NNLGTIARSGTKAFMEALEAGGDMSHIGQFVGFYSAYLVADRVTVYVSKNNDDEARYTHSSAGGTFVYTPPCDLKRGTRIVLHLKEDQEQYLEERLKDILKXKHEFVIGYDIELMVEKATEKEVYTD													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
TcHsp90_uniprot_P066	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----														
TcHsp90N	EDEAARATKNEEGEPKYEEVKDDAEEGEKKKTKVKEVYQEFVYQNKHKPLHTRDPKDYTKEEYAFYKAISSNDHEEPLSTKHFVSEGLQEFRAILFVPKRAPDFHFEPSKRNKIKLYVRRVFIHND	EDEAARATKNEEGEPKYEEVKDDAEEGEKKKTKVKEVYQEFVYQNKHKPLHTRDPKDYTKEEYAFYKAISSNDHEEPLSTKHFVSEGLQEFRAILFVPKRAPDFHFEPSKRNKIKLYVRRVFIHND													
Consensus	.....	EDEAARATKNEEGEPKYEEVKDDAEEGEKKKTKVKEVYQEFVYQNKHKPLHTRDPKDYTKEEYAFYKAISSNDHEEPLSTKHFVSEGLQEFRAILFVPKRAPDFHFEPSKRNKIKLYVRRVFIHND													

10 pav. TcHsp90N baltymo sekos iš UniProt duomenų bazės ir sekvenuotos DNR, sekos transliuotos į baltymo seką, palyginimas

pET15b-6xHis-TgHsp90N konstrukto koduojama TgHsp90N DNR rekombinantinio baltymo seka sutampa su TgHsp90N baltymo seka, paskelbta UniProtKB duomenų bazėje nuo 1 iki 269 aminorūgšties (identifikacijos nr. S8F2Z8). Nusekvenuoto konstrukto DNR seka buvo transliuota į aminorūgščių seką. Gauta baltymo seka palyginta su seka iš duomenų bazės, jos sutapo. Konstrukto baltymo N-gale matoma 29 pET15b vektoriaus koduojamos amino rūgštys. Sekoskaitos metu nepavyko nusekvenuoti 6 histidinus koduojančios sekos ir dar 2 pET15b vektoriaus koduojamų amino rūgščių sekos (11 pav).

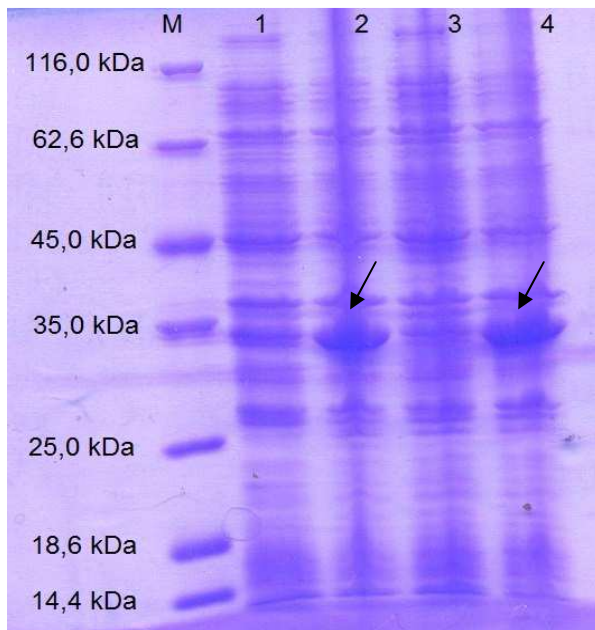
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
TgHsp90_uniprot_P066	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----														
TgHsp90N	XFYSSRILEHMDYKDDDDKGI	MADTETFAFNADIQQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNASDALDKIRYEAITDPEKLGKAERLFIRIVPNKQNTLTIEDDGIHTKAEIVNNLGTIARSG													
Consensus	.....	MADTETFAFNADIQQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNASDALDKIRYEAITDPEKLGKAERLFIRIVPNKQNTLTIEDDGIHTKAEIVNNLGTIARSG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
TgHsp90_uniprot_P066	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----														
TgHsp90N	TKAFMEALQAGGDISHIGQFVGFYSAYLVADKVTVYVSRHNDDEARYTHSSAGGTFVSKRAGQFENIVRGTRILHMKEDQTEYLEDORLKDILKXKHEFISFPVIELAVEKSVDKETESEDEEKPAE	TKAFMEALQAGGDISHIGQFVGFYSAYLVADKVTVYVSRHNDDEARYTHSSAGGTFVSKRAGQFENIVRGTRILHMKEDQTEYLEDORLKDILKXKHEFISFPVIELAVEKSVDKETESEDEEKPAE													
Consensus	.....	TKAFMEALQAGGDISHIGQFVGFYSAYLVADKVTVYVSRHNDDEARYTHSSAGGTFVSKRAGQFENIVRGTRILHMKEDQTEYLEDORLKDILKXKHEFISFPVIELAVEKSVDKETESEDEEKPAE													

11 pav. TgHsp90N baltymo sekos iš UniProt duomenų bazės ir sekvenuotos DNR sekos, transliuotos į baltymo seką, palyginimas

