



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Algirdas Šerėnas

**Žmogaus rekombinantinio prioninio baltymo (HuPrP23-231) mutantų
konstravimas, ekspresija ir gryninimas**

**Construction, Expression and Purification of Recombinant Human
Prion Protein (HuPrP23-231) Mutants**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2015

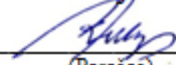
VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas



(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

Algirdas Šerėnas

**Žmogaus rekombinantinio prioninio baltymo (HuPrP23-231) mutantų
konstravimas, ekspresija ir gryninimas**

**Construction, Expression and Purification of Recombinant Human
Prion Protein (HuPrP23-231) Mutants**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

dr. Vytautas Smirnovas



2015 05 27

(vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)


Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

TVIRTINU
Katedros vedėjas



(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO

UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentui **Algirdui Šerėnui**

Baigiamojo darbo tema: **Žmogaus rekombinantinio prioninio baltymo (HuPrP23-231) mutantų konstravimas, ekspresija ir gryninimas**

patvirtinta 2014 m. lapkričio mėn.03 d. dekanų potvarkiu Nr. 321fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2015 m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Gauti rekombinantinius mutantinius HuPrP23-231 E219K ir HuPrP23-231 Q212P baltymus.

Vadovas  dr. Vytautas Smirnovas
(Parašas)

Užduotį gavau  Algirdas Šerėnas
(Parašas)

..... 2014.11.03
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

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

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

Pavadinimas **Žmogaus rekombinantinio prioninio baltymo (HuPrP23-231) mutantų konstravimas, ekspresija ir gryninimas**

Autorius **Algirdas Šerėnas**

Vadovas **dr. Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Prionai yra baltymai, kurie siejami su grupe mirtinų neurodegeneracinių ligų. Šios ligos yra susijusios su natyvaus ląstelinio prioninio baltymo PrP^C virtimu netinkamai susilanksčiusia, netirpia PrP^{Sc} izoforma, kuri kaupiasi žmogaus ar gyvūno smegenyse. Viena iš galimų priežasčių, sukeliančių šias ligas, yra mutacijos žmogaus prioninio baltymo gene. Tam, kad būtų galima tyrinėti, kaip šios mutacijos nulemia spontaninį PrP^{Sc} izoformos susidarymą, visų pirma reikia turėti pakankamą kiekį šių prioninių baltymų. Mes įvedėme dvi skirtingas mutacijas į žmogaus prioninį baltymą, kurių viena yra susijusi su liga, o kita, manoma, yra apsauginė prieš Krocifeldo-Jakobo ligą.

Darbo metu atlikta tikslinė mutagenezė, kurios metu įvestos E219K ir Q212P mutacijos į žmogaus prioninio baltymo geną. Atlikta žmogaus prioninių baltymų (HuPrP23-231) Q212P ir E219K ekspresija *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) kompetentiniame kamiene. Šie baltymai buvo renatūruoti ir išgryninti giminingumo chromatografijos metodu. Gauta 109 Q212P ir 81 mg E219K mutantinių HuPrP23-231 baltymų.

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

Darbo apimtis 39 p. teksto be priedų, 16 paveikslų, 4 lentelės, 24 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: giminingumo chromatografija, prioninis baltymas, taškinės mutacijos, prioninės ligos, rekombinantiniai baltymai, ekspresija.

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Algirdas Šerėnas, 20112397

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIf-11

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO
SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

2015 m. kovo 2 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Žmogaus rekombinantinio prioninio baltymo (HuPrP23-231) mutantų konstravimas, ekspresija ir gryninimas“ patvirtintas 2014 m. lapkričio 3 d. dekanų potvarkiu Nr. 321fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Mano darbo vadovas dr. Vytautas Smirnovas.

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



(Parašas)

Algirdas Šerėnas

(Vardas ir pavardė)

VILNIUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY

Algirdas Šerėnas, 20112397

(Student's given name, family name, certificate number)

Faculty of Fundamental Sciences

(Faculty)

Bioengineering, BIf-11

(Study programme, academic group no.)

**DECLARATION OF AUTHORSHIP
IN THE FINAL DEGREE PAPER**

March 2, 2015

I declare that my Final Degree Paper entitled „Construction, Expression and Purification of Recombinant Human Prion Protein (HuPrP23-231) Mutants“ is entirely my own work. The title was confirmed on November 3, 2014 by Faculty Dean's order No. 321fm. I have clearly marked the presence of quoted or paraphrased material and referenced all sources.

The academic supervisor of my Final Degree Paper is dr Vytautas Smirnovas.

No contribution of any other person was obtained, nor did I buy my Final Degree Paper.



(Signature)

Algirdas Šerėnas

(Given name, family name)

Turinys

Santrumpų sąrašas.....	9
Įvadas	10
1. Literatūros apžvalga.....	12
1.1 Prioninės ligos.....	12
1.2 Prionų kamienai	12
1.3 Ląstelinis prioninis baltymas	13
1.4 PrP ^{Sc}	14
1.5 Prioninių baltymų vartimo į patogenines izoformas modeliai.....	15
1.6 Mutacijos žmogaus prioniniame baltyme	16
1.6.1 Su ligomis susijusios mutacijos	17
1.6.2 Apsauginė E219K mutacija	18
1.6.3 Heterozigotinio slopinimo fenomenas	20
2. Medžiagos ir metodai.....	22
2.1 Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės.....	22
2.1.1 Naudotos medžiagos ir rinkiniai pagal gamintoją	22
2.1.2 Naudota laboratorinė įranga.....	22
2.1.3 Naudoti sorbentai	23
2.1.4 Naudoti bakterijų kamienai.....	23
2.1.5 Naudoti konstruktai.....	24
2.1.6 Naudoti oligonukleotidiniai pradmenys.....	24
2.1.7 Mitybinės terpės.....	24
2.1.8 Tirpalai	25
2.1.9 Buferiniai tirpalai naudoti baltymų gryninime	26
2.2 Metodai	27
2.2.1 Mutagenezė	27
2.2.2 Plazmidinės DNR gryninimas.....	28
2.2.3 Baltymų ekspresija.....	29
2.2.3 Baltymų gryninimas.....	30
3. Rezultatai ir jų aptarimas	34
3.1 E219K ir Q212P mutacijų gavimas	34
3.2 Sekoskaitos rezultatų analizė	35
3.3 Rekombinantinių prioninių baltymų raiška	36
3.4 Rekombinantinių prioninių baltymų gryninimas	38
Išvados	41
Naudota literatūra.....	42

Santrumpų sąrašas

- AA – akrilamidas;
- APS – amonio persulfatas;
- BAA – bisakrilamidas;
- DMSO – dimetilsulfoksidas;
- DTT – ditioneitolis;
- E219K – peptidinėje grandinėje 219 pozicijoje glutamo rūgštis pakeista į liziną;
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio dihidratas;
- HuPrP23-231 – žmogaus rekombinantinis prioninis baltymas;
- GPI – glikozilfosfatidilinozitolis;
- GSS – Gerstmanno-Sträusslerio-Scheinkerio sindromas;
- KJL – Krocifeldo-Jakobo liga;
- LB – Luria broth augimo terpė;
- NDS – natrio dodecilsulfatas;
- NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;
- PrP⁺ – dalinai išsivyniojęs prioninis baltymas;
- PrP^C – natyvus prioninis baltymas;
- PRPN* – prioninio baltymo genas;
- PrP^{Sc} – pakitusios konformacijos prioninis baltymas, skrepi izoforma.
- Q212P – peptidinėje grandinėje 212 pozicijoje glutaminas pakeistas į proliną;
- S.O.C. – optimali mitybinė terpė (angl. super optimal broth with catabolite repression);
- TAE – TRIS-acetato-EDTA DNR elektroforezės buferis;
- TCA – trichloracto rūgštis;
- TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas;
- TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;
- TSE – transmisinės spongiforminės encefalopatijos;
- V210I – peptidinėje grandinėje 210 pozicijoje valinas pakeistas į izoleuciną.

Ivadas

Transmisinės spongiforminės encefalopatijos (TSE) arba prioninės ligos – tai reta grupė mirtinų neurodegeneracinių ligų, kurias sukelia prionai. Šios prioninės ligos yra susijusios su natyvaus ląstelinio prioninio baltymo (PrP^C) virsimu patogenine, netinkamai susilanksčiusia, PrP^{Sc} izoforma, kuri kaupiasi žmogaus ar gyvūno smegenyse ir per tam tikrą laiką sukelia centrinės nervų sistemos sutrikimus bei mirtį. PrP^C yra sintezuojamas daugelio žmogaus ir gyvūnų audinių, tačiau didžiausi jo kiekiai aptinkami centrinėje nervų sistemoje ir manoma, jog jis būtinas sinapsių veiklos užtikrinimui (Brown, Mastrianni, 2010).

Spontaninis ląstelinio prioninio baltymo virsmas yra nulemtas mutacijų baltymo gene, dėl kurių šie baltymai įgauna netinkamą tretinę struktūrą ir virsta infekcinėmis dalelėmis – prionais (PrP^{Sc}). PrP^{Sc} toliau geba tarnauti kaip šablonai, pagal kuriuos tinkamai susilankstę ląsteliniai prioniniai baltymai pakeičia konformaciją ir virsta PrP^{Sc}. Naujai susidariusios infekcinės dalelės taip pat gali tarnauti kaip iniciatoriai šioje grandininėje reakcijoje (Colby, Prusiner, 2011).

