

VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS FAKULTETAS
BIOFIZIKOS IR BIOCHEMIJOS KATEDRA

Mantas Zakas

Pagrindinių studijų programa Biochemija – 4 kursas

**Vėžio ligoje dalyvaujančių baltymų reptino ir šaperono
konstrukto Hsp90C gamyba bei stabilumo ir ligandų
jungimosi tyrimas**

Bakalauro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovas:

Dr. D. Matulis

Vilnius, 2011

SANTRUMPOS

APS	Amonio persulfatas
ANS	Anilinonaftalino sulfonatas
BSA	Jaučio serumo albuminas (bovine serum albumine)
DTT	Ditiotreitolis
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgšties dinatro druska
ELISA	Enzyme - Linked Immunosorbent Assay
GST	Gliutationo-S-transferazė
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalactopiranozidas
MES	2-(N-morfilino)etansulfoninė rūgštis
NDS	Natrio dodecilsulfatas
PIPES	Piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis)
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoridas
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletildiaminas
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

TURINYS

1. ĮVADAS.....	5
1.1 Reptin ir Agr2	5
1.2 Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90).....	5
2. LITERATŪROS APŽVALGA	6
2.1 Reptin apžvalga.....	6
2.2 Hsp90 apžvalga.....	7
2.3 Terminio poslinkio metodo apžvalga.....	10
2.4 Baltymo terminio destabilizavimo ligandais modelio apžvalga	11
3. METODAI.....	14
3.1 Biomasės auginimas ir baltymų ekspresija.....	14
3.2 Biomasės ardymas ir baltymų tirpumo tikrinimas	14
3.3 GST - Reptin baltymo gryninimas	14
3.4 Poli - His Reptin gryninimas	15
3.5 Hsp90MC ir Hsp90C gryninimas	15
3.6 ELISA.....	16
3.7 Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis	16
3.8 Western blot.....	17
3.9 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)	17
3.10 Plazmidinės DNR išskyrimas iš bakterijų, restrikcija ir ligacija	17
3.11 Terminio poslinkio metodas	18
3.12 Duomenų apdorojimas ir pateikimas	18
4 REZULTATAI	19
4.1 GST - Reptin baltymo gryninimas	19
4.2 Agr2 ir Reptin jungimosi charakterizavimas ELISA metodu	19
4.3 H1299 ląstelių transfekcija ir Western blot	20
4.4 Poli - His Reptin gryninimas	22

4.5 Reptin sąveikos su ATP tyrimas terminio poslinkio metodu	23
4.6 pET-15b-Hsp90MC plazmidės skaitymo rėmelio taisymas.....	25
4.7 Hsp90 C terminalinio domeno klonavimas	26
4.8 Hsp90 C gryninimas.....	26
4.9 Hsp90 MC gryninimas	27
4.10 Hsp90 C terminio stabilumo nustatymas esant įvairiems reagentams ir buferiams	28
4.11 Hsp90 MC terminio stabilumo nustatymas esant įvairiems reagentams ir buferiams	29
4.11 Hsp90 MC ir novobiocino jungimosi konstantos nustatymas	33
4.12 Hsp90 N terminalinio domeno ir Hsp90 MC fragmento jungimosi su ICPD62 palyginimas	35
IŠVADOS	37
SUMMARY	38
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	39

1. ĮVADAS

1.1 Reptin ir Agr2

Žmogaus baltymas Reptin (dar žinomas RuvBL2 pavadinimu), pasižymintis ATPaziniu ir DNR helikaziniu aktyvumu, įeina į histonų acetilinimo ir antrosios RNR polimerazės kompleksų sudėtį, bei sudaro stabilius kompleksus su įvairiais baltymais, vienas iš kurių yra p53. Kitas baltymas su kuriuo Reptin sudaro stabilų kompleksą yra Agr2. Biologinės jo funkcijos nėra iki galo aiškos, tačiau yra žinoma, kad šis baltymas gali inhibuoti p53. Dėl Reptin ir Agr2 sąveikos su p53 jie gali būti potencialūs vėžio terapijos taikiniai. Darbo tikslai bakalaurnio darbo metu:

- Iširti šių baltymų sąveikas *in vitro* ir *in vivo*.
- Charakterizuoti Reptin stabilumą esant įvairiems reagentams ir buferiams terminio poslinkio metodu

1.2 Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90)

Hsp90 yra ATPazinį aktyvumą turintis šaperonas, kuris yra labai smarkiai ekspresuojamas šoko sąlygomis ir vėžinėse ląstelėse, kurioms jis yra gyvybiškai svarbus. Tuo tarpu normaliose ląstelėse jis yra gerokai mažiau svarbus. Įrodyta, kad inhibavus jo ATPazinį aktyvumą, vietoj to, kad padėtų kitiems baltymams susisukti jis skatina jų ubikvitinizavimą ir skaidymą proteosomose. Dėl šių priežasčių jis yra laikomas vienu iš geriausių priešvėžinės terapijos taikinių. Hsp90 susideda iš trijų domenų: N, kuris pasižymi ATPaziniu aktyvumu ir yra atsakingas už dimerizaciją; M, per kurį vyksta sąveika su jo aptarnaujamais baltymais ir C, kuris taip pat atsakingas už dimerizaciją. Darbo tikslai bakalaurnio darbo metu:

- Klonuoti Hsp90 C terminalinio domeno geną
- Charakterizuoti Hsp90 C terminalinio domeno ir Hsp90 MC fragmento stabilumą esant įvairiems reagentams ir buferiams terminio poslinkio metodu
- Iširti Hsp90 C terminalinio domeno ir Hsp90 MC fragmento jungimąsi su slopikliais.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Reptin apžvalga

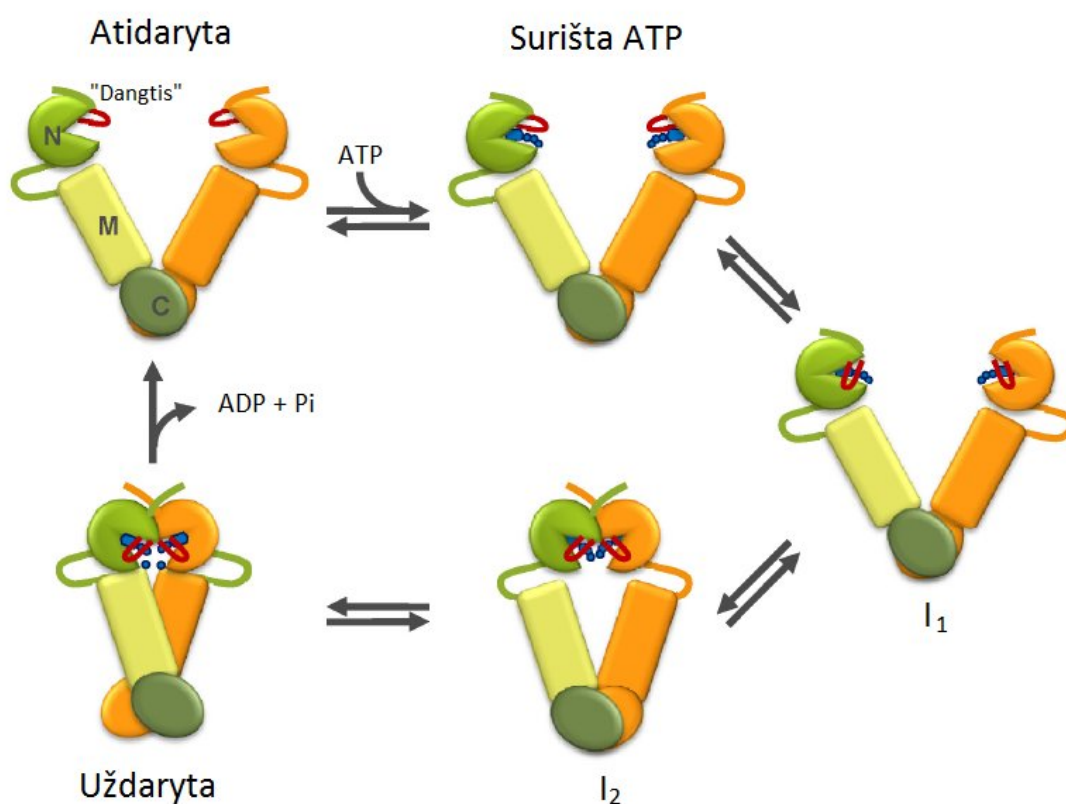
Reptin yra evoliucijos eigoje konservatyvi AAA⁺ baltymų superšeimai priklausanti DNR helikazė, turinti du (Walker A ir Walker B) ATP surišimo ir hidrolizės motyvus ir linkusi tirpale formuoti heksamerus. Yra parodyta, kad Reptin yra būtinas mielių, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ir *Xenopus laevis* gyvybingumui (Jha *et al*, 2009), bei *Danio regio* širdies formavimuisi embroninėje stadijoje (Rottbauer *et al*, 2002). Nors jo molekuliniai veikimo mechanizmai nėra išaiškinti, yra žinoma, kad Reptin yra būtinas daugeliui organizmams svarbių procesų. Reptin įeina į INO80 ir SWR1 chromatino permodeliavimo kompleksus, Tip60 histonų acetilinimo kompleksą, bei kitus panašius chromatino modifikacijos kompleksus, o tai rodo, jog Reptin dalyvauja įvairių baltymų transkripcijos epigenetinėje reguliacijoje (Gallant, 2007). Taip pat buvo parodyta, kad Reptin įeina į telomerazės komplekso atvirkštinės transkriptazės komponento sudėtį, nors kol kas jo funkcija ten šiuo metu yra neaiški (Baek, 2008). Be to, Reptin yra stipriai ekspresuojamas vėžinėse kepenų, šlapimo pūslės, odos (Huber *et al*, 2008), bei skrandžio (Li *et al*, 2010) vėžinėse ląstelėse. Nors Reptin nėra stipriai ekspresuojamas visose vėžio rūšyse, tačiau stipri jo ekspresija dažniausiai koreliuoja su prasta pacientų išgyvenamumo prognoze (Huber *et al*, 2008). Ląstelei esant hipoksinėse sąlygose yra skatinamas Reptin metilinimas ties 67 lizinu ir ši metilinta Reptin forma slopina hiposinio šoko atsaką ląstelėse (Lee *et al*, 2010), o tai yra labai svarbus faktas turint omenyje, kad vėžinės ląstelės dažnai ir yra hipoksinėse sąlygose. Dar vienas onkogeninis procesas, kuriame dalyvauja Reptin SUMOilinimas. SUMOilintas Reptin paleidžia signalą, kuris slopina KAI1, vieno pagrindinių metastazavimo supresorių, transkripciją ir taip skatina vėžinių ląstelių invaziją (Baek, 2006). *In vitro* vėžinėse ląstelėse sumažinus Reptin koncentraciją, naudojant antiprasminę RNR, buvo sustabdytas ląstelės ciklas ir indukuota apoptozė (Ménard *et al*, 2010).

Visi šie faktai rodo didžiulę Reptin svarbą tiek normaliai vystantis organizmui, bei normaliai funkcionuojant sveikoms ląstelėms, tiek vėžinėse ląstelėse. Dėl šių priežasčių Reptin gali būti potencialus priešvėžinės terapijos taikiny. Be to, kadangi Reptin dalyvauja epigenetiniame reguliavime ir yra telomerazės komplekso dalis, jo tyrimai gali suteikti naujų žinių apie senėjimą ir kitus ląstelėse vykstančius procesus.

2.2 Hsp90 apžvalga

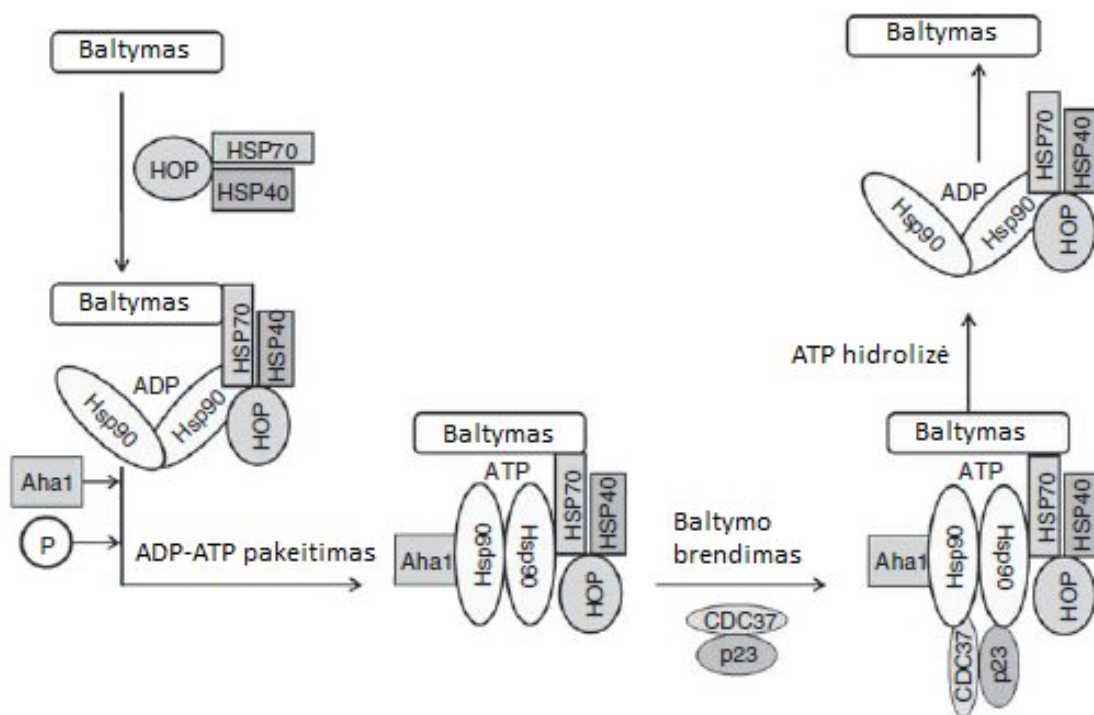
Šiluminio šoko baltymas 90 (Hsp90) yra evoliuciškai konservatyvus molekulinis šaperonas, žmoguje turinti dvi citozolines izoformas (Hsp90 α ir Hsp90 β), kurios abi fiziologinėmis sąlygomis tirpale egzistuoja dimerinėje formoje. Normaliose ląstelėse Hsp90 sudaro apie 1 - 2% visų ląstelės baltymų ir yra būtinas visų eukariotinių organizmų gyvybingumui, kadangi padeda daugeliui labai svarbių baltymų (tokių kaip kinazės, transkripcijos faktoriai, tubulinas, aktinas, NO sintazė) įgyti natyvias konformacijas. Streso sąlygomis ir vėžinėse ląstelėse Hsp90 ekspresija padidėja kelis kartus.