### 3.2. Gautų konstrukčių raiškos patikrinimas ir baltymų gryninimas

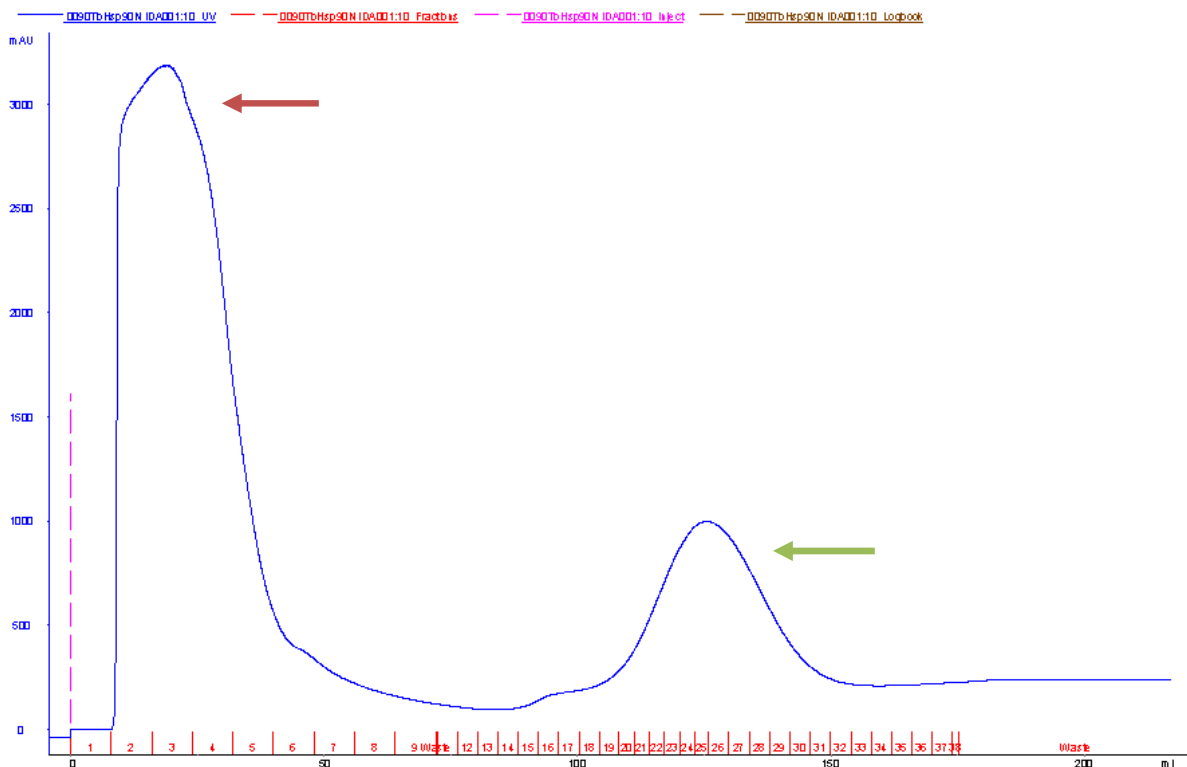
#### 3.2.1. TbHsp90N geno raiškos patikrinimas ir TbHsp90N baltymo gryninimas

TbHsp90N baltymo raiškos prieš ir po indukcijos patikrinimui buvo paruošti pavyzdžiai analizei poliarkrilamido gelyje (12 pav.). Pirmajame ir trečiajame takelyje yra pavyzdžiai prieš ląstelių indukciją, o antrajame ir ketvirtajame po. TbHsp90N baltymas yra 31,1 kDa dydžio – rodyklėmis šiek tiek žemiau 35 kDa žyminčia riba nurodyta padidėjusi TbHsp90N raiška. Kadangi gelyje buvo gerai matoma, jog TbHsp90N baltymas yra ekspresuojamas, toliau buvo vykdomas šio baltymo gryninimas metalo chelatinės chromatografijos būdu su IDA sefaroze ir imobilizuotais Ni<sup>+2</sup> jonais.

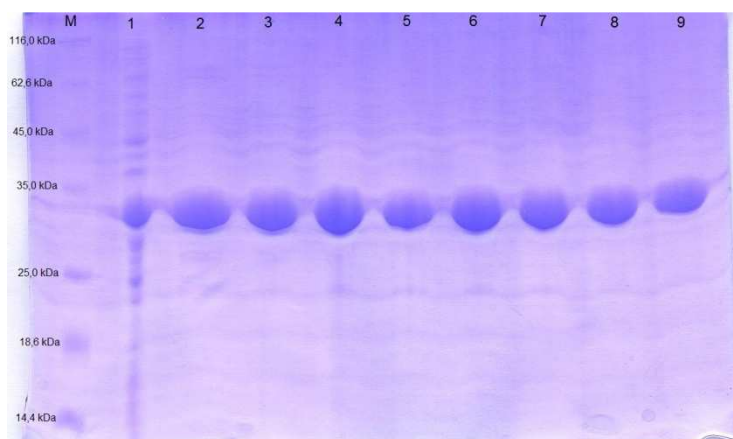


**12 pav.** *TbHsp90N* raiškos vaizdas poliakrilamido gelyje. M – baltymų dydžio žymuo #SM0431, 1-3 ląstelių biomasės mėginiai prieš indukciją, 2-4 – ląstelių biomasės mėginiai po indukcijos. Rodyklėmis pažymėta padidėjusi *TbHsp90N* baltymo raiška.

Remiantis chromatograma (13 pav.) nustatomos frakcijos, kuriose yra baltymo, tai – 21-30 frakcijos. Bradfordo (Bradford, 1978) metodu buvo nustatyta šiose frakcijose esančių baltymų koncentracija ir tuomet paruošti mėginiai analizei baltymų elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje (14 pav.).



**13 pav.** *TbHsp90N* baltymo gryninimo chromatograma. Vertikali ašis rodo sugertį prie 280 nm ilgio bangos, horizontali – frakcijas. Pirmasis pikas, pažymėtas raudona rodykle, rodo visus baltymus, kurie nesudarė ryšių su nikelio jonais ir yra pašalinami iš kolonėlės. Antrasis pikas, pažymėtas žalia rodykle, rodo *TbHsp90N* baltymo išplovimą iš kolonėlės didėjant imidazolo koncentracijai.