Šiuo metu yra išskiriamos trys etiologinės šių ligų grupės: infekcinės, sporadinės ir paveldimos. Yra nustatyta apie 40 skirtingų taškinių mutacijų žmogaus prioninio baltymo gene (*PRPN*), sukeliančių paveldimas ligas, kurios sudaro apie 15 proc. visų žmogui nustatomų prioninių ligų. Viena iš žinomiausių mutacijų, sukeliančių paveldimą *Gerstmann-Straussler-Scheinker* sindromą yra Q212P (212 baltymo pozicijoje glutaminas pakeistas į proliną) (Ilc et al., 2013).

Nepaisant mutacijų, sukeliančių ligas, taipogi yra nustatyti keli polimorfizmai, kurie, manoma, yra apsauginiai prieš prionines ligas. Vienas iš jų yra E219K (glutamo rūgštis yra pakeista į liziną). Iki šiol atliktais tyrimais nustatyta, jog žmonės, turintys šį genetinį pakitimą, yra atsparūs infekcinei Krocifeldo-Jakobo ligai (Ilc et al., 2013).

Mokslininkai stipriai pasistūmėjo aiškindamiesi prionų sukeltamų ligų mechanizmą, tačiau dar daug liko neišsiaiškinta ir ši tema išlieka aktuali. Vienas iš tyrimo objektų yra mutantiniai žmogaus prioniniai baltymai, kuriuos tyrinėjant siekiama išsiaiškinti, kokią įtaką ligos eigai turi šių baltymų struktūros pokyčiai. Kadangi tyrimams reikalingi dideli baltymo kiekiai, o pirkti yra brangu, todėl šiuos mutantinius baltymus galima pasigaminti patiems.

Taigi, šio darbo **tikslas** yra gauti rekombinantinius žmogaus prioninius baltymus HuPrP23-231 Q212P ir HuPrP23-231 E219K. Tikslui pasiekti išsikėlėme šiuos **uždavinius**:

1. Atlikti tikslinę mutagenezę ir įvesti Q212P ir E219K mutacijas į HuPrP23-231 baltymo geną;
2. Gauti HuPrP23-231 baltymų su Q212P ir E219K mutacijomis raišką *E. coli* ląstelėse;
3. Renatūruoti baltymus iš intarpinių kūnelių ir išgryninti giminingumo chromatografijos metodu.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Prioninės ligos

Prioninės ligos – tai grupė mirtinų, neurodegeneracinių ligų, sukeliama iš baltymų sudarytų mažų infekcinių dalelių – prionų. Žodis prionas (angl. proteinaceous infectious particle) reiškia, jog šis ligos sukėlėjas sudarytas tik iš baltymo. Tai vienintelis šiuo metu žinomas infekcinis patogenas, neturintis genomo. Visi kiti infekciniai agentai, tokie kaip grybai, bakterijos ar virusai turi DNR arba RNR, kuri užtikrina jų dauginimąsi, tuo pačiu ir ligos vystymąsi (Kalikiri, Sachan, 2003).

Prionai turi identišką pirminę aminorūgščių seką prioniniams baltymams, kurie normaliai egzistuoja organizme. Vienintelis skirtumas, nulemiantis jų infektyvumą, yra pakitusi tretinė struktūra, kuri tarnauja kaip šablonas, verčiant ląstelinius natyvius prioninius baltymus PrP^C (angl. C – cellular) į patogeninę baltymo izoformą PrP^{Sc} (angl. Sc – scrapie), kuri yra netirpi ir kaupiasi smegenyse, sukeldama grupę prioninių ligų (Kalikiri, Sachan, 2003).

Žmogui prionai sukelia Krocifeldo-Jakobo ligą (KJL), kuru, mirtiną nemigą, *Gerstmann-Straussler-Scheinker* sindromą (GSS), avims – skrepi (angl. scrapie) ligą; galvijams – jaučių spongiforminę encefalopatiją (Brown, Mastrianni, 2010). Skrepi buvo pirma žinoma prioninė liga, identifikuota dar 1730 m. Vėliau buvo apibūdintos ir kitos prioninės ligos: GSS (1920 m.), KJL (1920 m.). Taip pat 1952–1953 m. Papua Naujojoje Gvinėjoje buvo nustatytas kuru ligos atvejis, susijęs su ritualiniu kanibalizmu (Acevedo-morantes, Wille, 2014). Šiuo metu yra išskiriamos trys etiologinės ligų grupės: infekcinės, sporadinės (spontaniškos) ir paveldimos (Chesebro, 2003). Infekcinės ligos dažniausiai plinta per maistą arba jomis užsikrečiama per įvairias medicinines procedūras. Sporadinių ligų atsiradimo priežastis nėra aiški, o paveldimos yra nulemtos mutacijų *PRNP* gene (Acevedo-morantes, Wille, 2014).

1.2 Prionų kamienai

Vienas iš įdomiausių fenomenų, susijusių su prioninėmis ligomis, yra prionų kamienai. Buvo pastebėta, jog gyvūnuose, paveiktuose prioninių ligų, gali išsivystyti skirtingi ligos fenotipai (Morales et al., 2007). Šis atradimas buvo laikomas vienas iš svarbiausių įrodymų, nukreiptas prieš *tik baltymo* teoriją. Buvo manoma, jog įvairūs ligos fenotipai aptinkami gyvūnuose susiję su skirtingą genetinę informaciją turinčiais TSE sukeliančiais agentais. Tačiau remiantis dabartiniais tyrimais teigiama, jog šį skirtumą nulemia patogeniniai prionai, kurie gali būti įgavę skirtingas stabilias konformacijas, kurių kiekviena apibūdinama kaip

atskiras priono kamienas. Kiekvienas iš šių kamienų geba paveikti specifinę smegenų dalį, dėl to atsiranda skirtingi ligos požymiai (Morales et al., 2007).

Prionų kamienai gali būti klasifikuojami pagal skirtingus parametrus. Inkubacinis periodas, audinių pažeidimo profilis ir klinikiniai požymiai yra pagrindinės charakteristikos gyvame organizme, pagal kurias galima klasifikuoti prionų kamienus. Taip pat papildomai galima charakterizuoti ir biochemiškai. Vienos iš pagrindinių savybių yra elektroforetinis judrumas paveikus proteaze K, atsparumas proteazei K, atsparumas denatūracijai chaotropiniais agentais ir glikozilinimo profilis (Morales et al., 2007). Bandymais nustatyta, jog kiekvienas iš kamienų turi jam būdingą glikozilinimo formų santykį, kuris, manoma, yra svarbus stabilizuojant tam tikrą baltymo konformaciją (Collinge, Clarke, 2007).

1.3 Ląstelinis prioninis baltymas

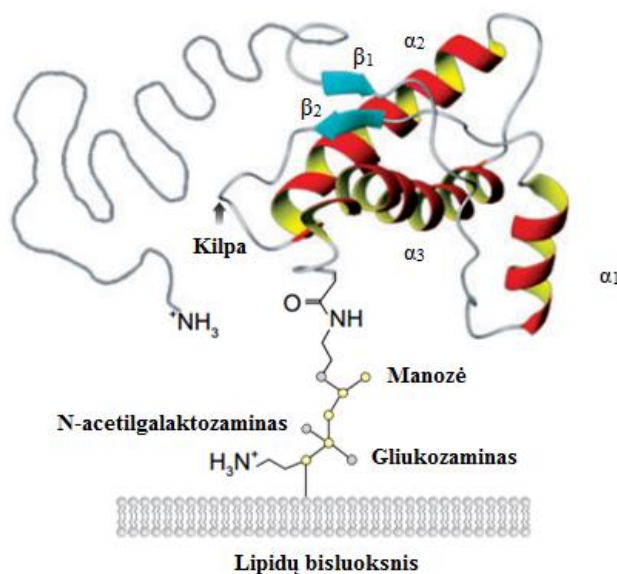
Ląstelinis prioninis baltymas (PrP^C), tai įprastas ląstelėse randamas glikoproteinas, kurio sintezė prasideda dar embriogenezėje. Suaugusiame individe didžiausia šio baltymo raiška yra pastebėta galvos ir nugaros smegenų neuronuose, tačiau taip pat nustatyta ir širdies, kepenų, inkstų, kasos, plaučių, baltųjų kraujo kūnelių ir trombocitų periferiniuose audiniuose (Westergard et al., 2007).

Šio baltymo funkcija vis dar nėra gerai žinoma, tačiau atlikti tyrimai leidžia teigti, jog šis baltymas atsakingas už sinapsių formavimąsi, funkcionalumą ir palaikymą, suriša ir aprūpina ląsteles variu, dalyvauja apsaugoje nuo oksidacinio streso, ląstelių adhezijoje, neurogenezėje, imunoreguliacijoje (Brown, Mastrianni, 2010; Ilc et al., 2013).