Hsp90 turi labai aiškiai apibrėžtą domeninę struktūrą, sudarytą iš N, M ir C domenų. N domenas pasižymi ATPazinių aktyvumu ir per lankstų, nestruktūrizuotą jungtuką yra sujungtas su M domenu. M domenas kartu su C domenu yra atsakingas už sąveiką su aptarnaujamais baltymais. C domenas taip pat yra atsakingas už Hsp90 dimerizaciją (Richardson *et al*, 2011). Kaip ir dauguma kitų molekulinio šaperono, kad padėtų kities baltymams įgauti ir/ar palaikyti natyvią konformaciją jis naudoja ATP hidrolizės energiją. Vieno hidrolizės ciklo metu, vykstant grįžtamiems konformaciniams pokyčiams, hidrolizuojamos dvi ATP molekulės. (Hahn, 2009)



2.1 pav. Hsp90 ATP hidrolizės ciklas (adaptuota iš Hahn, 2009)

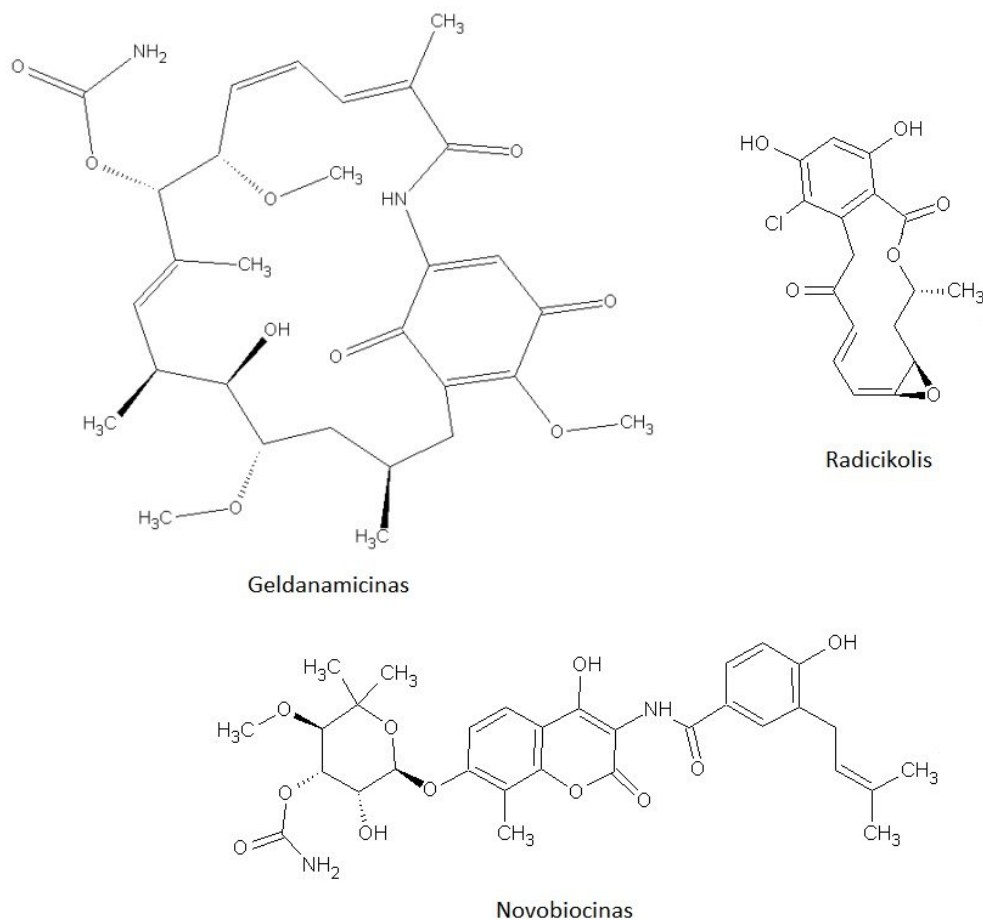
Dvi ATP molekulės jungiasi prie atidarytoje konformacijoje esančio dimero N domenuose esančių jungimosi kišenių. Prisijungus ATP "dangtį" sudaranti kilpa pasisuka maždaug 120 laipsnių ir uždaro ATP jungimosi kišenę. Tai paskatina N terminalinių domenų asociaciją ir tolesnius konformacinius pokyčius po kurių Hsp90 pereina į uždarytą konformaciją. Tuomet įvyksta ATP hidrolizė ir Hsp90 grįžta į atidarytą konformaciją, kad ciklą galima būtų kartoti iš naujo. (Hahn, 2009) Tam, kad Hsp90 atliktų savo funkciją yra reikalinga visa eilė košaperonų.



2.2 pav. Hsp90 ir košaperonų komplekso veikimas (adaptuota iš Mahalingam *et al*, 2009)

Baltymas, kuriam reikia įgyti natyvią konformaciją jungiasi prie košaperono Hsp70 ir jo kofaktoriaus Hsp40 komplekso, sujungto per adapterinį baltymą HOP. Šis kompleksas pakrauna baltymą į atidarytoje konformecijoje esantį Hsp90. Prie Hsp90 jungiasi kofaktorius Aha1, kuris skatina Hsp90 ATPazinį aktyvumą. Su Hsp90 surištos ADP molekulės pakeičiamos į ATP molekules. Įvyksta konformaciniai pokyčiai, kurių metu baltymui padedama įgyti natyvią konformaciją. Tuo pat metu prie komplekso prisijungia CDC37 ir p23. ATP hidrolizuojama ir natyvus baltymas difunduoja iš komplekso. Jei Hsp90 negali hidrolizuoti ATP (vietoj ATP yra prisijungęs slopiklį), baltymas yra ubiquitilinas ir nukreipiamas į proteosomą degradavimui. (Mahalingam *et al*, 2009)

Kadangi Hsp90 yra stipriau ekspresuojamas vėžinėse ląstelėse, nei normaliose, bei didelė dalis jo baltymų klientų yra onkogeniniai, Hsp90 yra laikomas vienu iš geriausių priešvėžinės terapijos taikinių (Allegra *et al*, 2011).

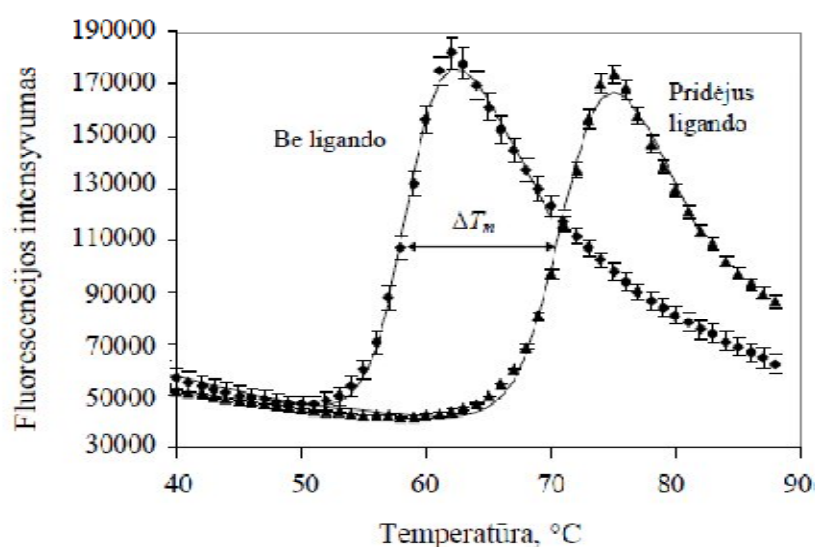


2.3 pav. Hsp90 slopiklių struktūros

Vienas pirmųjų atrastų Hsp90 slopiklių buvo gamtinis junginys geldanamicinas. Tačiau nepaisant jo priešvėžinio poveikio jis negali būti taikomas terapijoje dėl savo citotoksiškumo. Vis dėlto jo pagrindu buvo sukurti analogiški inhibitoriai, pasižymintys mažesniu citotoksiškumu. Kita didelė Hsp90 slopiklių grupė buvo sukurta radicikolio pagrindu. Nepaisant skirtingos struktūros, abi šios grupės jungiasi prie Hsp90 N domene esančios ATP kišenės ir slopina jo ATPazinį aktyvumą. Taip pat yra sukurta daug kitokių struktūrų slopiklių, tačiau dalies jų veikimo mechanizmai yra neaiškūs, nes neaišku ar jie jungiasi N domene ir slopina ATPazinį aktyvumą, ar veikia kitaip. (Janin, 2010) Vienas tokių junginių yra novobiocinas, silpnu priešvėžiniu aktyvumu pasižymintis antibiotikas. (Radanyi *et al*, 2009) Nustatyta, kad jis jungiasi Hsp90 C domene, todėl jo mechanizmas negali būti toks pat, kaip slopiklių besijungiančių prie Hsp90 N domeno.

2.3 Terminio poslinkio metodo apžvalga

Vienas patogiausių metodų matuoti baltymo stabilumą terminio poslinkio metodu. Pagrindiniai jo privalumai yra galimybė vienu metu tirti daug mėginių (priklausomai nuo aparato mėginių skaičius gali siekti kelis šimtus vienu metu) ir mažas reakcijos tūris (dažniausiai apie 20 μ l). Šiuo metodu terminis baltymo stabilumas matuojamas netiesiogiai. Į reakcijos mišinį yra pridama dažo, kuris vandeninėje aplinkoje fluorescuoja labai silpnai, o hidrofobinėje aplinkoje - stipriai. Reakcijos mišinį iš lėto šildant (1 $^{\circ}$ C per minutę) baltymas išsivynioja ir į tirpalą atveria savo hidrofobines zonas, prie kurių jungiasi dažas. Matuojant fluorescencijos intensyvumą gaunamos baltymo denatūracijos kreivės.

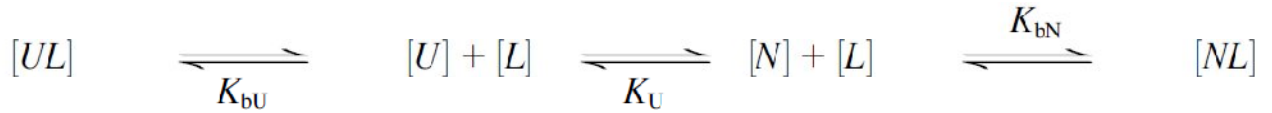


2.4 pav. Tipiškos baltymo denatūracijos kreivės gautos terminio poslinkio metodu (Matulis, 2008)

2.4 pav. parodytos kreivės gautos matuojant antrosios jaučio karboanhidrazės fluorescensiją. Matavimui kaip dažas naudotas anilinaftalino sulfonatas (ANS). Kadangi šio dažo fluorescencija mažėja keliant temperatūrą pradžioje fluorescencijos intensyvumas po truputį mažėja. Kai vyksta baltymo denatūracija ir jis išsivynioja, atsiveria paslėptos baltymo hidrofobinės zonos, prie kurių jungiasi ANS. Tada labai sustiprėja jo fluorescencija. Pilnai denatūravus baltymui pasiekiamas fluorescencijos maksimumas, o toliau keliant temperatūrą fluorescencija vėl ima silpnėti. (Matulis, 2008)

2.4 Baltymo terminio destabilizavimo ligandais modelio apžvalga

Ligandas gali stipriau jungtis prie baltymo natyvioje konformacijoje arba prie baltymo denatūruotoje konformacijoje. Kai ligandas jungiasi stipriau prie natyvioje konformacijoje esančio baltymo, baltymas yra termiškai stabilizuojamas. Priešingu atveju baltymas yra termiškai destabilizuojamas. Baltymo jungimąsi su ligandu galima pavaizduoti schema:



Čia $[UL]$ yra natyvaus baltymo ir ligando komplekso koncentracija, $[U]$ yra laisvo natyvaus baltymo koncentracija, $[L]$ yra laisvo ligando koncentracija, $[N]$ yra laisvo denatūravusio baltymo koncentracija, o $[NL]$ yra denatūravusio baltymo ir ligando komplekso koncentracija. K_U yra pusiausvyros konstanta aprašanti baltymo denatūravimą, darant prielaidas, kad baltymas denatūruoja tik nesusirišęs su ligandu ir yra tik baltymo konformacijos. K_U išreiškiamas:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} \quad (1)$$

K_{bN} ir K_{bU} atitinkamai yra ligando jungimosi konstantos prie natyvaus ir denatūravusio baltymo:

$$K_{bN} = \frac{[NL]}{[N][L]} \quad (2)$$

$$K_{bU} = \frac{[UL]}{[U][L]} \quad (3)$$

Pagal masės tvermės dėsnį, suminės baltymo (P_t) ir ligando (L_t) koncentracijos yra:

$$P_t = [N] + [U] + [NL] + [UL] \quad (4)$$

$$L_t = [L] + [NL] + [UL] \quad (5)$$

Denatūravusio baltymo dalis tirpale gali būti išreikšta kaip:

$$f_U = \frac{[U] + [UL]}{P_t} \quad (6)$$

Iš (1) - (6) lygčių gaunama suminės ligando koncentracijos išraiška kaip f_u , P_t , K_U , K_{bN} ir K_{bU} funkcijos:

$$L_t = (f_u + K_U(f_u - 1)) \times \left(\frac{P_t(K_{bN} + K_{bU}K_U)}{K_U(K_{bU} - K_{bN})} + \frac{1}{K_U K_{bU} - f_u(K_{bN} + K_{bU}K_U)} \right) \quad (7)$$

Šią lygtį galima supaprastinti darant prielaidą, kad kai temperatūra yra lygi baltymo denatūracijos temperatūrai, denatūravusio baltymo tirpale yra lygi pusei ($f_u = 0,5$):

$$L_t = (1 - K_{U,T_m}) \times \left(\frac{P_t}{2} \frac{K_{bN,T_m} + K_{bU,T_m}K_{U,T_m}}{K_{U,T_m}(K_{bU,T_m} - K_{bN,T_m})} + \frac{1}{K_{U,T_m}K_{bU,T_m} - K_{bN,T_m}} \right) \quad (8)$$

Prierašas T_m prie konstantų reiškia, kad tai yra atitinkama konstanta, tirpalo temperatūra yra lygi baltymo lydimosi temperatūrai.