**14 pav.** *TbHsp90N* gryninimo metalo chelatinės chromatografijos metodu rezultatai baltymų elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje. M – baltymų dydžio žymuo #SM0431, 1 – supernatanto pavyzdys prieš baltymo gryninimą, 2-9 – *TbHsp90* frakcijos po gryninimo.

Atsižvelgiant į gelio rezultatus ir baltymo koncentracijas 21-30 frakcijose (5 lent.), nustatytas Bradfordo metodu (Bradford, 1978), 23-28 frakcijos buvo sujungtos ir dializuotos per naktį fosfatiniame saugojimo buferyje. Kitą dieną baltymas buvo perfiltruotas pro 0,2 μm PVDF filtrą su polipropilenu, išpilstytas nedideliais kiekiais ir užšaldytas -80°C temperatūroje. Iš viso buvo gauta 25 mg baltymo.

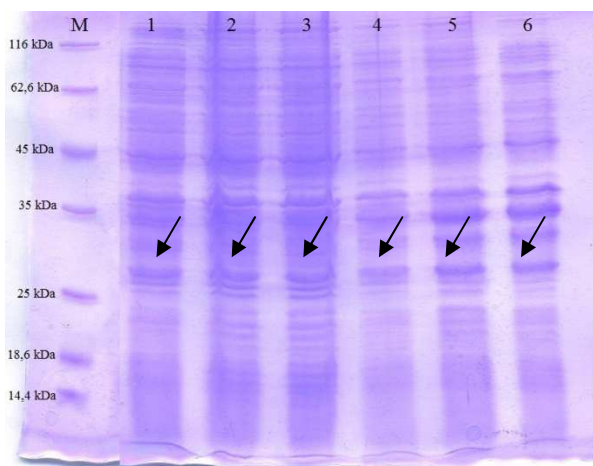
**5 lentelė.** *TbHsp90N* baltymo koncentracijos frakcijose.

Frakcijos Nr.	Baltymo koncentracija, mg/ml
21	0,78
22	1,4
23	1,7
25	3,05
27	2,3
28	1,76
29	1,3
30	0,79

### 3.2.2. *TcHsp90N* geno raiškos patikrinimas ir *TcHsp90N* baltymo gryninimas

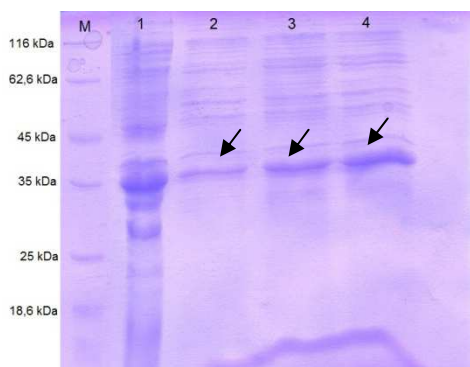
*TcHsp90N* baltymo raiškos prieš ir po indukcijos patikrinimui naudotuose kamienuose buvo paruošti pavyzdžiai analizei poliakrilamido gelyje. Padidėjusi raiška buvo pastebėta *E. coli* OneShotBL21(DE3)pLysS kamiene, todėl toliau buvo vykdomas šio baltymo gryninimas metalo chelatinės chromatografijos būdu. Grynas baltymas nebuvo gautas.

Galimai padidėjusi *TcHsp90* baltymo raiška buvo pastebėta *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus-RIL bakterijų kamiene (15 pav.), kuriame tikslinio baltymo raiškai indukuoti buvo naudotas 1mM IPTG, o biomasė buvo auginta 18°C temperatūroje per naktį. 1,3 g biomasės buvo panaudota bandomajam gryninimui metalo chelatinės chromatografijos būdu pro mažą kolonėlę. Iš gelio galima spręsti, jog šiame kamiene vyksta tikslinio baltymo *TcHsp90N* raiška (16 pav.), todėl buvo užauginta daugiau biomasės naujam gryninimui.



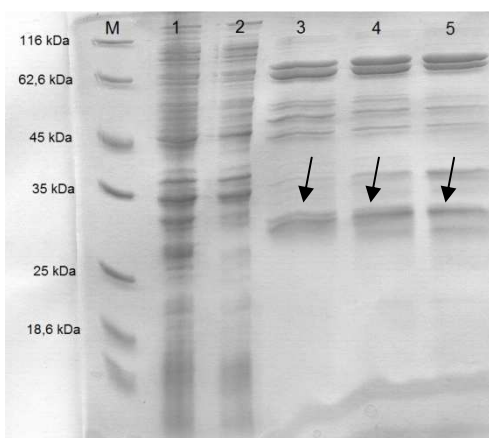
**15 pav.** *TcHsp90N* baltymo raiška poliakrilamido gelyje. M - Baltymų dydžio žymuo #SM0431, 1-3 – mėginiai prieš indukciją IPTG, 4-5 – mėginiai po indukcijos IPTG. Rodyklėmis ties ~30 kDa riba pažymėta padidėjusi tikslinio baltymo raiška.





**16 pav.** *TcHsp90N* baltymo gryninimo rezultatų vaizdas poliakrilamidiniame gelyje. M – baltymų dydžio žymuo #SM0431, 1 – supernatanto pavyzdys prieš baltymo gryninimą, 2-4 – *TcHsp90* frakcijos po gryninimo. Rodyklėmis pažymėta padidėjusi *TcHsp90N* baltymo raiška.