Ląstelinis prioninis baltymas, turintis 253 aminorūgštis, yra koduojamas 16 kb (nuo 4,666,796 iki 4,682,233 bazių poros) vienakopijiniame *PRNP* gene, esančiame 20p13 lokuse (Imran, Mahmood, 2011). Sintezės metu endoplazminiame tinkle iš pradžių yra nukerpama signalinio baltymo 22 aminorūgščių seka nuo N galinės dalies. Po to prisijungus glikozilfosfatidilinozitolio (GPI) inkarui (kuris reikalingas priono baltymui prisitvirtinti prie ląstelės išorinės membranos), yra nuskeliama 23 aminorūgščių liekanų signalinė seka nuo baltymo C galinės dalies (Brown, Mastrianni, 2010; Imran, Mahmood, 2011).

Visi prioniniai baltymai, ekspresuojami skirtingų rūšių individų, turi panašią tretinę struktūrą. Žmogaus prioninis baltymas (1.1 pav.) turi netvarkingą N galinę dalį (23-124 aminorūgščių liekanos) ir griežtai struktūrizuotą C galinį regioną (125-231 aminorūgščių liekanos). Baltymo globulės centrą sudaro trys α spiralės (α_1 : 144-155; α_2 : 172-192 ir α_3 : 200-225 aminorūgščių liekanos) ir dvi nelygiagrečios β juostos (β_1 : 129-130 ir β_2 : 162-163

aminorūgščių liekanos) bei disulfidinis tiltelis, sujungiantis α_2 ir α_3 spirales, taip stabilizuodamas baltymo C galinę dalį (Cheang et al., 2008).



1.1 pav. Erdvinė žmogaus prioninio baltymo (prijungtas prie lipidų bisluoksnio) struktūra. Baltymą sudaro trys raudona spalva pavaizduotos α -spiralės, dvi mėlyna spalva pavaizduotos β -klostės, nestruktūrizuota N galinė dalis ir glikozilfosfatidilinozitolinis inkaras (GPI) (pritaikyta iš Cheang et al., 2008).

Baltymo N galinės dalies struktūra yra kintanti ir dažniausiai netvarkinga lyginant su C galine dalimi, kuri formuoja stabilius antrinės struktūros elementus (Cappai, Collins, 2004; Jahandideh et al., 2014). Nors prioninio baltymo N galinė dalis yra nestruktūrizuota, tačiau ji turi du šiuo metu žinomus konservatyvius regionus. Pirmasis susideda iš penkis kartus pasikartojančių oktamerinių amino rūgščių sekos (angl. octapeptide repeat region). Manoma, kad šis regionas yra svarbus vario surišimui ir susijęs su prionų patogenezė. Antrasis regionas, išsiskiriantis hidrofobiniu profiliu, yra pavadintas transmembraniniu regionu, tačiau nėra aišku, ar fiziologinėmis sąlygomis šis domenai tikrai funkcionuoja kaip transmembraninis regionas, todėl siūloma jį vadinti hidrofobinio branduolio domenu (Cheang et al., 2008).

1.4 PrP^{Sc}

Šiuo metu žinoma, jog PrP^C struktūra sudaryta daugiausiai iš α -spiralių ir nedidelio kiekio β -klosčių, o PrP^{Sc} priešingai – iš β -klosčių ir mažo kiekio α -spiralių (Prusiner, 1998), tačiau infekcinės prioninių baltymų formos PrP^{Sc} struktūra dar nėra galutinai išaiškinta ir vis dar yra tiriama. Neseniai atlikta vandenilio-deuterio mainų analizė kartu su masių spektroskopija naudojant iš smegenų išskirtus prionus parodė, jog tretinėje struktūroje α -spiralių nėra

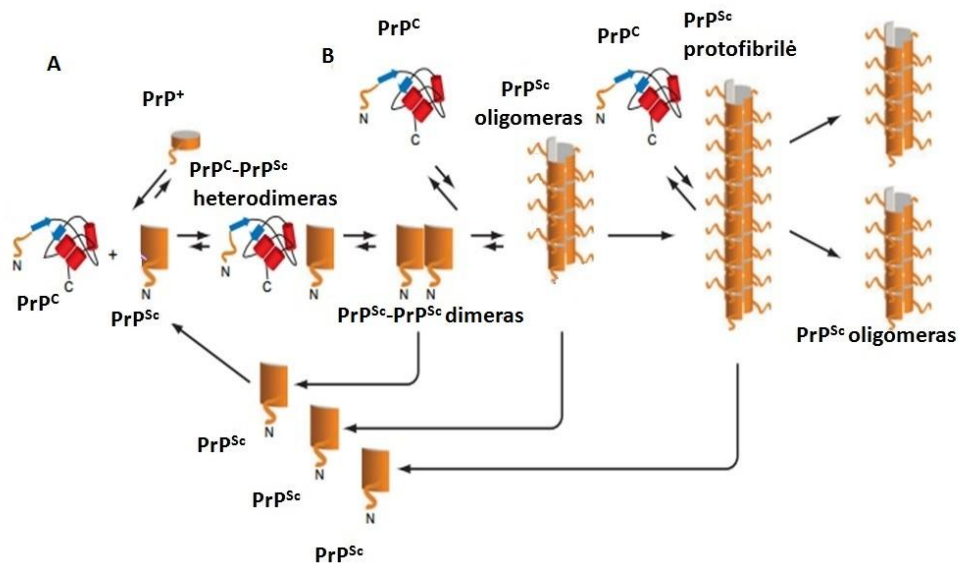
(Smirnovas et al., 2011). Būtent šie konformaciniai skirtumai tarp PrP^C ir PrP^{Sc}, nulėmė patogeninės prioninio baltymo izoformos aukštą atsparumą proteolizei ar degradacijai dezinfekcijos metu, naudojant įprastus cheminius ir fizikinius metodus. Priešingai nei PrP^{Sc}, PrP^C tirpsta nedenaatūruojančiuose tirpikliuose ir yra visiškai degraduojamas proteazių (Prusiner, 1998).

1.5 Prioninių baltymų virtimo į patogenines izoformas modeliai

Šiuo metu prioninių ligų mechanizmo aiškinimui yra labiausiai paplitusi *tik baltymo* (angl. protein only) hipotezė, kuri parodo kaip prionai sugeba pasidauginti nenaudodami nukleino rūgščių. Šiai hipotezei aiškinti yra siūlomi du modeliai: (1) heterodimero arba šablono valdomas suvyniojimo modelis, (2) nekatalitinis branduolių polimerizacijos modelis (Cheang et al., 2008; Laurent, 1996).

Šablono valdomas modelis siūlo, jog esant infekcijai, PrP^{Sc} pradeda katalitinę kaskadą naudodamas ląstelinius prioninius baltymus (PrP^C) arba dalinai išsivyniojusius prioninius baltymus (PrP⁺) kaip substratą, jų pavertimui į pakitusios konformacijos PrP^{Sc}, turinčius daug β-klosčių. Šie konformaciniai pokyčiai yra kontroliuojami kinetiškai: aukštas aktyvacijos barjeras apsaugo nuo spontaninės konversijos. PrP^C susijungimas į PrP^{Sc} heterodimerinį kompleksą, gali sumažinti aktyvacijos barjerą naujų PrP^{Sc} susidarymui iš PrP^C-PrP^{Sc} (Cheang et al., 2008; Horiuchi, Caughey, 1999). Manoma, jog PrP^C išvyniojimo ir suvyniojimo procese PrP^{Sc} gali tiesiogiai arba netiesiogiai dalyvauti kaip šaperonai (Laurent, 1996). Paveldimi prioninių ligų atvejai yra susiję su tam tikromis mutacijomis ir pagal šį modelį manoma, jog šie mutantiniai baltymai turi sumažėjusį aktyvacijos barjerą, dėl ko padidėja tikimybė jiems spontaniškai virsti į patogenines izoformas (Cheang et al., 2008).

Alternatyvus nekatalitinis branduolių polimerizacijos modelis teigia, jog šis konformacinis procesas yra termodinamiškai kontroliuojamas: PrP^C virtimas į PrP^{Sc} yra grįžtamas procesas (1.2 pav. B). Ši teorija teigia, jog monomerinė PrP^{Sc} forma nėra pavojinga iki tol, kol nesuformuoja fibrilių ar agregatų (Aguzzi, Calella, 2009; Laurent, 1996). Susidaręs PrP^{Sc} stabilizuojamas tik tada, kai yra įjungiamas į PrP^{Sc} agregatus arba kristalus. Pradinis branduolio arba sėklos formavimasis vyksta lėtai dėl silpnų vienvalečių ryšių tarp molekulių ir dėl mažo kiekio molekulių, gebančių polimerizuotis. Tačiau susidariusi oligomerinė sėkla yra stabilizuojama daugiavalečiais ryšiais, kuri jungia naujas molekules. Prijungtos molekulės taip pat yra stabilizuojamos daugiavalečiais ryšiais, esančiais sėklos paviršiuje (Horiuchi, Caughey, 1999).



1.2 pav. PrP^C virtimo į PrP^{Sc} modeliai. A) Šablono valdomas modelis. PrP^{Sc} tarnauja kaip šablonas verčiant PrP^C arba PrP⁺ į PrP^{Sc} izoformą, kuri yra jungiama į amiloidines fibriles. B) Nekatalitinis branduolių polimerizacijos modelis. Natyvaus baltymo PrP^C virtimas į patogeninę PrP^{Sc} baltymo formą yra grįžtamas procesas, valdomas termodinamiškai. Reakcijos pusiausvyra yra stipriai pasislinkusi į PrP^C izoformos pusę. PrP^{Sc} stabilizuojama tik įjungus į amiloidines fibriles (pritaikyta iš Cheang et al., 2008).