Norint rasti ryšį tarp ligando koncentracijos ir baltymo denatūracijos temperatūros, reikia išreikšti pusiausvyros konstantų priklausomybę nuo temperatūros per termodinaminius parametrus. Darant prielaidą, kad jungimosi su ligandu ir baltymo denatūracijos šiluminės talpos yra nepriklausomos nuo temperatūros, baltymo denatūravimo pusiausvyros konstanta yra lygi:

$$K_U = e^{-\Delta_U G_T / RT} = e^{-(\Delta_U H_T - T \Delta_U S_T) / RT} = e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p(T - T_r) - T(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r))) / RT} \quad (9)$$

Čia $\Delta_U G_T$, $\Delta_U H_T$, $\Delta_U S_T$ ir $\Delta_U C_p$ atitinkamai yra baltymo denatūracijos laisvosios Gibso energijos, entalpijos, entropijos ir šiluminės talpos pokyčiai, o R yra universalioji dujų konstanta. T_r yra palyginamoji temperatūra, lygi baltymo denatūravimo temperatūrai, kai tirpale nėra ligando. Atitinkamai gaunamos ir ligando jungimosi prie natyvaus baltymo, bei ligando jungimosi prie denatūravusio baltymo jungimosi konstantų priklausomybės nuo temperatūros per termodinaminius parametrus:

$$K_{bN} = e^{-\Delta_{bN} G_T / RT} = e^{-(\Delta_{bN} H_T - T \Delta_{bN} S_T) / RT} = e^{-(\Delta_{bN} H_{T_0} + \Delta_{bN} C_p(T - T_0) - T(\Delta_{bN} S_{T_0} + \Delta_{bN} C_p \ln(T/T_0))) / RT} \quad (10)$$

$$K_{bU} = e^{-\Delta_{bU} G_T / RT} = e^{-(\Delta_{bU} H_T - T \Delta_{bU} S_T) / RT} = e^{-(\Delta_{bU} H_{T_0} + \Delta_{bU} C_p(T - T_0) - T(\Delta_{bU} S_{T_0} + \Delta_{bU} C_p \ln(T/T_0))) / RT} \quad (11)$$

Ištačius (9) - (11) lygtis į (8) lygtį, gauname:

$$L_t = \left(1 - e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p(T_m - T_r) - T_m(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r))) / RT_m} \right) \times \left[\frac{P_t}{2} \frac{e^{-(\Delta_{bN} H_{T_0} + \Delta_{bN} C_p(T_m - T_0) - T_m(\Delta_{bN} S_{T_0} + \Delta_{bN} C_p \ln(T_m/T_0))) / RT_m} + e^{-(\Delta_{bU} H_{T_0} + \Delta_{bU} C_p(T_m - T_0) - T_m(\Delta_{bU} S_{T_0} + \Delta_{bU} C_p \ln(T_m/T_0))) / RT_m}}{e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p(T_m - T_r) - T_m(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r))) / RT_m} \left(e^{-(\Delta_{bU} H_{T_0} + \Delta_{bU} C_p(T_m - T_0) - T_m(\Delta_{bU} S_{T_0} + \Delta_{bU} C_p \ln(T_m/T_0))) / RT_m} - e^{-(\Delta_{bN} H_{T_0} + \Delta_{bN} C_p(T_m - T_0) - T_m(\Delta_{bN} S_{T_0} + \Delta_{bN} C_p \ln(T_m/T_0))) / RT_m} \right)} + \frac{1}{e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p(T_m - T_r) - T_m(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r))) / RT_m} - e^{-(\Delta_{bU} H_{T_0} + \Delta_{bU} C_p(T_m - T_0) - T_m(\Delta_{bU} S_{T_0} + \Delta_{bU} C_p \ln(T_m/T_0))) / RT_m} - e^{-(\Delta_{bN} H_{T_0} + \Delta_{bN} C_p(T_m - T_0) - T_m(\Delta_{bN} S_{T_0} + \Delta_{bN} C_p \ln(T_m/T_0))) / RT_m}} \right] \quad (12)$$

Šią lygtį galima supaprastinti padarius prielaidą, kad ligandas daug stipriau jungiasi arba prie natyvos, arba prie denatūruotos baltymo formos. Kadangi nagrinėjamas baltymų terminės destabilizacijos modelis, daroma antroji prielaida. Tuomet galima teigti, kad $K_{bU} \gg K_{bN}$ ir $K_U K_{bU} \gg K_{bN}$. Padarius šią prielaidą (8) lygtis supaprastėja iki :

$$L_t = (1 - K_{U-T_m}) \left(\frac{P_t}{2} + \frac{2}{K_{bU-T_m} K_{U-T_m}} \right) \quad (13)$$

O (12) lygtis supaprastėja iki:

$$L_t = \left(1 - e^{-\left(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m \left(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T_m / T_r) \right) \right) / RT_m} \right) \quad (14)$$

$$\times \left[\frac{P_t}{2} + \frac{1}{e^{-\left(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m \left(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T_m / T_r) \right) \right) / RT_m} e^{-\left(\Delta_{bU} H_{T_0} + \Delta_{bU} C_p (T_m - T_0) - T_m \left(\Delta_{bU} S_{T_0} + \Delta_{bU} C_p \ln(T_m / T_0) \right) \right) / RT_m}} \right]$$

Tiek (12), tiek (14) lygtys yra transcendencinės T_m atžvilgiu, tačiau ją galima panaudoti baltymo jungimosi su ligandu konstantai nustatyti keičiant parametrus, kad pagal (14) lygtį gauta kreivė kuo geriau atitiktų eksperimentinius duomenis. (Cimpmperman *et al*, 2008)

3. METODAI

3.1 Biomasės auginimas ir baltymų ekspresija

Į skystą LB terpę su ampicilinu (100µg/ml) užsėjama viena transformuota *E. coli* BL21 (DE3) kolonija ir auginama per naktį 37°C temperatūroje purtant. Ši naktinė kultūra skiedžiama 50 kartų šviežia LB terpe ir auginama 37°C temperatūroje kol ji pasieks 0,4 - 0,6 optinį tankį, jį matuojant prie 600 nm bangos ilgio. Tada baltymo ekspresija indukuojama pridėjus 1 mM IPTG (kai buvo transformuota pDest15-Reptin) arba 0,02% arabinozės (kai buvo transformuota pDest17-Reptin) ir bakterijų kultūra auginama dar 3 valandas 20°C temperatūroje. Terpė centrifuguojama 6000 apsisukimų per minutę greičiu 15 minučių (Beckman centrifūga, JA10 rotorius). Supernatantas pašalinamas, o biomasė užšaldoma -20°C temperatūroje.

3.2 Biomasės ardymas ir baltymų tirpumo tikrinimas

Biomasė resuspenduojama ardymo buferyje ir ardoma ultragarsu 10 minučių, 1 minutės impulsais, tarp kurių daroma 1 minutės pertrauka. Biomasės lizatas centrifuguojamas 20 minučių 20000 apsisukimų per minutę greičiu (Beckman centrifūga, JA20 rotorius). Supernatantas atskiriamas nuo nuosėdų ir imamas jo mėginys SDS - PAGE elektroforezei. Netirpi frakcija 1 valandą maišant tirpinama 6 M karbamido tirpale. Ištirpinus imamas mėginys NDS - PAAG elektroforezei. Atliekama elektroforezė.

3.3 GST - Reptin baltymo gryninimas

Biomasė (bakterijos buvo transformuotos plazmide pDest15-Reptin) ardoma ardymo buferyje (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% sacharozės; 0,4 M NaCl, 0,5% Triton X100; 1 mM DTT; 1 mM benzamidino; 1 mM PMSF). Nuclecentrifugavus lizatą, į supernatantą pridedama 0,5 ml GST granulių ir 2 valandas švelniai purtoma 4°C temperatūroje. Lizatas centrifuguojamas 1 minutę prie 400 g 4°C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, o granulės du kartus plaunamos 10 ml didelio druskingumo buferio (20 mM Hepes pH 7,5; 1 M NaCl; 1 mM DTT; 1 mM benzamidino), du kartus 10 ml mažo druskingumo buferio (20 mM Hepes pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 1 mM benzamidino) ir vieną kartą 10 ml galutiniu buferio (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 120 mM NaCl; 1 mM DTT) kiekvieną kartą resuspenduojant buferyje, 5 minutes švelniai purtant 4°C

temperatūroje ir 1 minutę centrifūguojant prie 400 g 4°C temperatūroje. Tada granulės resuspenduojamos 1 ml galutinio buferio, pridedama 15 µl proteazės K ir inkubuojama 90 minučių 4°C temperatūroje švelniai purtant. Buferis centrifūguojamas 2 minutes prie 400 g 4°C temperatūroje, surenkamas supernatantas ir užšaldomas -80°C temperatūroje.

3.4 Poli - His Reptin gryninimas

Biomasė (bakterijos buvo transformuotos plazmide pDest17-Reptin) ardoma ardymo buferyje (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10% sacharozės, 0,4 M NaCl; 0,5% Triton X100; 2 mM merkaptioetanolio; 1 mM benzamidino; 1 mM PMSF). Lizatas užnešamas ant kolonėlės, užpildytos IDA-Sefaroze, kuri buvo prieš tai pakrauta nikelio jonais, leidžiant per ją NiCl₂ tirpalą ir nupusiausvyrinta gryninimo buferiu (toks pat kaip ir ardymo, tik be benzamidino, PMSF ir su 0,1% Triton X100). Nuo kolonėlės baltymas atkabinamas naudojant linijinį 6 kolonėlės tūrių imidazolo gradientą nuo 0,1 M iki 1M, tokiaime pačiame buferyje, kokiame buvo vykdomas lizavimas, tik be benzamidino ir PMSF. Frakcijos tikrinamos leidžiant NDS-PAAG elektroforezę. Frakcijos, kuriose yra Reptin apjungiamos, 4 valandas dializuojamos prieš buferį sudarytą iš 25 mM Tris-HCl pH 8,2; 0,1 M NaCl; 10% sacharozė ir 2 mM merkaptioetanolio, steriliai išpilstomos mažais tūriais ir užšaldomos -80°C temperatūroje.

3.5 Hsp90MC ir Hsp90C gryninimas

Biomasė (bakterijos buvo transformuotos plazmide pET-15b-Hsp90MC) ardoma ardymo buferyje (25 mM Hepes pH 7,5; 5% glicerolio; 0,1M KCl; 2 mM merkaptioetanolio; 0,08 M imidazolo; 1 mM PMSF). Gryninimas vykdomas taip pat, kaip poly - his Reptin, tik naudojamas imidazolo gradientas nuo 0,08 M iki 0,7 M ir apjungtos frakcijos per naktį dializuojamos prieš buferį sudarytą iš 25 mM Hepes pH 7,5; 1 mM EDTA; 5% glicerolio; 0,1% merkaptioetanolio. Kadangi baltymas po vienos kolonėlės dar nėra grynas, jo tirpalas užnešamas ant kolonėlės užpildytos DEAE-Sefaroze, kuri prieš tai buvo nupusiausvyrinta gryninimo buferiu (toks pat kaip dializės, tik be EDTA). Nuo kolonėlės baltymas atkabinamas naudojant linijinį NaCl gradientą nuo 0 M iki 0,4 M. Frakcijos, kuriose yra tikslinis baltymas apjungiamos ir per naktį dializuojamas prieš buferį sudarytą iš 25 mM Hepes pH 7,2; 50 mM NaCl; 2 mM DTT, steriliai išpilstomos ir užšaldomos -80°C temperatūroje. Hsp90C gryninamas per vieną IDA-Sefaroze užpildytą kolonėlę

(antros kolonėlės nereikia), taip pat kaip ir Hsp90MC, tik nėra naudojamas merkaptoetanolis ir į ardymo buferį pridedama 1% Triton X100, kad padidinti baltymo tirpumą.

3.6 ELISA

Į kiekvieną 96 šulinėlių lėkštelės šulinėlį (maksimalus tūris 200 µl) įpilama po 50 µL 0,1 M NaHCO₃ buferio (pH 8,6), kuriame yra 100 ng baltymo. Lėkštelė laikoma per naktį 4°C temperatūroje. Lėkštelė plaunama 6 kartus 200 µl PBS buferio (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 1,76 mM KH₂PO₄; pH 7,4), kuriame yra 0,1% Tween-20. Baltymu nepadengtos vietos blokuojamos įpilant į kiekvieną šulinėlį po 200 µl PBS, kuriame yra 0,1% Tween-20 ir 3% BSA ir laikant 1 valandą kambario temperatūroje. Iš šulinėlių pašalinamas blokavimo buferis ir įpilamas antrojo baltymo tirpalas blokavimo buferyje ir kambario temperatūroje inkubuojama 1 valandą. Lėkštelė plaunama 6 kartus taip pat, kaip ir prieš tai. Į kiekvieną šulinėlį įpilama 50 µl pirminio antikūnio tirpalo (skiesto 1000 kartų PBS buferiu su Tween-20 ir BSA) ir laikoma kambario temperatūroje 1 valandą. Lėkštelė vėl plaunama 6 kartus. Į kiekvieną šulinėlį įpilama 50 µl antrinio antikūnio, prie kurio kovalentiškai prijungta krienų peroksidazė, tirpalo (skiesto 1000 kartų PBS buferiu su Tween-20 ir BSA) ir laikoma kambario temperatūroje 1 valandą. Vėl plaunama 6 kartus. Tūrio santykiu 1:1 sumaišomi pirmas (1% liuminolio; 0,44% para kumaro rūgšties; 0,1 M Tris-HCl pH 8,8) ir antras (30% H₂O₂; 0,1 M Tris-HCl pH 8,8) liuminescensuojantys tirpalai ir į kiekvieną lėkštelės šulinėlį įpilama po 50 µl gauto mišinio. Lėkštelė nuskaitoma.

3.7 Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis

Pavyzdžiai paruošiami į 30 µl baltymo tirpalo pridedant 6 µl šiašiakartinio dažo ir pakaitinant 5 minutes 98°C temperatūroje. Švariai nuvalyti elektroforezės stikliukai sustatomi į stovelį ir į jų tarpą supilamas mišinys iš 2 ml 30% akrilamido tirpalo; 1,5 ml 1 M Tris pH 8,8; 60 µl 10% NDS; 1,91 ml H₂O; 30 µl 10% APS; 2 µl TEMED. Ant viršaus užpilamas 1 ml distiliuoto vandens. Geliui sustingus nupilamas vanduo, sumaišomas mišinys iš 400 µl 30% akrilamido tirpalo; 750 µl 1,5 M Tris pH 6,8; 30 µl 10% NDS; 1,8 ml H₂O; 15 µl 10% APS; 2 µl TEMED ir užpilamas ant apatinio gelio. Įstatomos "šukutės". Viršutiniam geliui sustingus surenkamas elektroforezės aparatas, užpilamas elektroforezės buferis (2,5 mM Tris pH 8,3; 190 mM glicino; 3,5 mM NDS), išimamos

"šukutės" ir suleidžiami mėginiai. Per gelį leidžiama 200 V įtampos elektros srovė, kol mėginių dažas nepasiekia gelio apačios.

3.8 Western blot

Vykdoma baltymų elektroforezė. Baltymai iš gelio ant nitroceliuliozinės membranos pernešami Biorad pagamintu prietaisu, pernešimo buferyje (25 mM Tris; 192 mM glicino; 20% metanolio), leidžiant 300 mA elektros srovę 90 minučių. Nepadengtos baltymais membranos vietos blokuojamos "pienu" (5% lieso pieno miltelių; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,76 mM MKH_2PO_4 ; pH 7,4; 0,1% Tween-20). Viena valandą membrana inkubuojama su "pienu" atskiestu pirminiu antikūniu (1:1000). Tada membrana 20 minučių plaunama PBS buferiu, keičiant jį kas 5 minutes. Viena valandą membrana inkubuojama su "pienu" atskiestu antriniu antikūniu, sulietu su krienų peroksidaze (1:1000). Membrana vėl plaunama taip pat. Ant membranos užnešamas liuminescensuojantis tirpalas ir liuminescencija fiksuojama fotoplokšte.