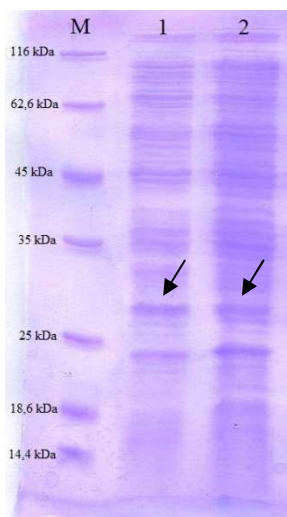
Antrąjį kartą gryninimui buvo panaudota 3,65 g biomasės. Deja chromatograma nerodė aiškų baltymo piko, geliui buvo pasirinktos 15, 16 ir 17 frakcijos (17 pav.). Iš gelio matoma, jog nepavyko išgryninti švaraus *TcHsp90N* baltymo.



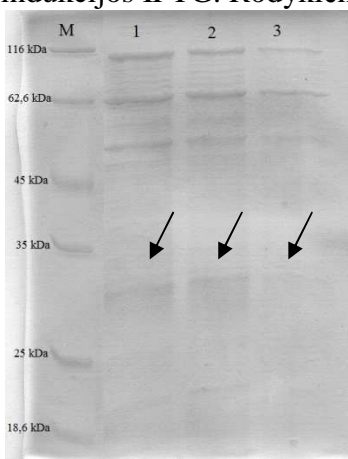
**17 pav.** Antrojo *TcHsp90N* gryninimo rezultatų vaizdas poliakrilamidiniame gelyje. M - baltymų dydžio žymuo #SM0431, 1 – supernatanto pavyzdys prieš baltymo gryninimą, 2 – nespecifiniai baltymai, 3-4 – *TcHsp90N* frakcijos po gryninimo.

### 3.2.3. *TgHsp90N* geno raiškos patikrinimas ir *TgHsp90N* baltymo gryninimas

*TgHsp90N* baltymo raiškos prieš ir po indukcijos patikrinimui naudotuose kamienuose buvo paruošti pavyzdžiai analizei poliakrilamido gelyje (18 pav.). *E. coli* Rosseta2 (DE3) kamieno buvo matoma galimai padidėjusi baltymo raiška, todėl buvo atliktas gryninimas metalo chelatinės chromatografijos būdu (19 pav.). Baltymo gauti nepavyko. *E. coli* One shot BL21(DE3) Star ir Shuffle T7 Express Competent kamienuose padidėjusios raiškos nebuvo nustatyta.



**18 pav.** *TgHsp90N* baltymo raiška *E. coli* Rosseta2 (DE3) kamiene. M - baltymų dydžio žymuo #SM0431, 2 – mėginys paimtas prieš indukciją IPTG, 3 – mėginys paimtas po indukcijos IPTG. Rodyklėmis ties ~30 kDa riba pažymėta galima baltymo raiška.



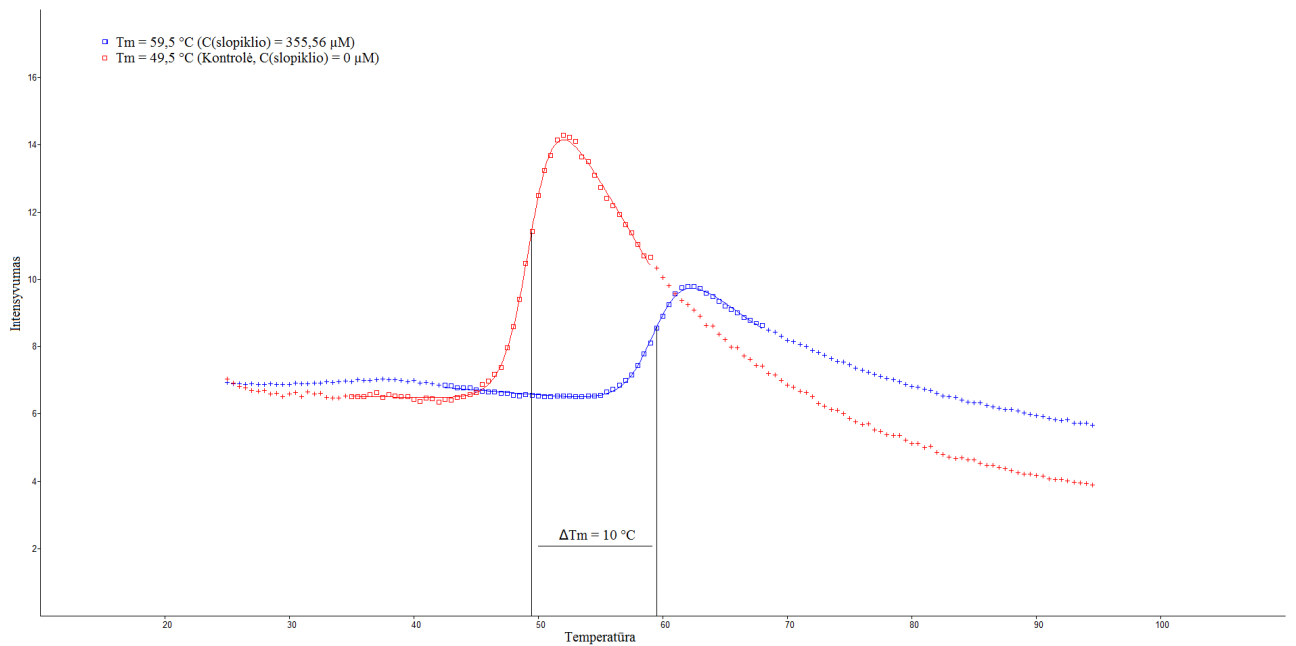
**19 pav.** *TgHsp90N* gryninimo vaizdas gelyje. M - baltymų dydžio žymuo #SM0431, 1-3 baltymo frakcijos. Rodyklėmis ties ~30 kDa riba pažymėta, kur turėtų būti matomas baltymo raiškos padidėjimas.