1.6 Mutacijos žmogaus prioniniame baltyme

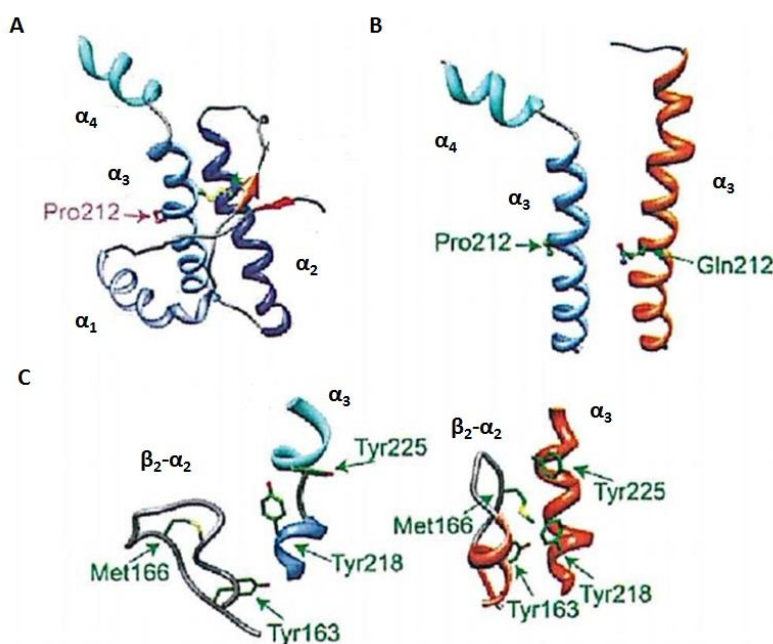
Apie 85 proc. prionų sukiamų ligų žmogui pasireiškia spontaniškai, kurių kilmė nėra aiški. To pavyzdys yra sporadinė KJL. Apie 10–15 proc. šių baltymų sukiamų ligų yra paveldimos ir nulemtos mutacijų žmogaus prioninio baltymo gene *PRNP* ir tik mažiau negu 1 proc. ligų kyla dėl infekcijos. Daugelis taškinių mutacijų yra tose geno dalyse, kurios koduoja alfa spirales ir sukelia paveldimas KJL, GSS ir mirtiną šeimyninę nemigą (Gambetti et al., 2003).

Vienos iš žinomiausių susijusių su ligomis mutacijų, aptinkamų *PRNP* gene, yra V210I (baltymo 210 pozicijoje valinas pakeistas į izoleuciną) ir Q212P (212 baltymo pozicijoje glutaminas pakeistas į proliną). V210I mutacija sukelia paveldimą KJL, o Q212P atsakinga už paveldimą GSS. Taip pat yra nustatytos ir keletas apsauginių mutacijų. Viena iš jų yra E219K (219 baltymo pozicijoje glutamo rūgštis yra pakeista į liziną) ir remiantis atliktais tyrimais nustatyta, jog ši mutacija esant heterozigotiniams aleliams pasižymi apsauginiu efektu prieš infekcinę KJL (Ilc et al., 2013).

1.6.1 Su ligomis susijusios mutacijos

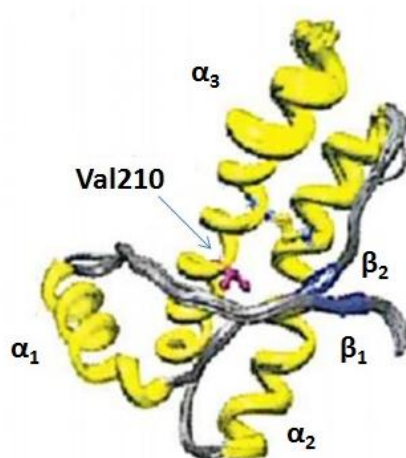
GSS yra lėtai progresuojanti paveldima autosominė liga, sukelta Q212P mutacijos prioninio baltymo gene. Glutaminas yra α_3 spiralės viduryje šalia Cys179-Cys214 disulfidinio tiltelio. Globulinis šio mutantinio baltymo domenai sudarytas iš keturių α spiralių ir dviejų nelygiagrečių β klosčių (1.3 pav. A). Nors šio baltymo struktūra yra labai panaši į natyvaus prioninio baltymo struktūrą, tačiau taip pat yra pastebimi ir svarbūs struktūros pokyčiai, kuriuos nulemia vienos amino rūgšties pakeitimas kita. Vienas iš svarbiausių požymių yra α_3 spiralės trūkis, kuris suformuoja dvi atskiras α spirales (Ilc et al., 2010, 2013). Susiformavusi nauja α_4 spiralė yra sudaryta iš kelių aminorūgščių (223-226 aminorūgštys) (1.3 pav. B). Taip pat ši mutacija lemia ir α_2 - α_3 spiralių orientacijos pasikeitimą erdvėje.

Kitas svarbus efektas, parodantis lokalius struktūros pokyčius, yra β_2 - α_2 kilpos sąveika su α_3 -spiralės C galine dalimi (1.3 pav. C). Natyviame baltyme yra pastebima stipri hidrofobinė sąveika tarp šių struktūrų, o mutantiniame baltyme ši sąveika nėra nustatyta. Šios sąveikos praradimas nulemia tai, jog hidrofobinis paviršius atidengiamas sąveikai su tirpikliu (Ilc et al., 2013).



1.3 pav. Q212P mutanto ir natyvaus žmogaus prioninių baltymų struktūrų palyginimas. A) Q212P mutanto 3D struktūra. B) Q212P α_3 -spiralės struktūra lyginant su natyvia α_3 -spirale. C) β_2 - α_2 kilpos sąveika su α_3 spiralės C galine dalimi Q212P mutantiniame ir natyviame prioniniame baltyme (pritaikyta iš Ilc et al., 2013).

V210I mutacija gana dažnai aptinkama Europos populiacijoje ir yra susijusi su paveldima KJL. Sergant šia liga pasireiškia silpnaprotystė, ataksija (raumenų koordinacijos nebuvimas) ir mioklonija (trumpi, žaibiški viso kūno ar jo dalių trūktelėjimai). Valinas yra α_3 spiralės viduryje ir formuoja 20 aminorūgščių hidrofobinį branduolį, kuris yra labai svarbus bendram globulinio domeno stabilumui. Panašiai kaip ir Q212P mutacija, valino pakeitimas į izoleuciną nesukelia stiprios baltymo struktūros persitvarkymo (1.4 pav.). Šis mutantas turi gerai struktūrizuotą C galinę dalį, turinčią tris α spirales ir dvi trumpas β klostes. Vienas iš pastebimų efektų, pakeitus valiną į didesnę šoninę grandinę turinčią aminorūgštį izoleuciną, yra sustiprėjusi sterinė grūstis tarp α_2 - α_3 spiralių. Taip pat pastebimas hidrofobinių sąveikų praradimas tarp Val180 su Val176 ir Ile184, kurios normaliai egzistuoja natyviame prioniniame baltyme. Panašiai kaip ir Q212P mutacijos atveju, sąlyčio praradimas V210I mutacijos atveju tarp β_2 - α_2 kilpos ir α_3 spiralės C galinės dalies, atidengia hidrofobinį baltymo paviršių sąveikai su tirpiklio molekulėms. Manoma, jog ši bendra savybė su ligomis susijusioms mutacijoms yra viena iš pagrindinių, nulemianti neurotoksiškumą (Ilc et al., 2013).

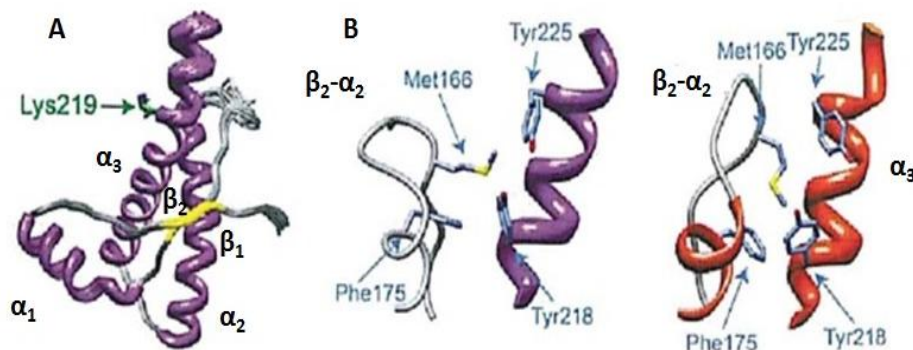


1.4 pav. V210I mutantinio prioninio baltymo 3D struktūra. Pastebima sustiprėjusi sterinė grūstis tarp α_2 - α_3 spiralių (pritaikyta iš Ilc et al., 2013).