3.9 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Polimerazės grandininei reakcijai naudojama AB "Fermentas" pagaminta Pfu DNR polimerazė. Reakcijos mišinys padaromas pagal gamintojo rekomendacijas. Mišinys inkubuojamas termocikleryje: 30 sekundžių 95 °C temperatūroje, 60 sekundžių 55 °C temperatūroje, 3 minutes 68 °C temperatūroje, karojant šį ciklą 30 kartų. Po to reakcijos mišinys gryninamas AB "Fermentas" pagamintu PGR gryninimo rinkiniu pagal gamintojo rekomendacijas. Jei polimerazės grandininė reakcija naudojama taisyti skaitymo rėmelį, tai inkubacijos termocikleryje laikai yra kitokie: 30 sekundžių 95 °C temperatūroje, 60 sekundžių 55 °C temperatūroje, 7,5 minutės 68 °C temperatūroje, karojant šį ciklą 18 kartų. Taip pat prieš gryninant PGR produktą, jis valandą laiko inkubuojamas su DpnI restriktaze.

3.10 Plazmidinės DNR išskyrimas iš bakterijų, restrikcija ir ligacija

Visos šios procedūros atliekamos AB "Fermentas" pagamintais produktais ir rinkiniais pagal gamintojo instrukcijas.

3.11 Terminio poslinkio metodas

Plonasieniuose mėgintuvėliuose paruošiami baltymo tirpalo, ANS ir ligando ir/arba kitų reagentų ar buferių mišiniai. Galutinė baltymo koncentracija turi būti apie 10 μM , o ANS koncentracija - 50 μM . Galutinis tirpalo tūris turi būti 20 μl . Matuojama R-Corbert fluorimetru, temperatūrą keliant 1 $^{\circ}\text{C}$ per minutę greičiu nuo 25 $^{\circ}\text{C}$ iki 99 V.

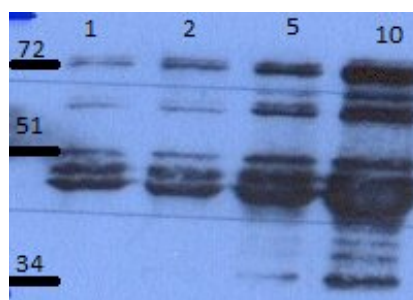
3.12 Duomenų apdorojimas ir pateikimas

Organinių junginių formulės pieštos ChemSketch programa. ELISA metodu gauti duomenys apdorojami Microsoft Office Excel programa. Klonavimas planuotas ir plazmidžių žemėlapiui sudaryti naudojantis ApE programa. Duomenys gauti terminio poslinkio metodu apdoroti Thermofluor++ ir Microsoft Office Excel programomis.

4 REZULTATAI

4.1 GST - Reptin baltymo gryninimas

Bakterijos buvo transformuotos DNR konstruktu, pagal kurį sintetinamas su GST (gliutatio-S-transferaze) sulietas Reptin. Tarp GST ir Reptin yra aminorūgščių seka, kurią atpažįsta ir kerpa proteazė K. Šis baltymas buvo prikabinamas prie GST granulių, jos nuplaautos, kad pašalinti kitus baltymus, o tada GST baltymas nukirptas su proteaze K ir pašalintas su granulėmis. Kad įsitikinti, kad buvo išgrynintas būtent Reptin baltymas buvo atliktas Western blot.



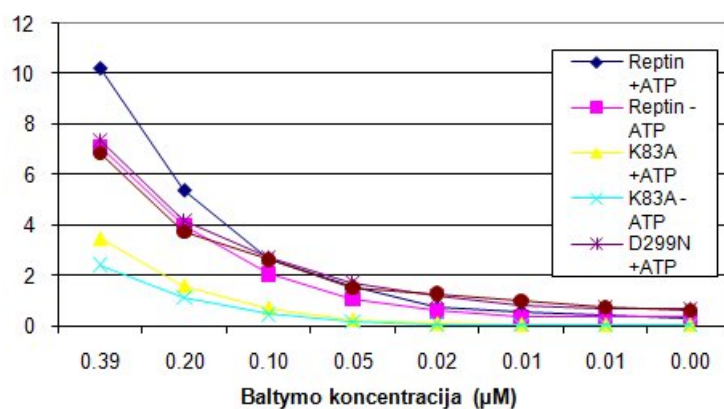
4.1 pav. Reptin gryninimo blotas. Takeliuose užnešta 1, 2, 5 ir 10 µl 0,83 mg/ml baltymo tirpalo.

Naudoti antikūniai prieš Reptin

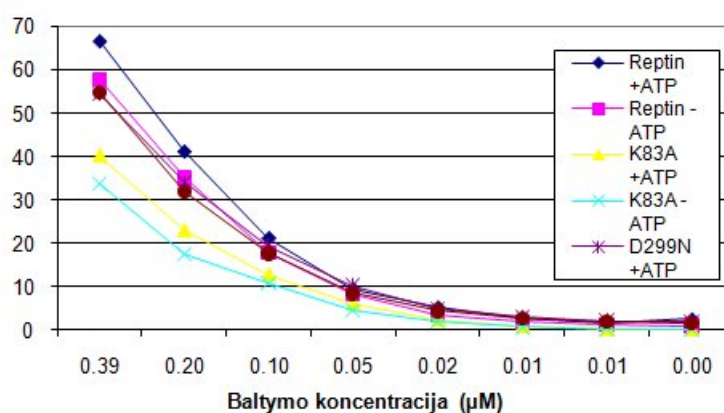
Reptin juostelės buvo tikimasi ties 51 kDa žyme. Nors matoma daugiau, nei viena juostelė, bet visas jas atpažįsta Reptin antikūniai. Analogiškai buvo išgryninti ir K83A, bei D299N Reptin mutantai.

4.2 Agr2 ir Reptin jungimosi charakterizavimas ELISA metodu

Buvo tirtas Agr2 ir laukinio tipo Reptin, bei dviejų jo mutantų (K83A ir D299N) jungimasis ELISA metodu.



4.2 pav. Reptin - Agr2 ELISA kambario temperatūroje



4.3 pav. Reptin - Agr2 ELISA 37 °C temperatūroje

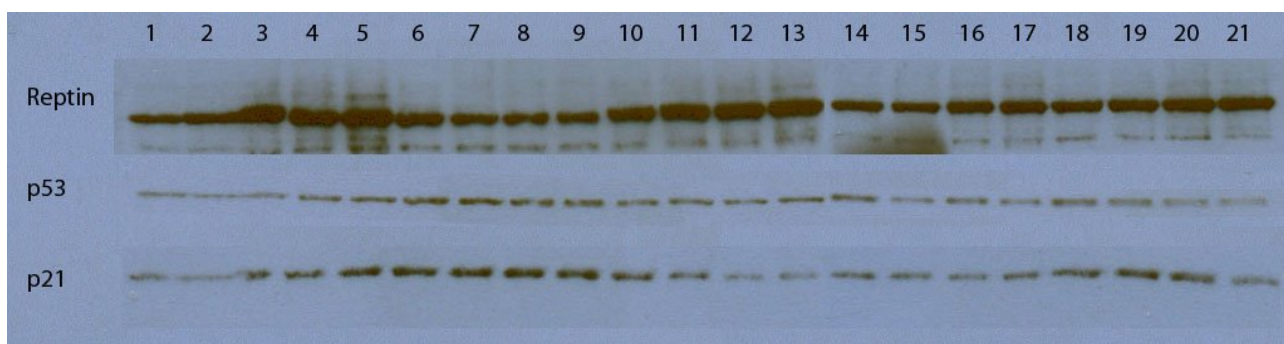
Nustatyta, kad su Agr2 geriausiai jungiasi laukinio tipo Reptin, o blogiausiai K83A mutantas; ATP buvimas buferyje ir 37 laipsnių temperatūra skatina jungimąsi.

4.3 H1299 ląstelių transfekcija ir Western blot

H1299 žmogaus vėžinių ląstelių linija buvo transfekuota DNR koduojančia p53, Agr2 ir Reptin (laukinio tipo ir K83A, bei D299N mutantų) genus ir jų reguliacines sekas. Ląstelės buvo inkubuojamos 37 °C temperatūroje 24 valandas mitybinėje LB terpėje, po to surinktos ir lizuotos įpylus šešiakartinio dažo ir pakaitinus 5 minutes 95 °C temperatūroje. Tada buvo leidžiamas NDS - PAAG gelis ir daromas Western blot naudojant antikūnius prieš Reptin, p53 ir p21.

4.1 lentelė. Transfekcijai panaudotos DNR kiekis (ng)

Nr.	p53	Reptin	K83A	D299N	Agr2	Balastinė DNR
1	50	-	-	-	-	1000
2	50	100	-	-	-	900
3	50	200	-	-	-	800
4	50	300	-	-	-	700
5	50	500	-	-	-	500
6	50	-	100	-	-	900
7	50	-	200	-	-	800
8	50	-	300	-	-	700
9	50	-	500	-	-	500
10	50	-	-	100	-	900
11	50	-	-	200	-	800
12	50	-	-	300	-	700
13	50	-	-	500	-	500
14	50	100	-	-	500	400
15	50	200	-	-	500	300
16	50	300	-	-	500	200
17	50	500	-	-	500	0
18	50	-	-	100	500	400
19	50	-	-	200	500	300
20	50	-	-	300	500	200
21	50	-	-	500	500	0



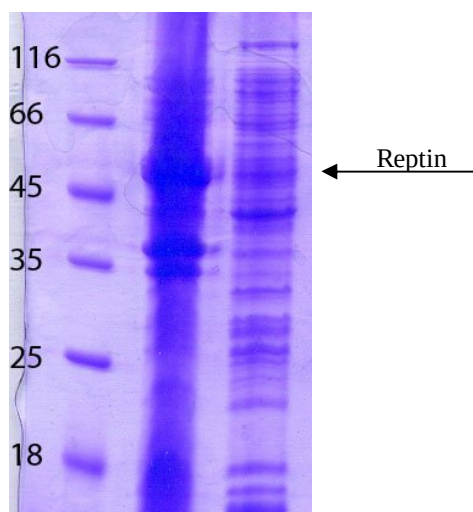
4.4 pav. Transfekuotų ląstelių lizatų Western blot. Naudoti antikūniai prieš Reptin, p53 ir p21

Iš Western blot matome, kad transfekuojant laukinio tipo Reptin ir D299N mutantu viduląstelinio Reptin kiekis auga proporcingai DNR kiekiui, tačiau K83A pastebimai neįtakoja viduląstelinio Reptin kiekio. Iš to galima daryti prielaidą, kad K83A mutantas yra nestabilus ląstelėje ir yra greitai suskaidomas. Agr2 geno transfekavimas kartu su Reptin genais gerokai sumažina viduląstelinio Reptin kiekio priklausomybę nuo transfekuojamo geno kiekio. Iš to galima spėti, kad Agr2 dalyvauja Reptin kiekio ląstelėje reguliavime. Didėjant viduląstelinio laukinio tipo Reptin koncentracijai didėja ir p53 koncentracija, bei jo indukuojamo p21 koncentracija didėja, o didėjant D299N mutanto koncentracijai, p53 ir p21 koncentracija mažėja. Kadangi p53 yra vienas iš

pagrindinių nuo vėžio saugančių baltymų, galima daryti prielaidą, kad D299N reptin mutacija gali netiesiogiai skatinti vėžio atsiradimą organizme. Bandymas buvo kartotas du kartus, gauti sutampantys rezultatai.

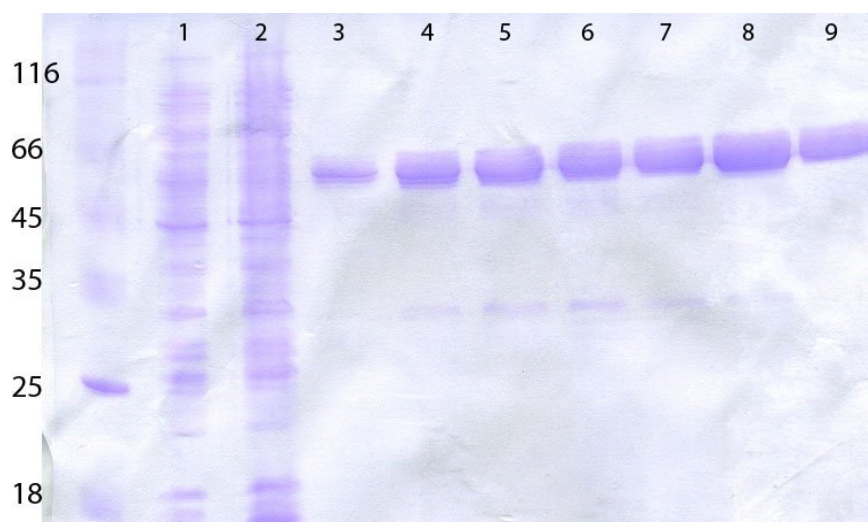
4.4 Poli - His Reptin gryninimas

Bakterijos buvo transformuotos DNR konstruktu, pagal kurį buvo sintetinamas Reptin baltymas, sulietas su polihistidinine uodegėle. Prieš gryninant baltymą, buvo patikrintas jo tirpumas.



4.5 pav. Reptin tirpumo nustatymas (pirmame takelyje netirpi frakcija, antrame - tirpi)

Kadangi didžioji dalis baltymo yra netirpi, buvo nuspręsta gryninti iš didelio kiekio biomasės (15 gramų). Reptin buvo gryninamas per IDA-Sefaroze užpildytą ir nikelio jonais pakrautą kolonėlę, naudojant imidazolo gradientą. Gryninimo buferyje buvo 10% sacharozės, kad išlaikyti baltymą tirpale. Po gryninimo gautos frakcijos buvo patikrintos NDS-PAAG elektroforeze.