### 3.3. *TbHsp90N* baltymo charakterizavimas

#### 3.3.1. *TbHsp90N* ir žmogaus *Hsp90αN* baltymų slopinimo ICPD47 slopikliu palyginimas naudojant terminio poslinkio metodą

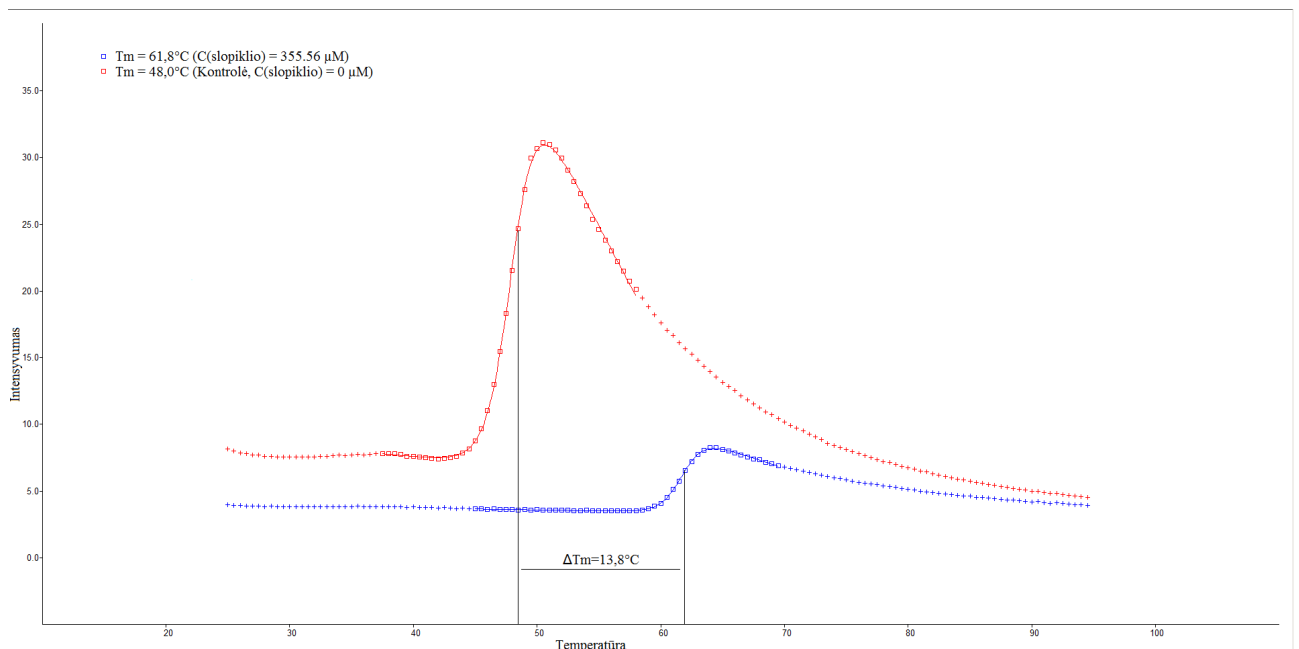
Terminio poslinkio metodas buvo naudojamas palyginti *TbHsp90N* ir žmogaus *Hsp90αN* baltymų slopinimą ICPD 47 slopikliu.

Pusė *TbHsp90N* baltymo kiekio tirpale, kuriame nėra slopiklio, denatūruoja 49,5 °C temperatūroje. Esant 355,6 μM ICPD 47 koncentracijai pusė šio baltymo kiekio denatūruoja 59,5 °C temperatūroje (20 pav.). Toks temperatūros pokytis įrodo, jog *TbHsp90N* baltymas sudaro ryšius su ICPD 47 slopikliu.



**20 pav.** *TbHsp90N* baltymo denatūravimo temperatūra su slopikliu ir be jo.  $\Delta T_m$  nurodo skirtumą tarp šių denatūravimo temperatūrų.

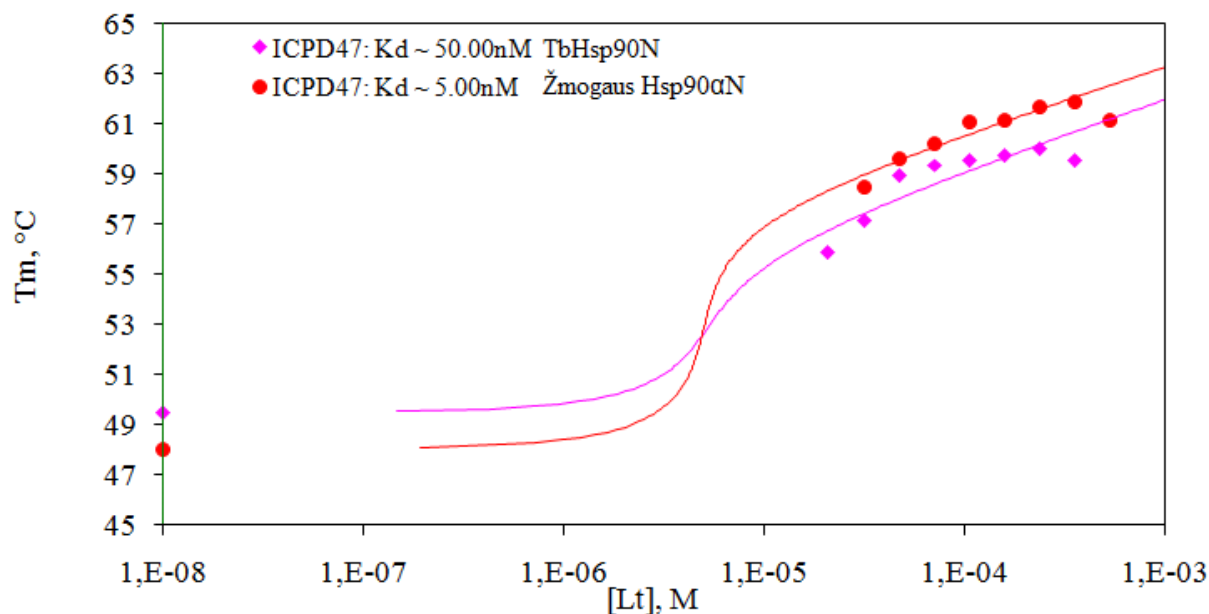
Pusė žmogaus Hsp90 $\alpha$ N baltymo tirpale, kuriame nėra slopiklio, denatūruoja 48 °C temperatūroje. Esant 355,6  $\mu$ M ICPD 47 koncentracijai pusė šio baltymo kiekio denatūruoja 61,8 °C temperatūroje (21 pav.). Denatūravimo temperatūros pokytis įrodo, kad žmogaus Hsp90 $\alpha$ N baltymas taip pat sudaro ryšius su ICPD 47 slopikliu.