1.6.2 Apsauginė E219K mutacija

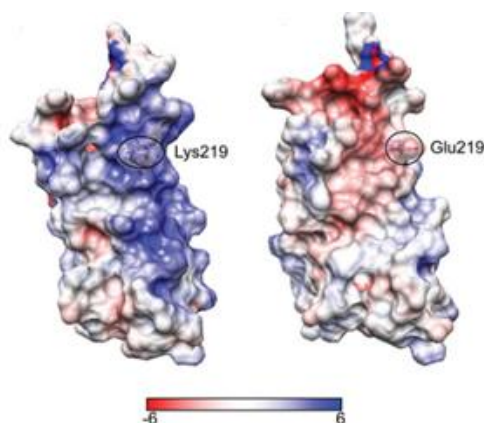
Dažniausiai pasitaikanti prioninė liga žmonių tarpe yra sporadinė KJL (Biljan et al., 2012). Atlikti branduolių magnetinio rezonanso tyrimai parodė tam tikrus pokyčius, kurie gali turėti įtakos apsprendžiant šios mutacijos apsauginį efektą prieš sKJL. Mutantinio baltymo globulinė struktūra (1.5 pav. A) yra labai panaši į natyvaus prioninio baltymo. Dėl šios

mutacijos pastebima pakitusi tam tikrų struktūrų (β_1 - α_3 kilpos, α_1 - β_1 kilpos ir α_3 spiralės) orientacija, dėl ko sustiprėja hidrofobinė sąveika (Ilc et al., 2013).



1.5 pav. E219K mutanto struktūra ir palyginimas su natyviu baltymu. A) E219K mutantinio prioninio baltymo 3D struktūra. B) β_2 - α_2 kilpos sąveika su α_3 -spiralės C galine dalimi E219K mutantiniame ir natyviame prioniniame baltyme (pritaikyta iš Ilc et al., 2013).

Didžiausias hidrofobinės sąveikos stiprumo padidėjimas fiksuojamas tarp β_2 - α_2 kilpos ir α_3 spiralės C galinės dalies (1.5 pav. B). Tai pagrindinis skirtumas, lyginant su pataloginėmis mutacijomis, kurios turi susilpnėjusią hidrofobinę sąveiką. Taip pat nustatyta, jog pakeitus glutamo rūgštį į liziną pasikeičia baltymo paviršinių krūvių pasiskirstymas (1.6 pav.) (Cappai, Collins, 2004). Remiantis šiuo pastebėjimu yra bandomas aiškinti dominantinis neigiamas slopinimo efektas, minimas tolimesnėje darbo dalyje. Manoma, jog skirtingi krūviai tarp natyvaus baltymo ir E219K mutanto palengvina tarpmolekulinę sąveiką tarp šių dviejų alelinių variantų, tokiu būdu juos surišant tarpusavyje ankstyvoje fibrilizacijos proceso stadijoje (Biljan et al., 2012).



1.6 pav. Mutantinio (kairėje) ir natyvaus (dešinėje) baltymo elektrostatis paviršiaus potencialas esant pH 5,5 (pritaikyta iš Ilc et al., 2013).

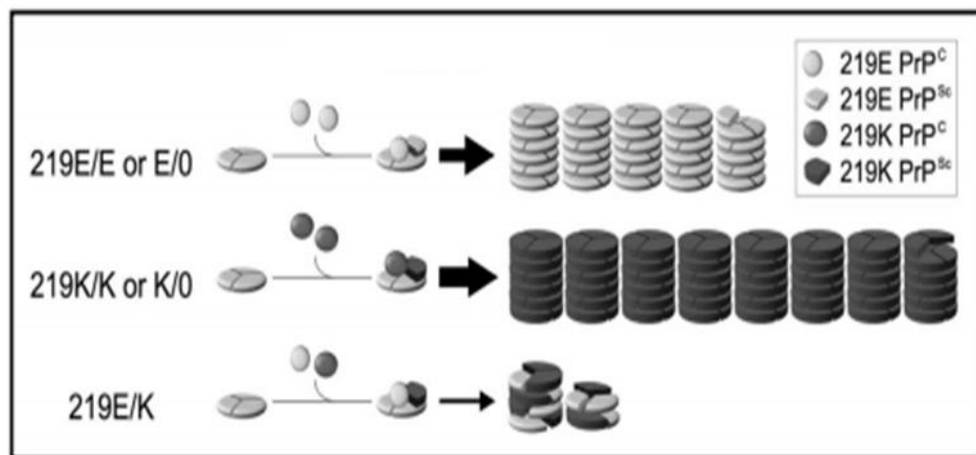
1.6.3 Heterozigotinio slopinimo fenomenas

Natūraliai aptinkamas E219K polimorfizmas žmogaus prioniniame baltyme buvo nustatytas japonų populiacijoje, vėliau aptiktas ir kitų rytų Azijos valstybių populiacijose, pietų Afrikoje ir Ramiojo vandenyno regione, tačiau šio polimorfizmo atvejų nebuvo nustatyta tarp kaukazoidų. Pastebėta, jog pacientuose, sergančiuose sporadine KJL, E219K polimorfizmas yra aptinkamas labai retai, todėl šis polimorfizmas yra laikomas kaip apsauginis prieš šią ligą (Hizume et al., 2009; Shibuya et al., 1998). Atlikti bandymai su pelėmis, turinčiomis E218K polimorfizmą (atitinka žmogaus E219K) parodė, jog prioninis baltymas nėra konvertuojamas į patogeninę PrP^{Sc} izoformą, esant sporadiniam KJL užkratui. Norint nustatyti žmogaus prioninio baltymo HuPrP219K virsmo į patogeninę izoformą efektyvumą, buvo atlikti eksperimentai su transgeninėmis pelėmis. Šios pelės, turinčios skirtingus žmogaus prioninio baltymo genotipus 219E/K, 219E/E, 219K/K, 219K/0, 219E/0 (heterozigotinį, homozigotinius ir hemizigotinius), buvo paveiktos infekcinės KJL ligos sukėlėjais iš dviejų skirtingų pacientų. Pelėse, turinčiose įjungtą *PRNP* 219K/K geną, buvo stebėtas patogeninės izoformos susidarymas kur kas efektyvesnis, nei pelėse, turinčiose įjungtą laukinio tipo homozigotinį *PRNP* 219E/E geną, bet taip pat buvo pastebėta, jog pelėse turinčiose įjungtą heterozigotinį 219E/K geną, prioninių baltymų konversija į patogeninę izoformą buvo lėčiausia (Hizume et al., 2009).

Identiški eksperimentai buvo atliekami ir su žmonių populiacijoje aptinkamu M129V polimorfizmu. Buvo žinoma, jog infekciniai KJL prionai gali plisti pelėse, ekspresuojančiose HuPrP129M/M, bet negali plisti esant HuPrP129V/V ekspresijai. Ankstesni tyrimai pademonstravo, jog prioninio baltymo molekulės (129V/V), negebančios konvertuotis į patogeninę izoformą, veikia kaip slopikliai kitų, gebančių konvertuotis molekulių (129M/M), virsmo procese. Šis slopinimo tipas buvo pavadintas dominantiniu neigiamu efektu. Atlikti identiški tyrimai su skirtingo tipo genotipais transgeninėse pelėse parodė tokį patį rezultatą, kaip ir bandymai su HuPrP219E/K. Buvo stebėtas susidariusių prionų kiekis ir taip pat nustatyta, jog mėginiuose, paimtuose iš heterozigotinio organizmo (129M/V), susidariusios PrP^{Sc} izoformos kiekis buvo mažiausias, lyginant su mėginiais, paimtais iš homozigotinių ar homozigotinių organizmų (Kobayashi et al., 2009).

Remiantis šiais ir ankstesniais tyrimais nustatyta, kad šis universalus heterozigotinio slopinimo fenomenas gali būti sukeltas tiek gebančio, tiek negebančio virsti į patogeninę PrP^{Sc} izoformą prioninio baltymo. Šiuo metu nėra žinomas šio proceso mechanizmas, tačiau

yra pasiūlytas akmeninės sienos (angl. stone fence) modelis (1.7 pav.), kuris pritaikytas abiejų šių tipų prioninių baltymų molekulėms. Pagal branduolių polimerizacijos teoriją, PrP^C virsta į PrP^{Sc} ir jungiasi į amiloidines fibriles. Homozigotiniuose ir hemizigotiniuose organizmuose virsmo rezultatas yra vienos rūšies PrP^{Sc} populiacija. Heterozigotiniuose organizmuose konversijos rezultatas yra dvi skirtingos PrP^{Sc} populiacijos, su skirtingomis struktūromis. Šie du baltymai su skirtingomis struktūromis yra jungiami į tas pačias fibriles kaip heterologiniai blokai, atskirti *akmenine siena*. Pagal šį modelį, fibrilių formavimasis vyksta lėčiau dėl to, kad šie blokai trukdo vienas kitam sąveikaudami dėl savo skirtingos struktūros (Kobayashi et al., 2009).



1.7 pav. Akmeninės sienos modelis. Esant 219E sėklai, homozigotuose (219E/E arba 219K/K) ir hemizigotuose (219E/0 arba 219K/0) PrP^{Sc} molekulės jungiamos į amiloidines fibriles ir gaunasi vienos rūšies PrP^{Sc} populiacijos, tačiau 219K PrP^C konversija vyksta efektyviau, nei 219E PrP^C. Esant heterozigotiniams (219E/K) gyvūnams formuojasi dvi PrP^{Sc} populiacijos, kurios jungiasi į tas pačias amiloidines fibriles, dėl to stebimas lėtesnis fibrilių formavimasis (pritaikyta iš Kobayashi et al., 2009).