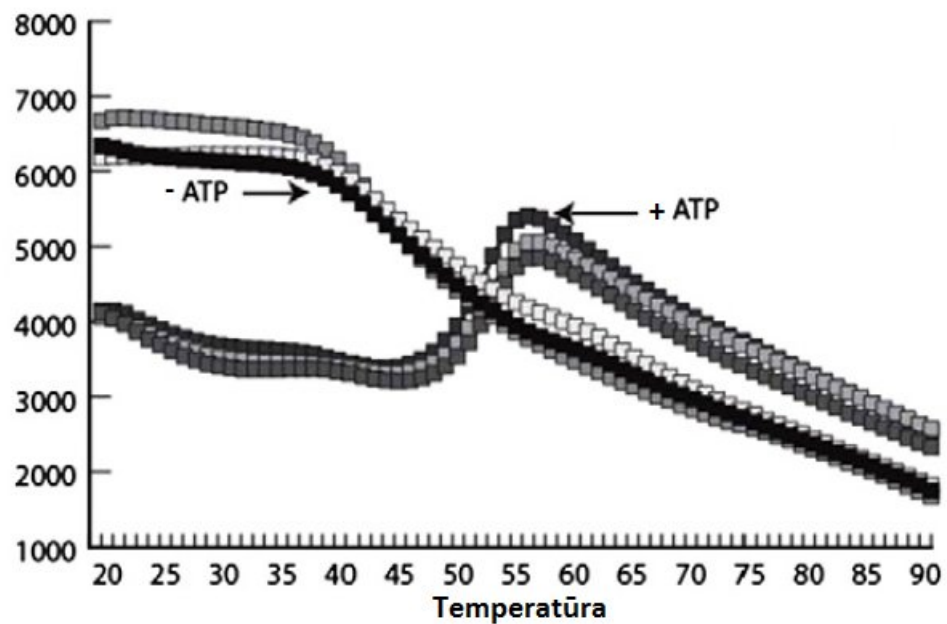


4.6 pav. Reptin gryninimas (pirmame takelyje negrynintas mėginys, antrame prašokimas, likusiuose frakcijos, kuriose yra Reptin)

Frakcijos apjungtos ir dializuotos per naktį, kad pašalinti imidazolą. Dializės metu visas Reptin iškrito į nuosėdas, todėl visas gryninimas buvo kartojamas iš naujo. Pakarotjus gryninimą dializė buvo vykdoma keturias valandas. Po jos dalis Reptin iškrito į nuosėdas. Tirpalas steriliai nufiltruotas, išpilstytas mažais tūriais ir užšaldytas -80°C temperatūroje.

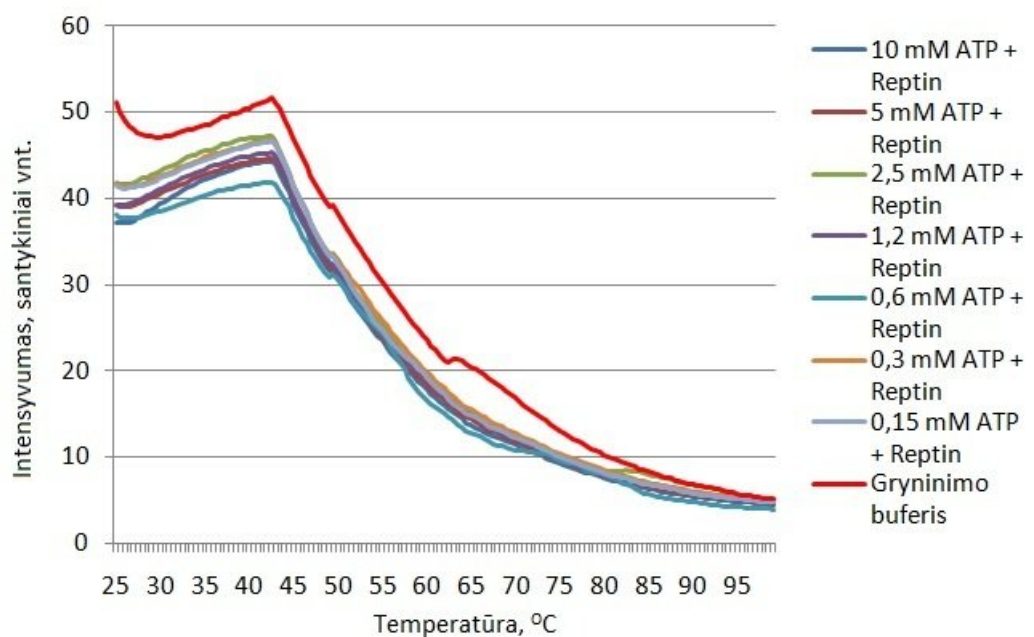
4.5 Reptin sąveikos su ATP tyrimas terminio poslinkio metodu

Kadangi Reptin pasižymi ATPaziniu aktyvumu, buvo nuspręsta įvertinti jo jungimąsi su ATP. Panašūs tyrimai jau buvo atlikti. (Maslon *et al*, 2010)



4.7 pav. Reptin išsivyniojimo kreivės esant ir nesant ATP (eksperimentas kartotas po tris kartus) (adaptuota iš Maslon *et al*, 2010)

Iš šių duomenų buvo padaryta išvada, kad tirpale nesant ATP Reptin net esant kambario temperatūrai yra konformacijoje, primenančioje denatūruotą, kai hidrofobinės sritys yra atsuktos į vandeninį tirpalą, o esant ATP Reptin suformuoja normalią globulę. Buvo atliktas panašus eksperimentas siekian įvertinti Reptin jungimąsi su ATP.

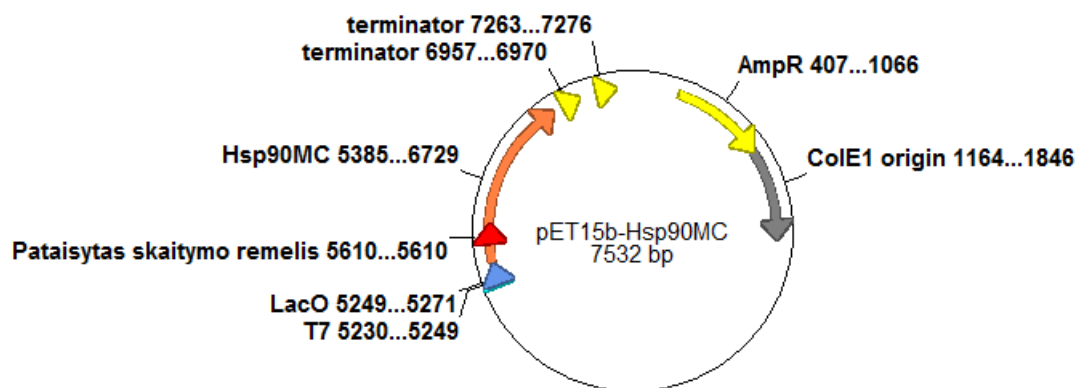


4.8 pav. Reptin ir ATP jungimosi tyrimas esant skirtingoms ATP koncentracijoms

Iš gautų duomenų matoma, kad net naudojant 10 kartų didesnę ATP koncentraciją, nei prieš tai minėtame straipsnyje, nematome globulės susiformavimo. Taip pat, kaip kontrolė, terminio poslinkio metodas buvo atliktas tik su buferiu naudotu gryninimo metu ir gauta labai panaši kreivė. Tai leidžia daryti išvadą, kad šias denatūracijos kreives greičiausiai lemia Triton X100, kuris buvo įdėtas į gryninimo buferį, kad padidinti baltymo tirpumą ir matyt nepasišalino nei gryninimo, nei dializės metu. Kadangi Triton X100 buvo naudojamas ir prieš tai minėtame straipsnyje gryninant baltymą, tai leidžia abejoti straipsnyje pateiktų duomenų kokybe.

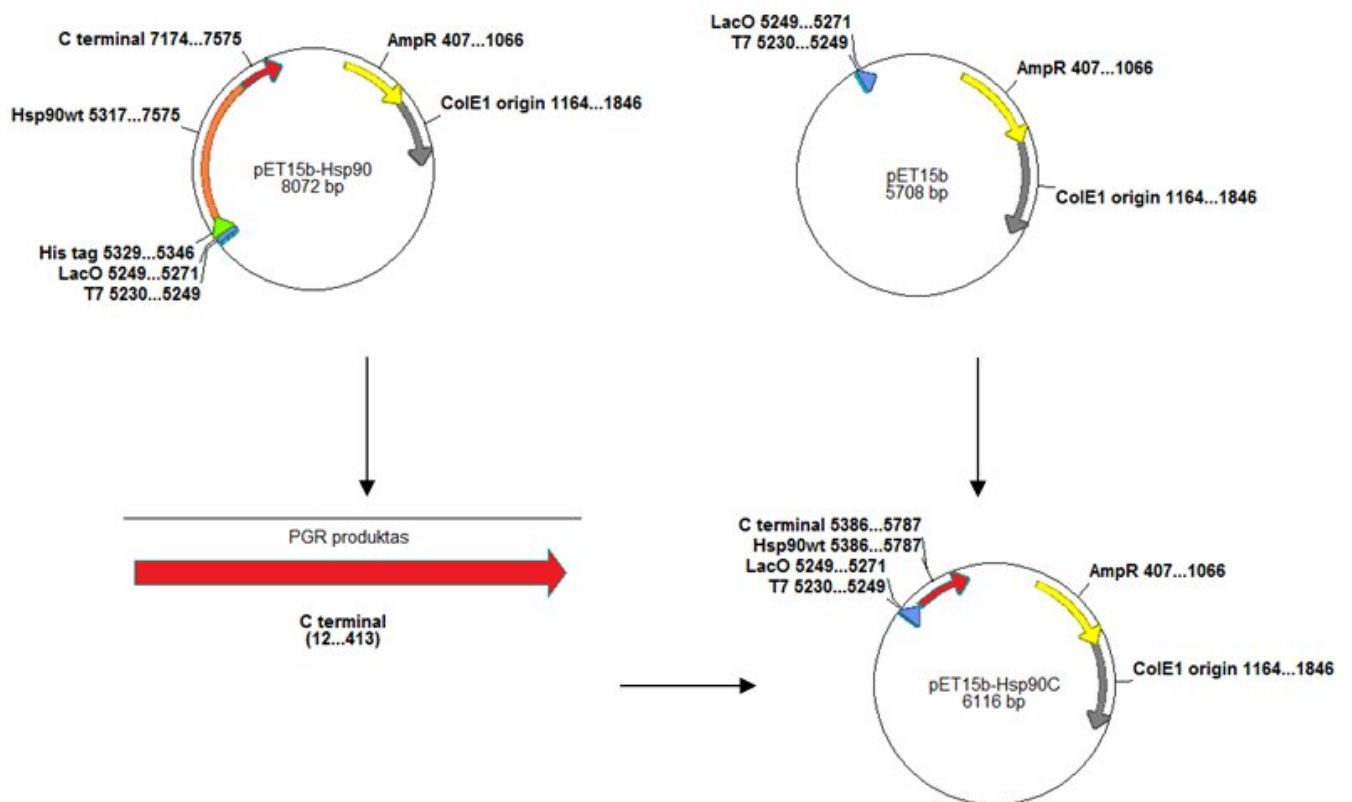
4.6 pET-15b-Hsp90MC plazmidės skaitymo rėmelio taisymas

Laboratorijoje turimas Hsp90 M ir C domenų koduojantis genetinis konstruktas (nuo 371 aminorūgšties iki 732 aminorūgšties) buvo klonuotas su rėmelio poslinkio mutacija koduojančioje dalyje. PGR reakcijos (pradmenys pateikti pirmame priede) pagalba skaitymo rėmelis buvo pataisytas.



4.9 pav. pET-15b-Hsp90MC plazmidė su pataisytu skaitymo rėmeliu

4.7 Hsp90 C terminalinio domeno klonavimas

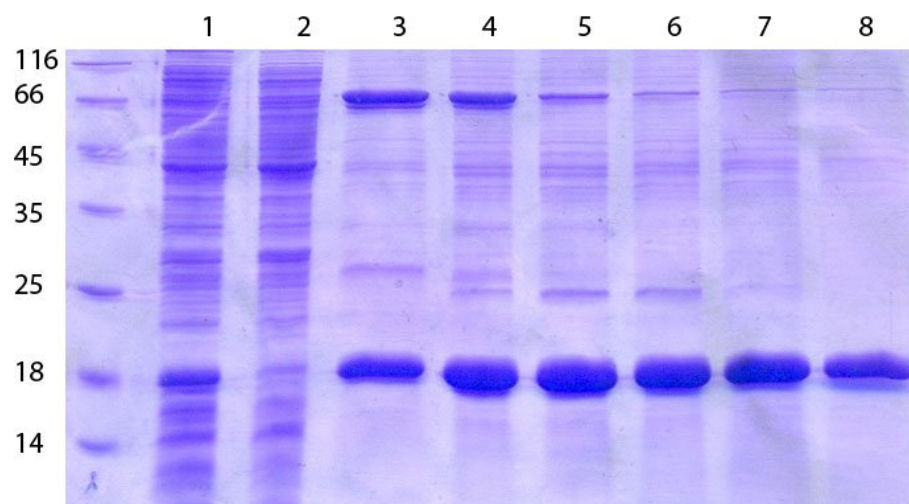


4.10 pav. Hsp90 C terminalinio domeno klonavimo schema

DNR seka, koduojanti Hsp90 C terminalinį domeną (nuo 599 aminorūgšties iki 732 aminorūgšties) buvo amplifikuota PGR reakcijos metu, kartu įvedant papildomas restriktazės XhoI kirpimo sekas galuose. PGR produktas ir tuščias pET-15b vektorius sukarpyti restriktaze XhoI ir suliguoti. Ligacijos mišinys transformuotas į *E. coli* XLI blue kamieną. PGR pradmenys (1 priedas) buvo parinkti taip, kad nepasislinktų skaitymo rėmelis ir Hsp90 C terminalinį domeną koduojantis genas būtų sulietas su polihistidinine uodegėle N gale.

4.8 Hsp90 C gryninimas

Bakterijos buvo transformuotos genetiniu konstruktą, pagal kurį buvo sintetinamas Hsp90 C domenas, sulietas su polihistidinine uodegėle. Biomasė suardyta ir baltymas išgrynintas per kolonėlę, užpildytą IDA-Sefaroze, kuri buvo pakrauta nikelio jonais ir nupusiausvyrinta gryninimo buferiu. Gautos frakcijos tirtos NDS - PAAG pagalba.

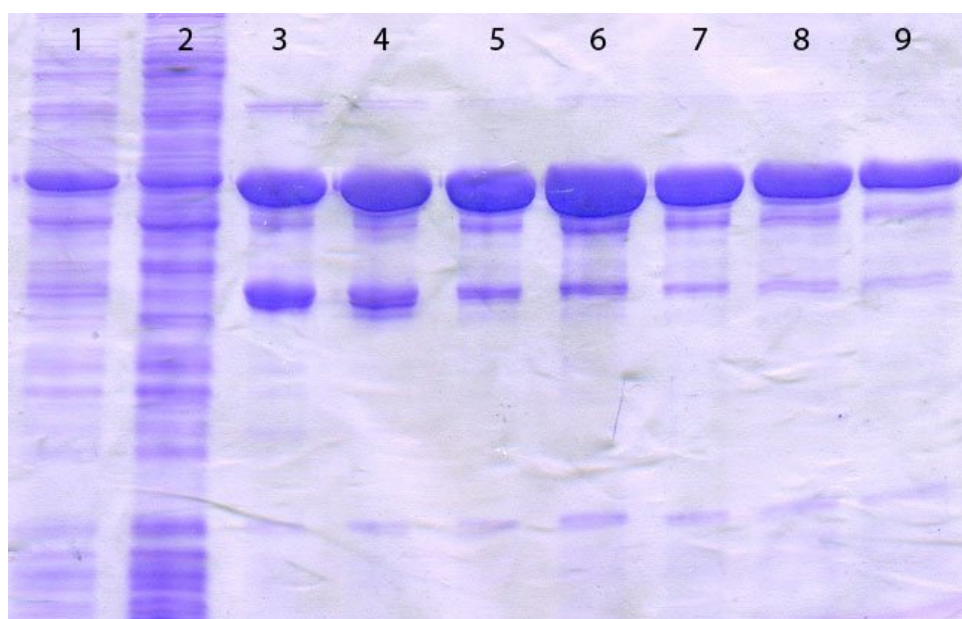


4.13 pav. Hsp90C gryninimas (pirmame takelyje užneštas negrynintas mėginys, antrame - prašokimas, kituose - frakcijos, kuriose yra tikslinis baltymas)

5 - 7 frakcijos buvo apjungtos, dializuotos per naktį ir užšaldytos -80°C temperatūroje.