**21 pav.** Žmogaus Hsp90 $\alpha$ N baltymo denatūravimo temperatūra su slopikliu ir be jo.  $\Delta T_m$  nurodo skirtumą tarp šių denatūravimo temperatūrų.

Palyginus baltymo denatūravimo temperatūras kontroliniame tirpale ir tirpale su ligandu apskaičiuota, kad *TbHsp90N* baltymo denatūravimo temperatūra skiriasi 10 °C, o žmogaus Hsp90αN 13,8 °C . Aukštesnė denatūravimo temperatūra leidžia daryti išvadą, jog ICPD 47 slopiklis jungiasi su žmogaus Hsp90αN baltymu stipriau nei su *TbHsp90N* baltymu.

22-ame paveikslėlyje pavaizduota įvairių ligando koncentracijų įtaka *TbHsp90N* ir žmogaus Hsp90αN baltymų denatūravimo temperatūrai.



**22 pav.** Baltymų *TbHsp90N* ir žmogaus Hsp90αN denatūravimo temperatūros priklausomybė nuo ligando ICPD 47 koncentracijos tirpale. Disociacijos konstantos ( $K_d$ ) nurodo ligando polinkį atsiskirti nuo baltymo.

ICPD 47 ligando ir *TbHsp90N* baltymo disociacijos konstanta (~50,00 nM) yra didesnė nei šio ligando ir žmogaus Hsp90αN disociacijos konstanta (~5,00 nM). Šis skirtumas leidžia teigti, kad ICPD 47 ligandas slopina *TbHsp90N* baltymą silpniau nei žmogaus Hsp90αN baltymą.

## IŠVADOS

1. Gauti pET15b-6xHis-*TbHsp90N*, pET15b-6xHis-*TcHsp90N* ir pET15b-6xHis-*TgHsp90N* genetiniai konstruktai.
2. *TbHsp90N* raiškai naudotas *E. coli* bakterijų kamienas BL21(DE3)CodonPlus-RIL, auginimo temperatūra 37°C, IPTG koncentracija 1 mM, po indukcijos auginama 3 val.
3. *TcHsp90N* ir *TgHsp90N* raiškai naudotas naudotas *E. coli* bakterijų kamienas BL21(DE3)CodonPlus-RIL, auginimo temperatūra 18°C, IPTG koncentracija 1 mM, po indukcijos auginama per naktį.
4. Iš 6,15 g biomasės išgryninta 25mg *TbHsp90N* baltymo.
5. Nustatyta, kad *TbHsp90N* baltymą slopina ICPD 47 slopiklis.
6. ICPD 47 slopiklis stipriau slopina žmogaus Hsp90 $\alpha$ N baltymą nei *TbHsp90N* baltymą.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Botanikos ir genetikos katedra

AISTĖ DAGYTĖ

**Parazitinių Hsp90 baltymų N-galo domenų klonavimas, gryninimas ir charakteristika**

Genetikos bakalauro studijų kursinis darbas

**SANTRAUKA**

Bakalauro darbo metu buvo siekiama sukonstruoti ir išgryninti *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* ir *Toxoplasma gondii* Hsp90 baltymų N-galo domenų, kurie būtų tinkami tolesniems VU Biotechnologijos institute, Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje vykdomiems biofizikiniams baltymo – ligando sąveikos tyrimams. Darbo metu *TbHsp90*, *TcHsp90* ir *TgHsp90* dalys, koduojančios N-galo domenų, buvo įterptos į vektorių pET15b. Genetinių konstrukčių raiškai buvo panaudotas *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus-RIL kamienas. Buvo nustatyta, jog didžiausia *TbHsp90* baltymo raiška gaunama ląsteles auginant 3 valandas, 37°C temperatūroje LB terpėje po geno raiškos indukcijos 1mM IPTG. *TbHsp90N* baltymas buvo sėkmingai išgrynintas. *TcHsp90* ir *TgHsp90* baltymų raiška šiame kamieno labai nedidelė. *TcHsp90* ir *TgHsp90* baltymai nebuvo išgryninti. *TbHsp90N* baltymas buvo tirtas terminio poslinkio metodu, buvo nustatyta, kad *TbHsp90N* baltymas yra slopinamas ICPD 47 ligandu silpniau nei žmogaus Hsp90 $\alpha$ N baltymas.