2. Medžiagos ir metodai

2.1 Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės

2.1.1 Naudotos medžiagos ir rinkiniai pagal gamintoją

Vilniaus degtinė: etanolis 96 %.

Acros Organics: acto rūštis 99,5 %; amonio chloridas 99,6 %; amonio persulfatas 99 %; dinatrio hidrofosfatas 99 %; druskos rūgštis 37 %; glicerolis 99 %; guanidino chloridas 98 % su 0,4% silicio dioksidu; natrio chloridas; natrio šarmas 50 %, nikelio chloridas 98%; natrio sulfatas 99 %; trichloracto rūgštis 99 %.

Carl Roth: agaras, ampicilinas natrio druskos pavidale 99 %; dikalio hidrofosfatas 99 %; etidžio bromidas 1%; kalio dihidrofosfatas 99 %; LB-Medium mitybinė terpė; natrio acetato trihidratas 99,5 %.

Fisher Scientific: agarozė; akrilamido:bisakrilamido tirpalas 40 %; dažas Kumasi brilianto mėlis R-250 (Coomassie Brilliant Blue 250R); ditiotreitolis (DTT); D-gliukozė 99,8 %, etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio dihidratas 99 %; glicinas 98,5 %; glutationas; imidazolas 99 %; izopropiltio-β-galaktozidas; kalio chloridas 99 %; laktozė; magnio sulfato heptahidratas 99,5 %; mielių ekstraktas; natrio dodecilsulfatas 99 %; TEMED; triptonas; TRIS 99 %.

Thermo Fisher Scientific Baltics: 6X DNR pavyzdžio buferinis tirpalas (Orange DNA Loading Dye); baltymų molekulinės masės žymenys (Pierce™ Unstained protein MW Marker ir EZ-Run Rec Protein Ladder); DNR molekulinės masės žymuo (O'GeneRuler DNA Ladder Mix); dNTP mišinys; restrikcijos endonukleazė (DpnI); PGR rinkinys *Phusion High Fidelity PCR Kit*; plazmidinės DNR gryninimo rinkinys *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*;

Fluka: bromfenolio mėlis.

Metabion international AG: oligonukleotidiniai pradmenys.

SERVA: 2-merkptoetanolis.

2.1.2 Naudota laboratorinė įranga

Autoklavas: „AHS-75N Steam Sterilizer”.

Automatinis termocikleris „Veriti 96-Well Thermal Cycler“.

Centrifugos: minicentrifuga „Techniko maxi“; „HiCen SR“ (HeroLab) (rotoriai: AF 6.500, AF 8.50.2, AS 4.500).

Chromatografinė kolonėlė: „GE Healthcare XK 26/20“.

Chromatografinė sistema: „ÄKTApurifier“.

Dializės žarna 50 mm diametro „Zella Trans Roth“, kurios pralaidumas yra 6–8 kDa.
DNR elektroforezės gelių vaizdo dokumentavimo sistema „MiniBis Pro“.
Elektroforezės srovės šaltinis. „CONSORT EV 243“.
Filtrai 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro „Millipore“.
Horizontalios elektroforezės sistema: „Horizontal Gel Tank Sub-gel Mini“.
Kaitinimo plytelė: „Becelek II“.
Kiuvetė: „Helema Analytics“ High-Precision Cells CXA-145-330Q.
Koncentratoriai: „Amicon® Ultra–15“ (pralaidumas 10 kDa).
Magnetinė maišyklė ir kaitinimo plytelė: „Arre Heating Magnetic Stirrer“.
Maišyklė: „CLASSIC Vortex Mixer“.
pH-metras: „Orion DUAL STAR meter“.
Purtyklė: „IKA KS 4000i Control“.
Rankinis homogenizatorius: „Potter-Elvehjem“.
Refraktrometras: „RL3“.
Spektrofotometras „Nanodrop 1000“.
Spektrofotometras: „Shimadzu UV-1800“.
Svarstyklės : „KERN PCB 400-2“.
Švirkštiniai filtrai 0,22 µm porų dydžio, 33 mm diametro „Rotilabo-Spritzenfilter“.
Termostatas: „Fisher Scientific“.
Termostatinė vonelė: „Fisherbrand Mini Dry Bath“.
Ultragarso šaltinis: „Bandelin Sonopuls 3100“ (antgalis: VS70T).
Vakuuminė filtravimo sistema: „Sigma-Aldrich“.
Vartyklė „ProBlot 25 Rocker“.
Vertikalios elektroforezės sistema: „Minigel-Twin“.

2.1.3 Naudoti sorbentai

GE Healthcare: „Ni Sepharose™ 6 Fast Flow“.

2.1.4 Naudoti bakterijų kamienai

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

Plazmidinės DNR padauginimui naudotas kamienas *E. coli* XL1-Blue, kuris turi tokias genetines charakteristikas: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]. Kamienas pirktas iš *Invitrogen*.

2.1.5 Naudoti konstruktai

pRSETA plazmidė, turinti įklonuotus atsparumo ampicilinui ir HuPrP23-231 priono su N-galo 6 histidinių uodega genus. Plazmidė sukonstruota Fiziologijos ir Biofizikos skyriuje, Case Western Reserve universitete, Klyvlende, JAV (prof. Witold K. Surewicz grupėje).

2.1.6 Naudoti oligonukleotidiniai pradmenys

1 lentelė. E219K ir Q212P mutacijoms įvesti į HuPrP23-231 baltymo geną naudoti oligonukleotidiniai pradmenys. T_m – pradmenų lydymosi temperatūra.

Mutacija	Pradmens tipas	Pradmens nukleotidų seka	T _m , °C
E219K	Tiesioginis	5'-GTATCACCCAGTACAAAAGGGAATCTCAGGCC-3'	74
	Atvirkštinis	5'-GGCCTGAGATTCCCTTTTGTACTGGGTGATAC-3'	74
Q212P	Tiesioginis	5'-GCGTGGTTGAGCCGATGTGTATCAC-3'	69
	Atvirkštinis	5'-GTGATACACATCGGCTCAACCACGC-3'	69

2.1.7 Mitybinės terpės

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

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

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

S.O.C. mitybinė terpė: 2 g peptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės. Peptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami 97 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min. 121°C temperatūroje. Atvėsus iki kambario temperatūros pridedama Mg²⁺ druskų ir gliukozės ir steriliai nufiltruojama.

2.1.8 Tirpalai

0,1 M HCl: 0,83 mL 37 % HCl tirpalo ($\rho = 1,18$) traukos spintoje praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M HCl: 8,3 mL 37 % HCl tirpalo ($\rho = 1,18$) traukos spintoje praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

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

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

1 M TRIS: 15,76 g TRIS–HCl tirpinama 60 mL dejonizuoto vandens. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M CH₃COOH: 6,4 mL 99,5 % ledinės acto rūgšties ($\rho = 1,048$) traukos spintoje praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M CH₃COONa: 13,15 g 99,5 % natrioacetato-trihidrato ištirpinama ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M K₂HPO₄: 87,09 g K₂HPO₄ ištirpinama ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 0,5 L.

1 M KH₂PO₄: 68,05 g KH₂PO₄ ištirpinama ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 0,5 L.

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

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

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

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

APS 10 %: 100 mg amonio persulfato tirpinama 900 μ L dejonizuoto vandens.

6X pavyzdžio buferinis tirpalas: 1,2 g NDS ištirpinama 6 mL glicerolio, pridedama 3,75 mL 1 M TRIS pH 6,8 ir 90 mg DTT bei 6 mg bromfenolio mël̃io. Praskiedžiama iki 10 mL dejonizuotu vandeniu.

Elektroforezės buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas): 25 mM TRIS, 192 mM glicino, 0,1 % NDS, pH 8.3–8.6 (pH nekoreguojamas). 288 g glicino, 60,4 g TRIS, 20 g NDS tirpinama 2 L dejonizuoto vandens.

6 M guanidino chlorido, 0,1 M EDTA: 37,2 g etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio dihidrato ir 586,43 g 98 % guanidino chlorido ištirpinama dejonizuotame vandenyje ir praskiedžiama iki 1 L.

DNR elektroforezės buferinis tirpalas TAE (50 kartų koncentruotas): 18,6 g etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio dihidrato ištirpinama 600 mL dejonizuoto vandens. Tirpinimo metu palaikomas pH 8. Gautame tirpale ištirpinama 242 g TRIS ir įpilama 57,2 mL ledinės acto rūgšties. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL, pH 8.3-8.5 (pH nekoreguojamas).

0,1 M NiCl: 23,8 g nikelio chlorido heksahidrato ištirpinti 800 mL dejonizuoto vandens ir praskiesti vandeniu iki 1 L.

Agarozinis tirpalas 1%: 0,5 g agarozės tirpinama 50 mL 1X TAE buferyje kaitinant, kol ištirps. Atšalęs tirpalas sustingsta ir prieš naudojimą yra pakaitinamas, kad išsilydytų gelis.

TCA 7%: 7 g trichloracto rūgšties ištirpinama 93 mL dejonizuoto vandens.