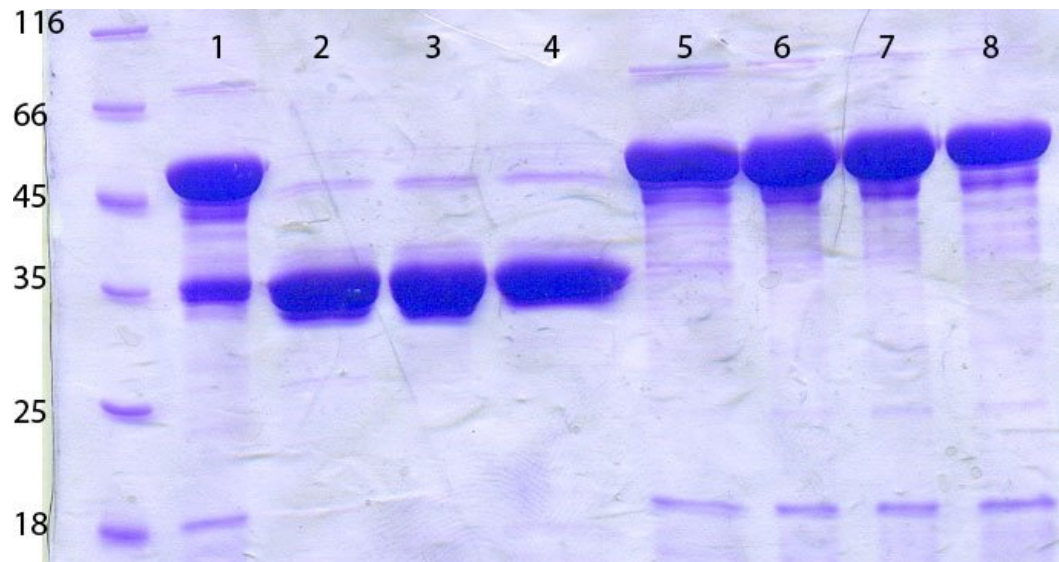
4.9 Hsp90 MC gryninimas

Bakterijos buvo transformuotos genetiniu konstruktu, pagal kurį buvo sintetinamas Hsp90 fragmentas, sudaryta iš M ir C domenu, sulietas su polihistidinine uodegėle. Biomasė suardyta ir baltymas išgrynintas per kolonėlę, užpildytą IDA-Sefaroze, kuri buvo pakrauta nikelio jonais ir nupusiausvyrinta gryninimo buferiu. Gautos frakcijos tirtos naudojant NDS - PAAG elektroforezę.



4.12 pav. Hsp90 MC gryninimas po pirmos kolonėlės (pirmame takelyje užneštas negrynintas mėginys, antrame - prašokimas, o likusiuose - išgrynintos frakcijos)

Visos frakcijos, kuriose yra tikslinis baltymas apjungtos ir dializuotos per naktį, kad pašalinti druskas. Kadangi baltymas po gryninimo dar turėjo daug priemaišų, buvo gryninama per antrą kolonėlę, užpildytą DEAE-Sefaroze, atkabinant baltymą nuo sorbento NaCl gradientu. Gautos frakcijos tirtos NDS - PAAG elektroforeze.

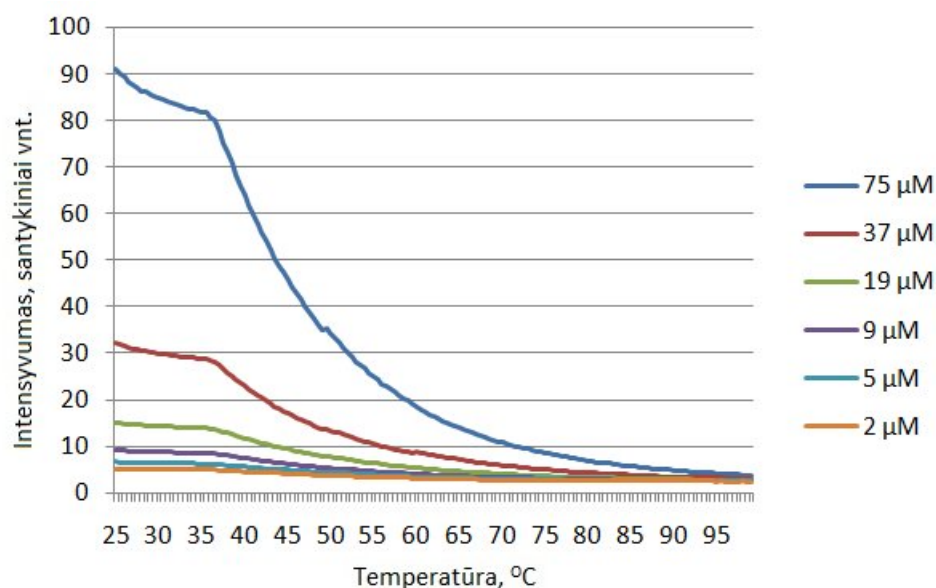


4.13 Hsp90 MC gryninimas po antros kolonėlės (pirmame takelyje mėginys prieš antrą gryninimą, likusiuose takeliuose - frakcijos, kuriose gautos po antro gryninimo)

Frakcijos nuo penktos iki aštuntos apjungtos, dializuotos per naktį ir užšaldytos -80 °C temperatūroje.

4.10 Hsp90 C terminio stabilumo nustatymas esant įvairiems reagentams ir buferiams

Prieš atliekant Hsp90 C domeno terminio stabilumo tyrimus, buvo nustatoma optimali baltymo koncentracija.

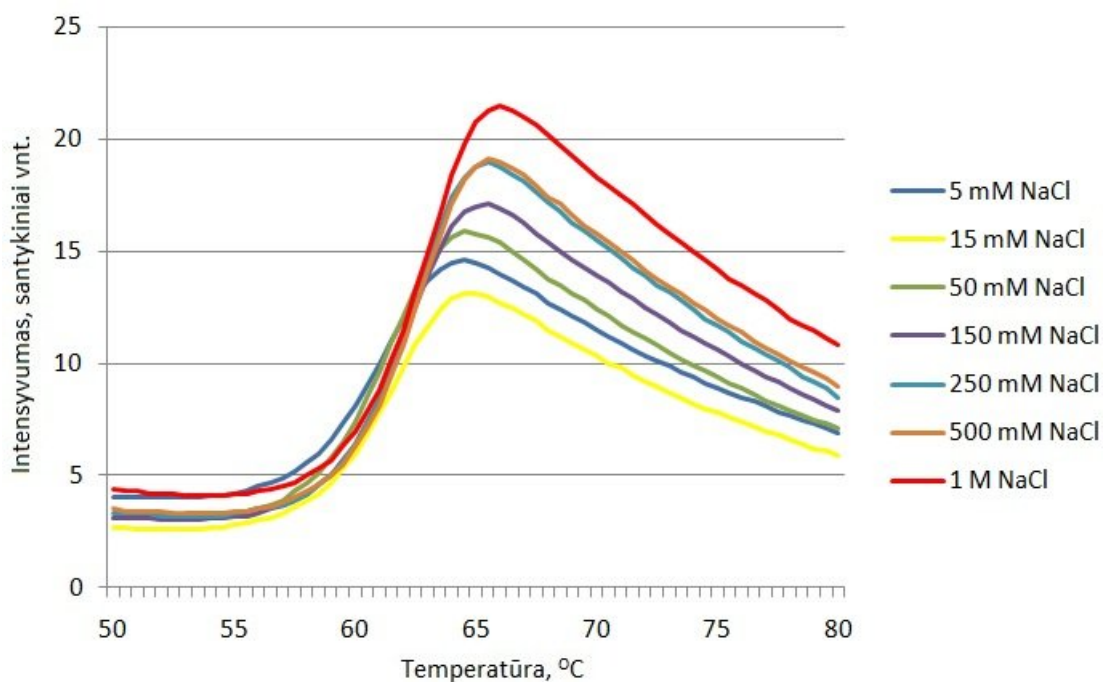


4.14 pav Optimalios Hsp90C koncentracijos nustatymas

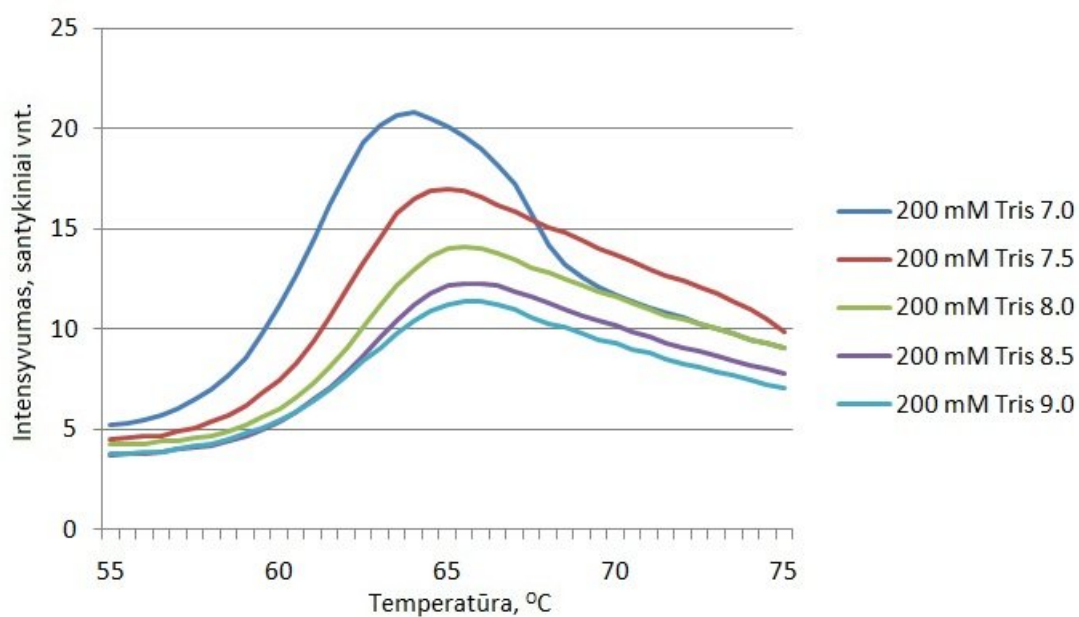
Kadangi išgrynintas Hsp90 C terminalinis domenas neturi normalios denatūravimo kreivės, galima įtarti, kad jis denatūravo gryninant arba, kad neigijo natyvos struktūros bakterijų ląstelėse. Gryninimas buvo pakartotas dar kartą, tačiau buvo gauti tokie patys rezultatai. Tirti šio baltymo stabilumą esant įvairiems reagentams ir buferiams, bei jungimasi su slopikliais nėra prasmės, nes jis jau denatūravęs.

4.11 Hsp90 MC terminio stabilumo nustatymas esant įvairiems reagentams ir buferiams

Buvo tiriamas Hsp90 MC fragmento terminis stabilumas tirpale esant įvairiems reagentams ir buferiams.



4.15 pav. Hsp90 MC stabilumo tyrimo esant įvairioms NaCl koncentracijoms neapdoroti duomenys

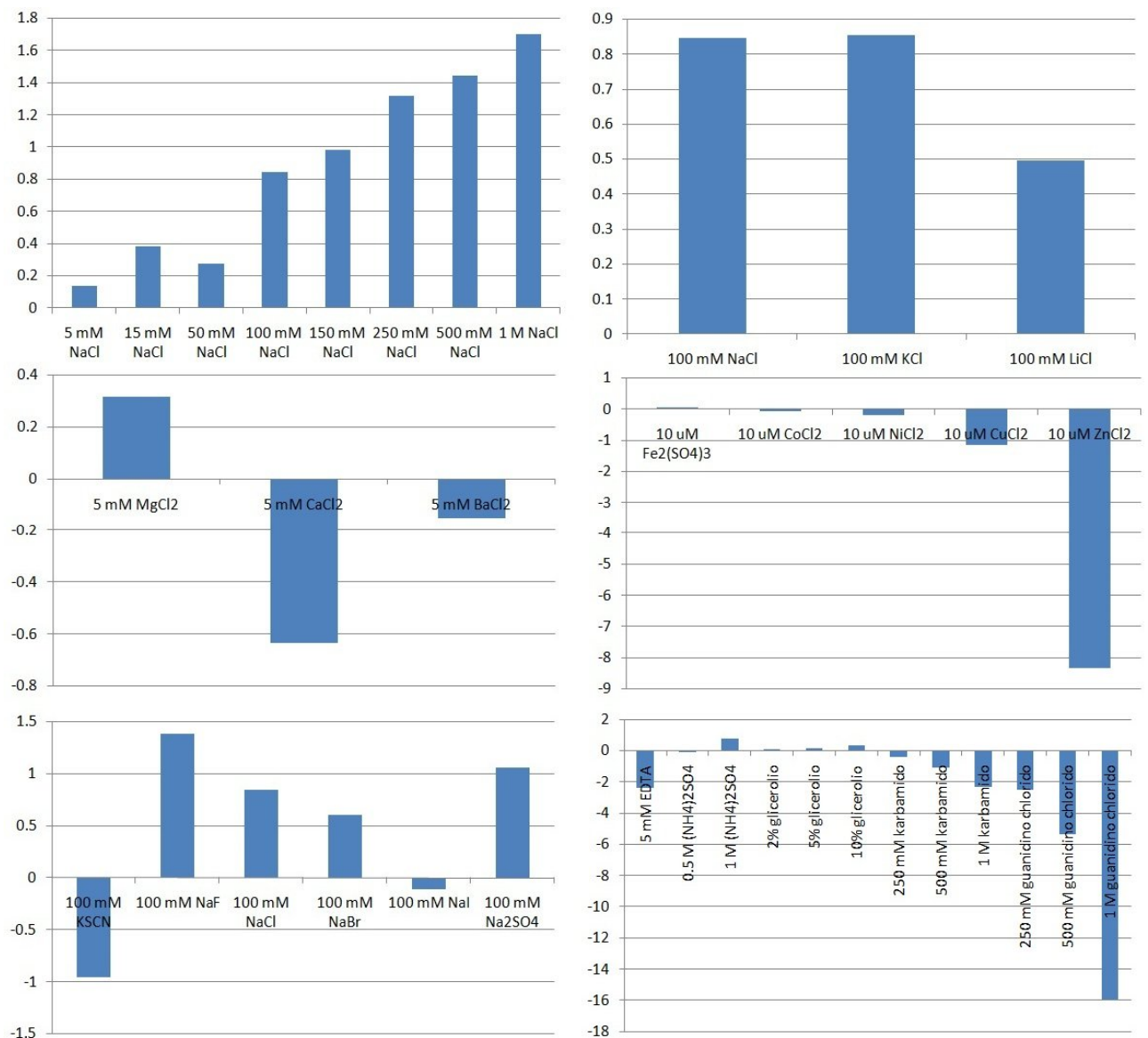


4.16 pav. Hsp90 MC stabilumo tyrimo esant įvairioms Tris buferio pH reikšmėms neapdoroti duomenys

4.15 ir 4.16 paveiksluose pateikta dalis neapdorotų duomenų gautų tiriant Hsp90 MC fragmento terminį stabilumą. Visi neapdoroti duomenys pateikti antrame ir trečiame prieduose.