VILNIUS UNIVERSITY  
Faculty of Natural Sciences  
Department of Botany and Genetics

AISTĖ DAGYTĖ

**Cloning, purification and characterisation of parasitic Hsp90**

**SUMMARY**

The aim of this research project was to clone and purify *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* N-terminal domains which would be suitable for further biophysical investigation in the Department of Biothermodynamics and Drug Design, which focuses on protein – ligand interactions. For this project the DNA coding for the terminal domains of the *TbHsp90*, *TcHsp90* and *TgHsp90* genes, were inserted into pET15b vector. For expression of these constructs *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL strain was used. The best expression of *TbHsp90N* protein was noticed while growing this construct for 3 hours at 37°C temperature in LB medium after induction with 1 mM IPTG. *TbHsp90* protein was successfully purified. *TcHsp90N* and *TgHsp90N* protein expression in this strain was very low. *TcHsp90N* and *TgHsp90N* proteins were not purified. *TbHsp90N* protein was analyzed using fluorescent thermal shift assay. Results suggested that ICPD 47 ligand inhibits *TbHsp90N* protein less than human Hsp90 $\alpha$ N.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ahn HJ, Kim S, Nam HO. Molecular cloning of the 82-kDa heat shock protein (Hsp90) of *Toxoplasma gondii* associated with the entry into and growth in host cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; Vol 311: 654-659.
2. Ahn HJ, Kim S, Nam HW. Molecular cloning of 82-kDa heat shock protein (HSP90) of *Toxoplasma gondii* associated with the entry and growth in host cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(3):654-9.
3. Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 2006; 440:1013-7.
4. Angel SO, Figueras MJ, Alomar ML, Echeverria PC, Deng B. *Toxoplasma gondii* Hsp90: potential roles in essential cellular processes of the parasite. *Parasitology* 2014; 141(9): 1138-1147.
5. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(4):655-81.
6. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(3): 607-623.
7. Borges JC, Ramos CH. Protein folding assisted by chaperones. *Protein peptide lett.* 2005; 12 (3): 257-61.
8. britannica.com [internetinė svetainė]. Sukurta: 1995-06-14 [atnaujinta: 2015-05-17, cituota: 2015-05-20]. Adresas: <http://www.britannica.com>
9. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998; 92, 351-366.
10. cdc.gov [internetinė svetainė]. Centers for disease control and prevention.
11. Chen B, Zhong D, Monteiro A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 2006; 7: 156.
12. Clayton J. Chagas disease 101. *Nature* 2010; 465(7301):S4-5.
13. Crevel G, Bates H, Huikeshoven H, Cotterill S. The *Drosophila* Dpit47 protein is a nuclear Hsp90 co-chaperone that interacts with DNA polymerase alpha. *J Cell Sci* 2001; 114 (Pt11): 2015-25.
14. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 79 (2); 1998; 129-68.



15. De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999; 11 (1): 1–12.
16. drugbank.ca [internetinė svetainė]. Sukurta: 2006-05-23 [atnaujinta: 2015-05-08, cituota: 2015-05-20]. Adresas: <http://www.drugbank.ca>
17. drugs.com [internetinė svetainė]. Sukurta: 1998-12-18 [atnaujinta: 2013-12-09, cituota: 2015-05-20]. Adresas: <http://www.drugs.com/mmx/melarsoprol.html>
18. Dutta R, Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:24-8.
19. ebs.tga.gov.au [internetinė svetainė]. Sukurta: 2000-04-27 [atnaujinta: 2015-03-10, cituota: 2015-05-19]. Adresas: <https://www.ebs.tga.gov.au/ebs/picmi/picmirepository.nsf/pdf?OpenAgent&id=CP-2013-PI-01016-1&d=2015051916114622412>
20. Fan CY, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell stress & chaperones* 8 (4), 2003; 309–16.
21. Graefe SEB, Wiesgigl M, Gaworski I, Macdonald A, Clos J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* Induces a Stress Response but No Stage Differentiation. *Recent Pat Biotechnol* 2013; 7(1):2-8.
22. Graefe SEB, Wiesgigl M, Gaworski I, Macdonald A, Clos J. Inhibition of Hsp90 in *Trypanosoma cruzi* Induces a Stress Response but No Stage Differentiation. *Eukaryot Cell* 2002; 936-943 p.
23. Haibo J, Amadou IH, Liang H, Wenqian C, Jing L, and Bo H. Heat shock protein 10 (Hsp10) in immune-related diseases: one coin, two sides. *Int J Biochem Mol Biol* 2011; 2(1): 47–57.
24. Hainzl O, Lapina MC, Buchner J, Richter K. The Charged Linker Region Is an Important Regulator of Hsp90 Function. *J Biol Chem* 2009 Aug 21; 284(34):22559-67.
25. Hessling M, Richter K, Buchner J. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16:287-93. <http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2001/trypanosomiasis/trypano.htm>
26. <http://www.ebi.ac.uk> [internetinė svetainė], The European Bioinformatics Institute, sukurta 1999-03-28, [atnaujinta 2014-03-06, cituota 2014-06-22]. [https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/T\\_cruzi/pictures/TrypcruziA M.jpg](https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/T_cruzi/pictures/TrypcruziA M.jpg)
27. Young JC, Moarefi I, Hartl FU. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 2001; 154, 267-273.