2.1.9 Buferiniai tirpalai naudoti baltymų gryninime

A. 10 mM TRIS, 100 mM K₂HPO₄, pH 8.

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M K₂HPO₄ tirpalo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 1 M HCl tirpalu iki pH 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą, naudojant vakuuminio filtravimo įrangą.

B. 50 mM imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM K₂HPO₄, pH 8.

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M K₂HPO₄ tirpalo, pridedama 3,4 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 1 M HCl tirpalu iki pH 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą, naudojant vakuuminio filtravimo įrangą.

C. 700 mM imidazolo, 10 mM TRIS, 100mM KH₂PO₄, pH 5,8.

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M KH_2PO_4 tirpalo, pridedama 47,66 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 1 M HCl tirpalu iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą, naudojant vakuuminio filtravimo įrangą.

D. 6 M guanidino chlorido, 10 mM TRIS, 100 mM KH_2PO_4 , 10 mM glutationo, pH 8.

Iš pradžių pasiruošiama 7 M guanidino chlorido tirpalas. Atsveriama 573 g 98 % guanidino chlorido, užpilama 10 mL 1 M TRIS tirpalo ir 100 mL 1M KH_2PO_4 tirpalo. Užpilamas pakankamas kiekis dejonizuoto vandens (bendras tirpalo tūris apie 850 mL) ir šildant ant magnetinės maišyklės laukiama, kol ištirps guanidino chloridas. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio filtrą, naudojant vakuuminio filtravimo įrangą. Tikslī guanidino chlorido koncentracija nustatoma refraktometru. Prieš pat naudojimą įdedama į tirpalą 3,07 g glutationo. Tirpalo pH koreguojamas su 1 M NaOH ir 1 M HCl iki pH 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu maždaug iki 1000 mL (tikslus praskiedimas sužinomas iš refraktometro parodymų. Tikslī guanidino chlorido koncentracija turi būti 6 M). Tirpalas su glutationu laikomas ant ledo ir perfiltruojamas naudojant 0,22 μm porų dydžio, 33 mm diametro švirkštinį filtrą.

E. 10 mM acetatinis buferis, pH 4.

32 mL 1 M CH_3COOH sumaišoma su 8 mL 1 M CH_3COONa ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 3800 mL. pH koreguojamas 1 M NaOH iki pH 4. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 4000 mL.

2.2 Metodai

2.2.1 Mutagenezė

Polimerazinė grandininė reakcija. PGR yra vykdoma naudojant termociklerį *Veriti 96-Well Thermal Cycler*. PGR reakcijos mišinį (20 μL) sudaro: 1X DNR polimerazės reakcijos GC buferis *5X Phusion High-Fidelity*, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP, 3 proc. DMSO, 0,5 μM kiekvieno iš pradmenų, 0,4 U *Phusion High-Fidelity* DNR polimerazės ir skirtingas plazmidinės DNR kiekis (13 arba 39 ng). Reakcijos mišinys supurtomas, centrifuguojamas.

DNR sintezė vykdoma 25 ciklus, kuriuos sudaro: DNR denatūracija (98°C, 10 s); pradmenų prilydymas (parenkamos 6 skirtingos temperatūros, kas du laipsnius 64-74°C, 30 s); DNR sintezė (72°C, 105 s; laikas parenkamas pagal sintetinamo fragmento ilgį; *Phusion*

High-Fidelity DNR polimerazės DNR sintezės greitis yra 15-30 s/kb). Pradinė DNR denatūracija vykdoma 98°C, 30 s. Ciklą pabaigoje 10 min. palaikoma 72 °C.

Elektroforezė agaroziniame gelyje. DNR fragmentai frakcionuojami elektroforezės būdu 1 % agarozės gelyje. Paruoštas 1 % agarozinis tirpalas (30 mL) kaitinamas ant kaitinimo plytelės, kol ištirpsta. Atvėsinus iki maždaug 50°C, įpilama 1,5 µL etidžio bromido, gerai išmaišoma ir užpilamas horizontalios elektroforezės gelio lovelis su įstatytomis šukomis šulinėliams gelyje suformuoti. Paliekama kambario temperatūroje kol sustings. Sustingus agarozei, šukos ištraukiamos ir lovelis su geliu dedamas į elektroforezės aparatą ir užpilamas 1X TAE buferiu. Į vieną iš šulinėlių įnešama 3,5 µL DNR molekulinės masės žymens, o į kitus užnešama po 5 µL PGR reakcijos produkto sumaišyto su 6X DNR pavyzdžio buferiniu tirpalu. Elektroforezė vykdoma 50 min. esant pastoviam 75 mA srovės stipriui. Gelis vaizdinamas ir analizuojami PGR produktai.

PGR produkto apdorėjimas DpnI restrikcijos endonukleaze. DpnI restrikcijos endonukleazė atpažįsta metilintas GA^ATC (metilintas adeninas) sekas ir skelia už adenino. Kadangi PGR produktas nėra metilintas, todėl ši endonukleazė atpažįsta tik matricinę plazmidinę DNR ir ją suskaldo.

Į PGR reakcijos produktą (15 µL) įdedama 1-2 µL DpnI restrikcijos endonukleazės ir inkubuojama termostate 37°C 30-60 min.

2.2.2 Plazmidinės DNR gryninimas

Transformacija į *E. coli* XL1-Blue kompetentines ląsteles. Į 100 µL atšildytą kompetentinių *E. coli* XL1-Blue ląstelių kultūrą įdedama 5 µL PGR reakcijos mišinio, apdoroto DpnI restrikcijos endonukleaze. Transformacijos mišinys inkubuojamas lede 30 min. Vykdomas karščio šokas laikant 90 s termostate 42°C temperatūroje. Po to staigiai perkeliamas mišinys į ledą ir inkubuojama 2 min. Ant ląstelių užpilama 400 µL S.O.C terpės ir inkubuojama purtyklėje (45 min. 37°C temperatūroje 220 aps./min). Centrifuguojama 20°C temperatūroje 2 min. 8050×g. Dalis supernatanto nupilama, ląstelės suspenduojamos likusiame tūryje ir išsėjamos ant pašildytų 37°C Petri lėkštelių su agarizuota LB terpe. Inkubuojama termostate ~16 val. 37 °C.

***E. coli* auginimas LB terpėje.** Viena transformantų kolonija nuo Petri lėkštelės steriliai su kilpele užsėjama į mėgintuvėlį su 5 mL LB terpės ir purtyklėje auginama ~16 val. 37°C, 220 aps./min.

Plazmidinės DNR išskyrimas. Plazmidinė DNR išskirta pagal *GenJET Plasmid Miniprep Kit* rinkinio gamintojo rekomendacijas.

Užauginta bakterijų kultūra surenkama centrifuguojant 8000×g viename *Eppendorf* tipo mėgintuvėlyje kelis kartus, pastoviai nupilant supernatantą. Bakterijos suspenduojamos 250 µL resuspendavimo tirpale iki tol, kol nelieta ląstelių gabalėlių. Pridedama 250 µL lizės tirpalo ir vartant maišoma, kol tirpalas tampa tašus. Pridedama 350 µL neutralizavimo buferio ir švelniai sumaišoma vartant mėgintuvėlį. Centrifuguojama 5 min >12000×g. Supernatantas nusiurbiamas, stengiant neįsiurbti nuosėdų ir perkeliamas į *GeneJet* kolonėlę. Centrifuguojama 1 min >12000×g. Skystis iš kolonėlės apačios išpilamas. Pridedama 500 µL plovimo tirpalo ir centrifuguojama 60 s >12000×g. Skystis išpilamas ir procedūra pakartojama antrą kartą. Skystis išpilamas ir dar kartą centrifuguojama tuščia kolonėlė. Pridedama 50 µL eliucijos buferio, inkubuojama kambario temperatūroje 2 min. ir centrifuguojama 2 min. >12000×g. Išgryninta plazmidinė DNR perkeliama į naują *Eppendorf* tipo mėgintuvėlį. Pamatuojama plazmidinės DNR koncentracija *NanoDrop 1000* spektrofotometru ($\lambda = 260$) ir atiduodama sekvenuoti į sekoskaitos centrą. Analizuojami sekoskaitos rezultatai NCBI/BLASTN internetine programa.

2.2.3 Baltymų ekspresija

Transformacija į *E. coli* BL21 Star™(DE3) kompetentines ląsteles. Į 100 µL atšildytą kompetentinių *E. coli* BL21 Star™(DE3) ląstelių kultūrą įdedama 1 µL plazmidinės DNR. Tolimesnė transformacijos eiga atliekama identiška kaip 2.2.2 skyriuje.