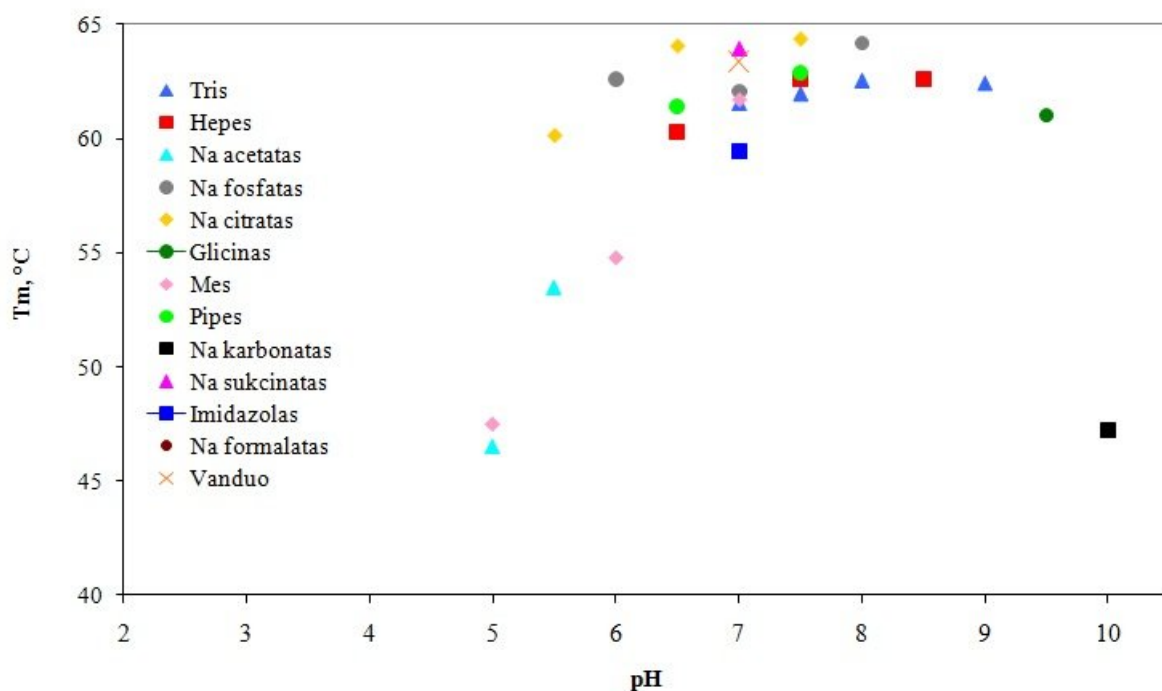
4.2 lentelė. Nustatant Hsp90 MC terminio stabilumą naudoti reagentai ir buferiai

5 mM NaCl	15 mM NaCl	50 mM NaCl
150 mM NaCl	250 mM NaCl	500 mM NaCl
1 M NaCl	5 mM MgCl ₂	5 mM CaCl ₂
5 mM BaCl ₂	100 mM KCl	100 mM LiCl
5 mM EDTA	10 uM Fe ₂ (SO ₄) ₃	10 uM CoCl ₂
10 uM NiCl ₂	10 uM CuCl ₂	10 uM ZnCl ₂
100 mM KSCN	100 mM NaF	100 mM NaCl
100 mM NaBr	100 mM NaI	100 mM Na ₂ SO ₄
0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	H ₂ O
2% glicerolio	5% glicerolio	10% glicerolio
250 mM karbamido	500 mM karbamido	1 M karbamido
250 mM guanidino chlorido	500 mM guanidino chlorido	1 M guanidino chlorido
100 mM Tris pH 7,0	100 mM Tris pH 7,5	100 mM Tris pH 8,0
100 mM Tris pH 8,5	100 mM Tris pH 9,0	100 mM Glicinas pH 9,5
100 mM Hepes pH 6,5	100 mM Hepes pH 7,5	100 mM Hepes pH 8,5
100 mM Na fosfatas pH 6,0	100 mM Na fosfatas pH 7,0	100 mM Nafosfatas pH 8,0
100 mM Na citratas pH 3,5	100 mM Na citratas pH 4,5	100 mM Na citratas pH 5,5
100 mM Na citratas pH 6,5	100 mM Na citratas pH 7,5	100 mM Na karbonatas pH 8,0
100 mM Mes pH 5,0	100 mM Mes pH 6,0	100 mM Mes pH 7,0
100 mM Pipes pH 6,5	100 mM Pipes pH 7,5	100 mM Na karbonatas pH 10,0
100 mM Imidazolas pH 7,0	200 mM Imidazolas pH 7,0	300 mM Imidazolas pH 7,0
100 mM Na sukcinatas pH 6,0	100 mM Na sukcinatas pH 6,5	100 mM Na sukcinatas pH 7,0
100 mM Na acetatas pH 4,0	100 mM Na acetatas pH 4,5	100 mM Na acetatas pH 5,0
100 mM Na acetatas pH 5,5	100 mM Na formalatas pH 3,0	100 mM Na formalatas pH 3,5



4.17 pav. Hsp90 MC terminio stabilumo tyrimas esant įvairiems reagentams (pateikti baltymo denatūracijos temperatūrų pokyčiai lyginant su vandeniu)

Iš šių duomenų matome, kad didėjanti NaCl koncentracija stabilizuoja Hsp90 MC fragmentą. Jį taip pat stabilizuoja kalio, ličio ir magnio jonai. Dauguma kitų katijonų jį silpnai destabilizuoja, išskyrus zinko jonus, kurie šį baltymą destabilizuoja stipriai. Dauguma anijonų silpnai stabilizuoja, išskyrus rodanido ir jodido jonus, kurie silpnai destabilizuoja. Hsp90 MC taip pat destabilizuoja EDTA, karbamidas ir guanidino chloridas, O amonio sulfatas ir glicerolis silpnai stabilizuoja.

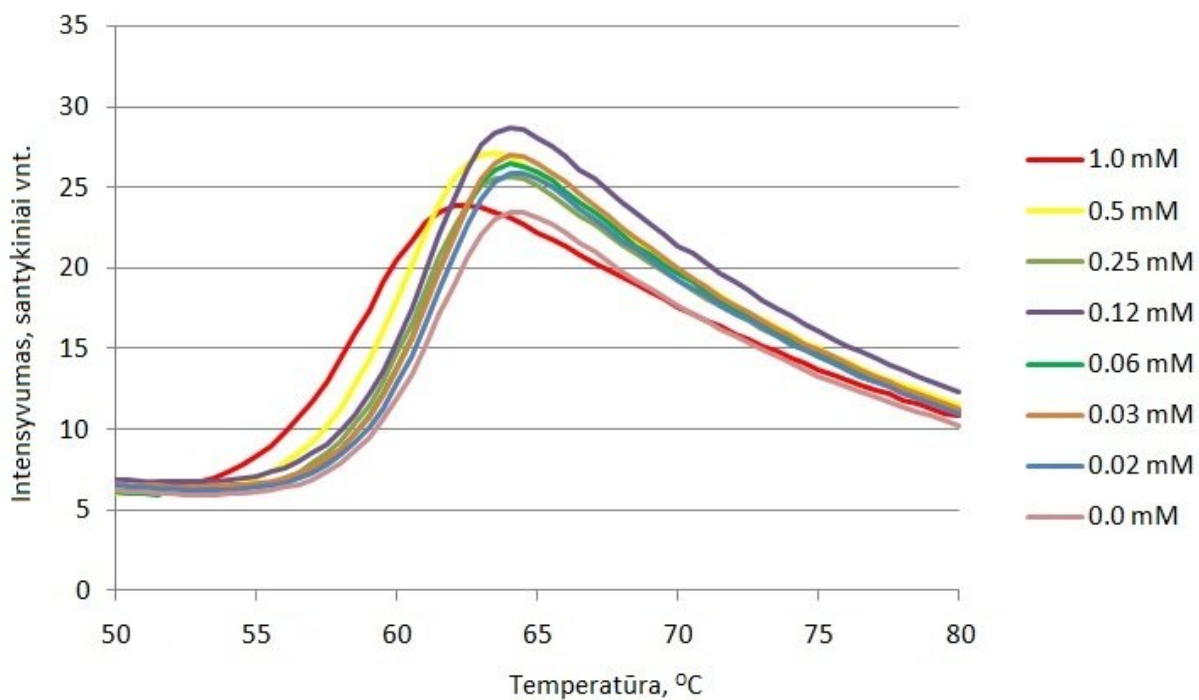


4.18 pav. Hsp90 MC terminio stabilumo tyrimas esant įvairiems buferiams

Iš šių duomenų matome, kad baltymas stabiliausias pH intervale nuo 6,5 iki 9 ir jį labiausiai stabilizuoja fosfatiniai, citratiniai ir sukcinatiniai buferiai.

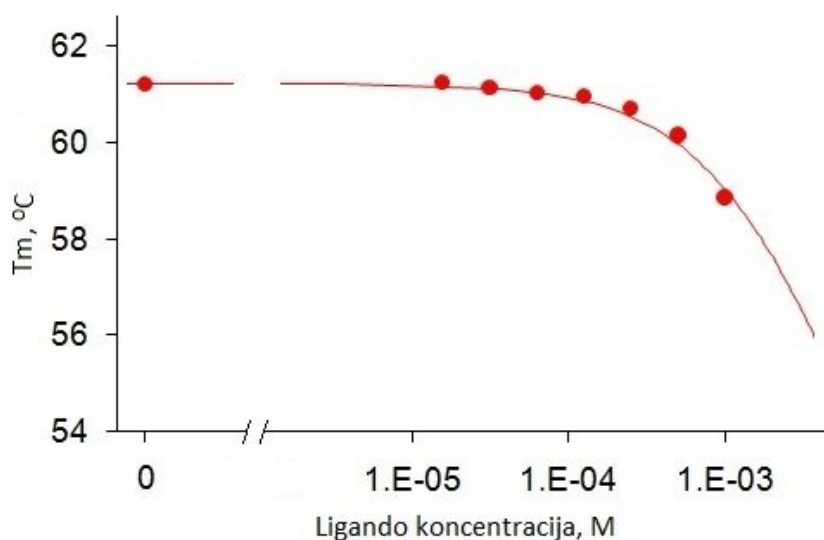
4.11 Hsp90 MC ir novobiocino jungimosi konstantos nustatymas

Terminio poslinkio metodu buvo tiriama Hsp90 MC fragmento ir novobiocino sąveika keičiant novobiocino koncentraciją nuo 1 mM iki 0 mM.



4.19 pav neapdoroti Hsp90 MC ir novobionino sąveikos tyrimo duomenys, esant įvairioms novobiocino koncentracijoms

Iš duomenų matome, kad didinant novobiocino koncentraciją, Hsp90 MC yra silpnai destabilizuojamas. Baltymo denatūravimo temperatūros priklausomybė nuo novobiocino koncentracijos aproksimuojama teorine kreive, pagal (14) lygtį.

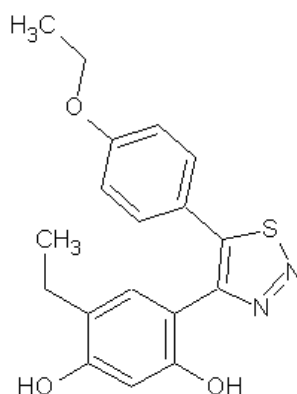


4.20 pav. Novobiocino ir Hsp90 MC jungimosi konstantos nustatymas

Nustatyta Hsp90 MC fragmento išsivyniojusios formos ir novobiocino jungimosi konstanta $K_b=5200 \text{ M}^{-1}$.

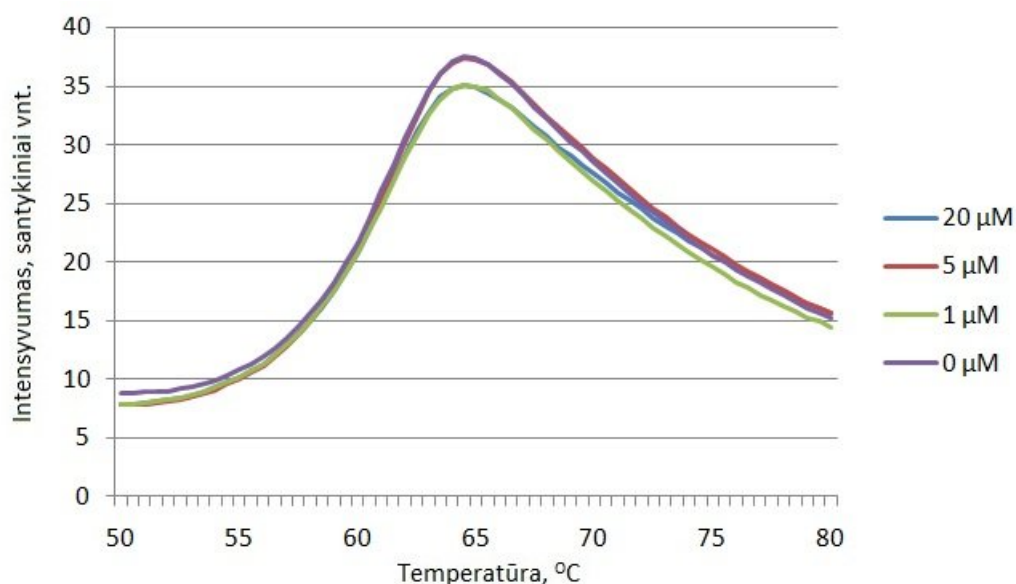
4.12 Hsp90 N terminalinio domeno ir Hsp90 MC fragmento jungimosi su ICPD62 palyginimas

ICPD62 yra Hsp90 ATPazinio aktyvumo slopiklis. Kadangi ATP jungimosi sritys yra Hsp90 N terminaliniame domene, šis junginys turėtų jungtis su Hsp90 N terminaliniu domenu ir nesijungti su Hsp90 MC fragmentu.