28. Jackson SE. Hsp90: function and structure. *Top Curr Chem* 2013; 328:155-240
29. Johnson BJ, Le TT, Dobbin CA, Banovic T, Howard CB, Flores FM, Vanags D, Naylor DJ, Hill GR, Suhrbier A. Heat shock protein 10 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator production. *J Biol Chem* 2005; 280(6):4037-47.
30. Johnson JL. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* 2012; vol 1823: 607-613.
31. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 2003; 452 (6956): 407-410.
32. Langousis G, Hill KL. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12(7): 505-518.
33. Li J, Buchner J. Structure, Function and Regulation of Hsp90 Machinery. *Biomed J* 2013; 36(3):106-117.
34. Li Z, Srivastava P. Heat-shock proteins. *Current Protocols in Immunology*, 2004; Appendix 1: Appendix 1T.
35. Lund PA. Molecular chaperones in the cell. Oxford University Press, 2001; Oxford.
36. mayoclinic.org [internetinè svetainè]. Sukurta: 1997-02-07 [atnaujinta: 2014-02-04, cituota: 2015-05-19]. Adresas: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/toxoplasmosis/basics/treatment/con-20025859>
37. Meyer JK, Shapiro TA. Potent Anti-trypanosomal Activities of Hsp90 Inhibitors in Vitro and in Vivo. *Jpn J Infect Dis* 2013.
38. Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Roe SM, Vaughan CK, Vlasic I, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *Embo J* 2004; 23:1402-10.
39. Mollapour M, Neckers L. Post-translation modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 2012; Vol 1823: 648-655.
40. Parasitesinhumans.org [internetinè svetainè]. Sukurta: 2009-11-12 [atnaujinta:2014-11-17, cituota: 2015-04-28]. Adresas: <http://www.parasitesinhumans.org/toxoplasma-gondii.html>
41. Pdbj.org [internetinè svetainè], supported by JST-NBDC and Institute for Protein Research IPR, Osaka University, sukurta 2009/03 [atnaujinta 2009/03/19, cituota 2014/06/01)

42. Pizarro JC, Hills T, Senisterra G, Wernimont AK, Mackenzie C, Norcross NR, Ferguson MAJ, Wyatt PG, Gilbert IH, Hui R. Exploring the *Trypanosoma brucei* Hsp83 Potential as a Target for Structure Guided Drug Design. *Plos Neglect Trop D* 2013; 7(10).
43. Ranford JC, Coates ARM, Henderson B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med* 2009; 2: 1–17.
44. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl UF, Moarefi I. Structure of TRP domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 2000;101:199-210.
45. Schulte WT, Akinaga S, Soga S, Sullivan W, Stensgard B, Toft D, Neckers LM. Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3(2): 100-108.
46. Sherman M, Multhoff G. Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2007, vol. 1113, p. 192-201.
47. Shiau AK, Harris SF, Southworth DR, Agard DA. Structural analysis of *E. coli* Hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell* 2006; 127:329-40
48. Stanford.edu [internetinė svetainė]. Stanford University; sukurta: 1985-10-04 [atnaujinta: 2015-03-23, cituota 2015-03-27]. Adresas: [http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/T\\_cruzi/](http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/T_cruzi/)  
Sukurta: 2009-01-04 [atnaujinta: 2015-04-27, cituota 2015-04-28]. Adresas: [http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/gen\\_info/faqs.html](http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/gen_info/faqs.html)  
sukurta: 2012-05-16 [atnaujinta: 2014-05-18, cituota: 2015 02 13]. Adresas <http://www.ulac.lt>
49. Thomas JG, Baneyx F. Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management: Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In Vivo. *J Bacteriol* 1998; 180 (19): 5165–72.
50. triatominae.tripod.com [internetinė svetainė]. Sukurta: 1994-09-29 [atnaujinta: 2015-01-16, cituota: 2015-04-27]. Adresas: <http://triatominae.tripod.com/>
51. ulac.lt [internetinė svetainė]. Vilnius: Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras;
52. Van Den Abbeele J, Claes Y, van Bockstaele D, Le Ray D, Coosemans M. *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* 1999; 118 (pt5): 469-478.

53. Vėbraitė B, Tamulionytė V, Paulavičiūtė-Baikštienė D, Barzdžiukas V. Toksoplazminis chorioretinitas (literatūros apžvalga ir klinikinis atvejis). *Medicinos teorija ir praktika* 2013; T.19 (Nr. 4), 373-378 p.
54. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones - cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Edit* 2002; 41 (7): 1098–113.
55. Wang Q, Sun W, Hao X, Li T, Su L and Liu X. Down-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein (Long Form) contributes to apoptosis induced by Hsp90 inhibition in human lung cancer cells. *Cancer Cell International* 2012.
56. Webster JP, Kaushik M, Bristow GC, McConkey GA. Toxoplasma gondii infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour?. *J Exp Biol* 2013; 216(1): 99–112.
57. Wegele H, Müller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004 151: 1–44.
58. who.int [internetinė svetainė]. World health organization; sukurta: 1998-06-05 [atnaujinta: 2007-06-22, cituota 2015-02-13]. Adresas <http://www.who.int> ; <http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm>.
59. Xu Z, Horwich AL, Sigler PB. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature* 1997; 388 (6644): 741–50.
60. Zhang H, Zhou C, Chen W, Xu Y, Shi Y, Wen Y, Zhang N. A Dynamic View of ATP-coupled Functioning Cycle of Hsp90 N-terminal Domain. *Sci Rep* 2015; 5:9542.
61. Zhao R, Davey M, Hsu YC, Kaplanek P, Tong A, Parsons AB, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt J, Boone C, Emili A, Houry WA. Navigating the chaperone network: An integrative map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperone. *Cell* 2005; 120:715-27.

## **PADĖKA**

Dėkoju dr. Daumantui Matuliui už suteiktą galimybę atlikti bakalauro darbą VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje.

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui David Daniel Timm ir darbo konsultantei Aurelijai Mickevičiūtei už suteiktas žinias, pagalbą ir kantrybę.

Taip pat dėkoju Vilmai Michailovienei už pagalbą atliekant baltymų gryninimo darbus ir dr. Vaidai Juozapaitienei už naudingus patarimus genų klonavimo ir biomasių auginimo srityse bei visam kolektyvui už draugišką aplinką.