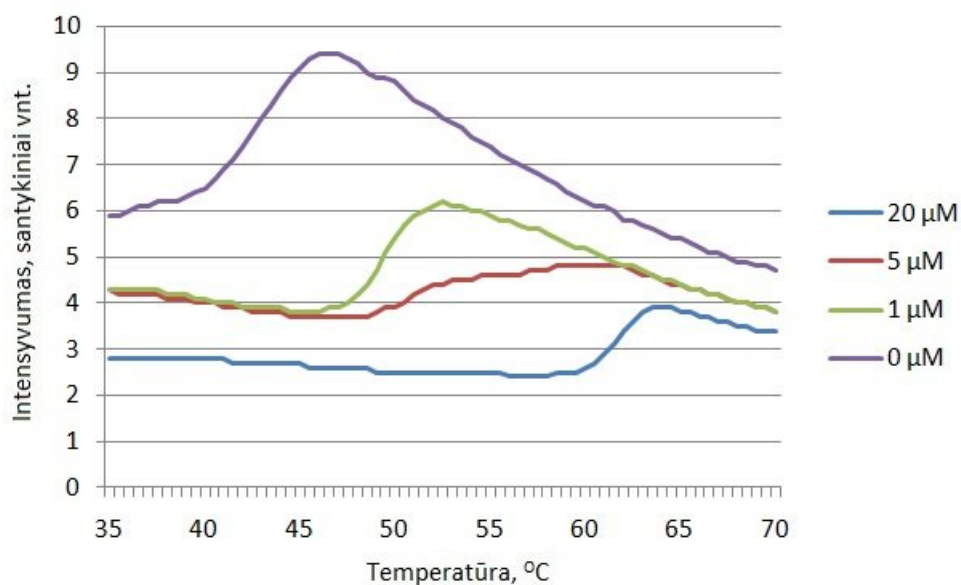
4.21 pav. ICPD62 struktūra

ICPD62 ir Hsp90 N terminalinio domeno, bei Hsp90 MC fragmento jungimasis buvo tiriamas terminio poslinkio metodu. Už išgrynintą Hsp90 N terminalinį domeną dėkoju dr. Vilmai Michailovienei.



4.22 pav. Neapdoroti Hsp90 MC ir ICPD62 jungimosi duomenys esant įvairioms ICPD62 koncentracijoms

Iš šių duomenų matome, kad ICPD62 nesijungia su Hsp90 MC fragmentu, nes visiškai nėra nei stabilizacijos, nei destabilizacijos.



4.23 pav. Neapdoroti Hsp90 MC ir ICPD62 jungimosi duomenys esant įvairioms ICPD62 koncentracijoms

Iš šių duomenų matome, kad didėjant ICPD62 koncentracijai batymas stipriai stabilizuojamas, o tai rodo, kad ICPD62 ir Hsp90 N terminalinis domenas jungiasi. Iš šito galima daryti išvadą, kad Hsp90 ir ICPD62 sąveiką lemia tik sritys esančios N terminaliniame domene.

IŠVADOS

1. Naudojant gliutationo-S-transferazę išgrynintas Reptin buvo naudojamas jo sąveikai su Agr2 tirti *in vitro*. Buvo nustatyta, kad jungimasį skatina ATP ir 37 °C temperatūra.
2. Tiriant vėžinių ląstelių lizatus Western blot metodu buvo nustatyti, kad p53, Agr2 ir Reptin dalyvauja vienas kito viduląstelinės koncentracijos reguliacijoje.
3. Naudojant polihistidininę uodegėlę išgrynintas Reptin buvo tiriamas terminio poslinkio metodu. Priešingai, nei nurodoma literatūroje, ATP buvimas tirpale nepaskatino Reptin suformuoti tvarkingą globulę. Be to, buvo nustatyta, kad gautos Reptin denatūracijos kreivės yra labai panašios į denatūracijos kreives gautas naudojant tik gryninimo buferį. Tai kelia abejones dėl literatūroje pateiktų duomenų kokybės.
4. Terminio poslinkio metodu tiriant Hsp90 C terminalinį domeną, nebuvo gautos normalios denatūracijos kreivės. Iš to padaryta prielaida, kad baltymas arba denatūravo gryninimo metu, arba neįgijo natyvios struktūros producento ląstelėse. Dėl šios priežasties tolesni tyrimai nebuvo vykdomi.
5. Terminio poslinkio metodu buvo ištirtas Hsp90 MC fragmento terminis stabilumas esant įvairiems reagentams ir buferiams. Buvo nustatyta, kad baltymą stabilizuoja didėjanti NaCl koncentracija, bei fosfatiniai, citratiniai ir sukcinatiniai buferiai. Baltymą desatbilizuoja cinko jonai, karbamidas ir guanidino chloridas. Hsp90 MC fragmentas yra stabiliausias pH intervale nuo 6,5 iki 9.
6. Terminio poslinkio metodu buvo ištirtas Hsp90 MC fragmento jungimasis su novobiocinu. Nustatyta, kad novobiocinas silpnai jungiasi su Hsp90 MC fragmentu ir šios sąveikos metu baltymas yra destabilizuojamas
7. Terminio poslinkio metodu buvo parodyta, kad ICPD62 jungiasi su Hsp90 N terminaliniu domenu, bet nesijungia su Hsp90 MC fragmentu, todėl galima daryti išvadą, kad sritys atsakingos už Hsp90 sąveiką su ICPD yra N terminaliniame domene.

SUMMARY

Reptin is a highly conservative DNA helicase, belonging to the AAA⁺ protein superfamily. Although its molecular mechanisms are still unclear, it has been shown that Reptin is vital for survival of various organisms in the embryonic stage, it is a part of the telomerase, INO80 and SWR1 chromatin remodelling and Tip60 histone acetylation complexes and it also binds directly to p53. Moreover several researchers have shown that Reptin often is overexpressed in various types of malignant tumours. All these facts suggest that Reptin can potentially be a target for cancer therapy. In this work Reptin was purified from *E. coli* cells and its protein - protein interactions were studied both *in vivo* and *in vitro*. It was determined that Reptin, Agr2 and p53 are involved in regulating each others cytoplasmic concentrations *in vivo* and that Reptin - Agr2 binding is promoted both by ATP presence in the solution and temperature *in vitro*.

Heat shock protein 90 (Hsp90) is a highly conservative molecular chaperone, which has two human isoforms (Hsp90 α and Hsp90 β). It is vital for survival of all eukaryotic organisms, as the list of its client proteins includes many very important proteins such as kinases, transcriptional factors, tubulin, actin, NO synthase. In normal cells Hsp90 constitutes around 1 - 2% of all cellular proteins, however after stress or in cancerous cells its expression increases several times. Its function Hsp90 is dependent on ATP hydrolysis. If ATPase activity of Hsp90 is inhibited, instead of promoting folding of its client proteins, it promotes proteasomal degradation of them. As Hsp90 is expressed in cancerous cells more than in normal cells and many of its client proteins are considered oncogenic, Hsp90 is considered one of the best targets for cancer therapy. In this work C terminal domain and MC fragment of Hsp90 were purified from *E. coli* cells, thermal stability of Hsp90 MC fragment in the presence of various reagents and buffers and binding of inhibitors to it was assessed.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Jha S, Dutta A. RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Mol Cell*. 2009;34:521-33.
2. Rottbauer W, Saurin AJ, Lickert H, Shen X, Burns CG, Wo ZG, Kemler R, Kingston R, Wu C, Fishman M. Reptin and pontin antagonistically regulate heart growth in zebrafish embryos. *Cell*. 2002;111:661-72.
3. Gallant P. Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol*. 2007;17:187-92.
4. Baek SH. When ATPases pontin and reptin met telomerase. *Dev Cell*. 2008;14:459-61.
5. Huber O, Ménard L, Haurie V, Nicou A, Taras D, Rosenbaum J. Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res*. 2008;68:6873-6.
6. Li W, Zeng J, Li Q, Zhao L, Liu T, Björkholm M, Jia J, Xu D. Reptin is required for the transcription of telomerase reverse transcriptase and over-expressed in gastric cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:132.
7. Lee JS, Kim Y, Kim IS, Kim B, Choi HJ, Lee JM, Shin HJ, Kim JH, Kim JY, Seo SB, Lee H, Binda O, Gozani O, Semenza GL, Kim M, Kim KI, Hwang D, Baek SH. Negative regulation of hypoxic responses via induced Reptin methylation. *Mol Cell*. 2010;39:71-85.
8. Baek SH. A novel link between SUMO modification and cancer metastasis. *Cell Cycle*. 2006;5:1492-5.
9. Ménard L, Taras D, Grigoletto A, Haurie V, Nicou A, Dugot-Senant N, Costet P, Rousseau B, Rosenbaum J. In vivo silencing of Reptin blocks the progression of human hepatocellular carcinoma in xenografts and is associated with replicative senescence. *J Hepatol*. 2010;52:681-9.
10. Richardson PG, Mitsiades CS, Laubach JP, Lonial S, Chanan-Khan AA, Anderson KC. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. *Br J Haematol*. 2011;152:367-79.
11. Hahn JS. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep*. 2009;42:623-30.
12. Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2009;100:1523-9.
13. Allegra A, Sant'antonio E, Penna G, Alonci A, D'Angelo A, Russo S, Cannavò A, Gerace D, Musolino C. Novel therapeutic strategies in multiple myeloma: role of the heat shock protein inhibitors. *Eur J Haematol*. 2011;86:93-110.
14. Janin YL. ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, second season. *Drug Discov Today*. 2010;15:342-53.

15. Radanyi C, Le Bras G, Marsaud V, Peyrat JF, Messaoudi S, Catelli MG, Brion JD, Alami M, Renoir JM. Antiproliferative and apoptotic activities of tosylcyclonovobiocic acids as potent heat shock protein 90 inhibitors in human cancer cells. *Cancer Lett.* 2009;274:88-94.
16. Matulis D. Baltymų fizikinė chemija. Kaunas: Technologija, 2008. 149 p.
17. Cimperman P, Baranauskiene L, Jachimoviciūte S, Jachno J, Torresan J, Michailoviene V, Matuliene J, Sereikaite J, Bumelis V, Matulis D. A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. *Biophys J.* 2008;95:3222-31.
18. Maslon MM, Hrstka R, Vojtesek B, Hupp TR. A divergent substrate-binding loop within the pro-oncogenic protein anterior gradient-2 forms a docking site for Reptin. *J Mol Biol.* 2010;404:418-38.

PGR pradmenys

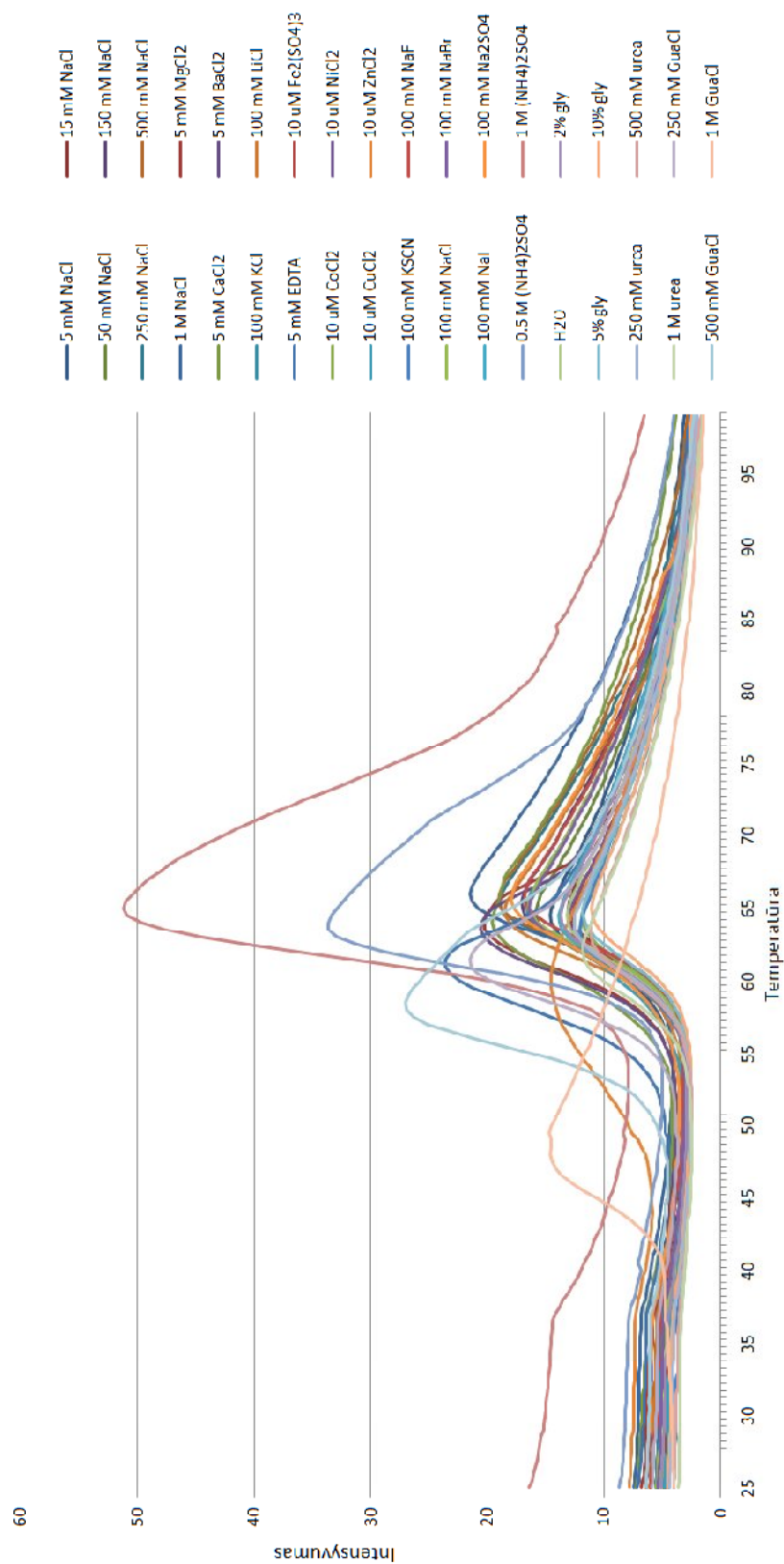
Taisant pET-15b-Hsp90MC skaitymo rėmelį naudotų pradmenų sekos (didžiosiomis raidėmis pažymėtas taisymo metu įterptas nukleotidas):

- gcagccatatgctcgAcgatcaagaagagctc
- gagctcttcttgatcgTcgagcatatggctgc

Klonuojant Hsp90 C terminalinį domeną koduojantį geną PGR reakcijoje naudotų pradmenų sekos (didžiosiomis raidėmis nurodyta restriktazės XhoI kirpimo vieta):

- atgcCTCGAGgtcacaagcacatatggctg
- cagcCTCGAGttagtctacttcttccatgcg

Neapdoroti Hsp90 MC terminio stabilumo esant įvairiems reagentams tyrimo duomenys



Neapdoroti Hsp90 MC terminio stabilumo esant įvairiems buferiams tyrimo duomenys