***E. coli* auginimas auto-induktyvioje ZYM-5052 mitybinėje terpėje.** Viena transformantų kolonija nuo Petri lėkštelės su sterilia kilpele užsėjama į 50 mL kolbutę su sterilia LB terpe ir auginama purtyklėje per naktį 37°C, 220 aps./min. Naktinė kultūra persėjama į keturias kolbas po 400 mL su auto-induktyvia ZYM-5052 terpe, skiedžiant naktinę kultūrą santykiu 1:40. Auginama bakterijų kultūra purtyklėje 8 val. 37°C, 220 aps./min. Po 1, 4 ir 8 valandų matuojamas optinis tankinis ($\lambda = 600$) ir pagal proporciją paimami kultūros mėginiai elektroforezei, baltymo raiškos stebėjimui. Mėginiai centrifuguojami 2 min. 8000×g. Supernatantas nupilamas, o ant ląstelių užpilama 25 µL

dejonizuoto vandens ir 5 µL 6x pavyzdžio buferinio tirpalo. Mėginiai kaitinami 10 min 98°C temperatūroje. Užauginta bakterijų kultūra surenkama centrifuguojant 30 min. 5000×g. Supernatantas pašalinamas, o biomasė užšaldoma -80°C temperatūroje.

Baltymų elektroforezė. Iš pradžių paruošiamas stiklinėje frakcionuojantis gelis sumaišant nurodytus reagentus 2.1 lentelėje. TEMED ir APS įpilami pačioje pabaigoje, prieš supilant tirpalą tarp elektroforezės stiklelių. Į nuvalytus ir suspaustus stiklelius supilamas paruoštas tirpalas ir užsluoksniuojama vandeniu. Stikleliai švelniai pavartomi ir paliekama kambario temperatūroje apie 40 min, kol įvyks polimerizacijos reakcija. Sustingus apatiniam geliui, nupilamas vanduo ir gelio viršus nusausinamas servetėle. Pasiruošiamas koncentruojamasis gelis ir užpilamas ant frakcionuojančio gelio viršaus, įdedamos šukos, kad susidarytų šulinėliai ir taip pat laukiama apie 40 min. Sustingus geliui, stikleliai įstatomi į elektroforezės aparatą, ištraukiama guminė tarpinė ir užpilamas aparatas vienkartinium elektroforezės buferiu. Tuomet ištraukiamos šukos ir į šulinėlius įnešami iškaitinti mėginiai. Elektroforezė vykdoma esant fiksuotam 30 mA srovės stipriui, kol migruojantis dažo frontas pasiekia gelio apačią. Sustabdoma elektros srovė, išimamas gelis iš stiklelių ir dažomas per naktį Kumasi brilianto mėlio R-250 dažu kambario temperatūroje purtant (80 aps./min). Po to nupilamas dažas ir užpilama dejonizuotu vandeniu. Padedamas indelis su geliu ant vartyklės ir laukiama kol dažas nubluks.

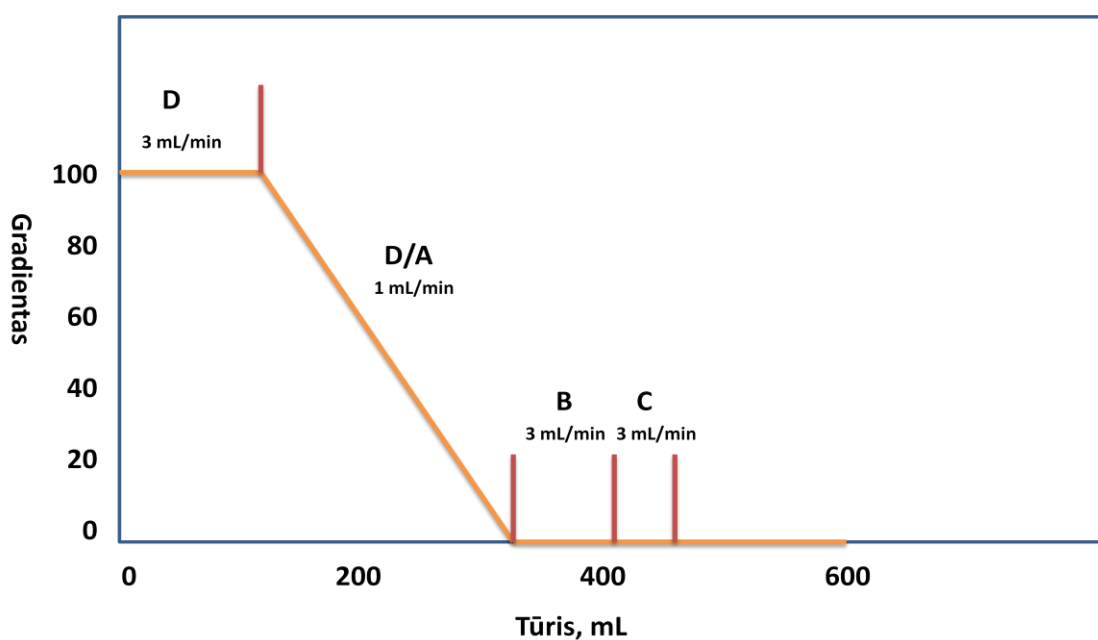
2.1 Lentelė. Medžiagų kiekis elektroforezės geliui

Frakcionuojantis 12 proc. gelis	Koncentruojantis 4 proc. gelis
„Minigel-Twin“ elektroforezės aparatui	
40 % AA/BAA 1,83 mL	40 % AA/BAA 201 µL
dH ₂ O 2,55 mL	dH ₂ O 1,25 mL
1,5 M TRIS–HCl pH 8,8 1,53 mL	1,5 M TRIS–HCl pH 6,8 0,5 mL
10 % NDS 61 µL	10 % NDS 200 µL
10 % APS 30,5 µL	10 % APS 10 µL
TEMED 3,65 µL	TEMED 2 µL

2.2.3 Baltymų gryninimas

Renatūracija ir giminingumo chromatografija. Biomasė sumaišoma su buferiniu tirpalu D santykiu 1:5 ir homogenizuojama. Ląstelės toliau yra ardamos ultragarsu 25 min.

laikant homogenizatą lede, esant 70 proc. amplitudei, 60/60s darbo/poilsio intervalais. Suardyta biomasė centrifuguojama 30 min., 4°C temperatūroje, 27000×g. Per tą laiką nikeliu užkrauto 20 mL *SepharoseTM 6 Fast Flow* sorbento yra pusiausvyrinama stiklinėje buferiniu tirpalu D. Gautas supernatantas po centrifugavimo yra užpilamas ant paruošto ir nupusiusvyrinto sorbento, o ląstelių nuolaužos yra išmetamos. Maišoma stiklinėje 20-30 min., 80 aps./min. greičiu, 4°C temperatūroje, kad tikslinis baltymas prisijungtų prie sorbento. Toliau pakraunama XK 26 kolonėlė sedimentaciniu metodu, sorbentą su prisijungusiu baltymu supylus į kolonėlę per stiklinę lazdele. Laukiama kol perteklinis tirpalas ištekės per kolonėlės apačią, saugant, kad nenudžiūtų viršutinis sorbento sluoksnis. Uždedamas viršutinis adapteris ir kolonėlė pajungiama prie chromatografinės sistemos. Iš pradžių kolonėlė praplaunama ~100 mL buferiniu tirpalu D esant 3 mL/min. greičiui. Po to vykdoma baltymo renatūracija iš tarpinių kūnelių 200 mL (1 mL/min.), palaikant linijinį gradientą – buferį D keičiant buferiniu tirpalu A. Pasibaigus renatūracijai kolonėlė praplaunama ~70 mL buferiniu tirpalu A (3 mL/min.). Po to vykdoma baltymo eliacija, naudojant laiptinį imidazolo druskos gradientą. Iš pradžių leidžiama ~60 mL buferinio tirpalo B (3 mL/min.), kurį pakeičia buferinis tirpalas C (3 mL/min.), kuris eliuoja tikslinį baltymą iš kolonėlės. Renkamos frakcijos po 5 mL, kol UV sugerties linija nukris iki bazinės linijos. Bendra renatūravimo ir gryninimo schema pateikiama 2.1 pav. Gryninant HuPrP23-231 Q212P baltymą buvo papildomai naudojamas 200 mM imidazolo buferio žingsnis.



2.1 pav. Bendra baltymo renatūracijos ir gryninimo giminingumo chromatografijos metodu schema, naudojant XK 26 koloną. D – buferinis tirpalas D; D/A – buferinių tirpalų D/A gradientas; B – buferinis tirpalas B; C – buferinis tirpalas C.

Darbo eigoje yra paimamas 100 μL ištekėjusio iš kolonėlės tirpalo mėginys elektroforezei. Tam vykdomas baltymo atskyrimas nuo guanidino chlorido, kuris trukdo elektroforezei. Baltymas išsodinamas naudojant 1 mL 7 proc. TCA tirpalą. Nuosėdos surenkamos centrifuguojant $8000\times g$, supernatantas nupilamas, o nuosėdos praplaunamos dejonizuotu vandeniu, suspenduojamos ir vėl centrifuguojamos. Supernatantas nupilamas ir užpilama 200 μL 0,1 M NaOH ir laukiama kol nuosėdos ištirps. Paimama 25 μL ištirpusio baltymo ir užpilama 5 μL elektroforezės pavyzdžio buferio. Mėginys kaitinamas 10 min., 98°C temperatūroje.

Baltymo dializė ir koncentravimas. Surinktos frakcijos apjungiamos ir supilamos į dializės žarną. Dializuojamas baltymas 4 L buferiniame tirpale E ant magnetinės maišyklės esant 80 aps./min., kas 3 valandas pakeičiant tris kartus buferinį tirpalą. Po dializės baltymas nufiltruojamas naudojant 0,22 μm porų dydžio, 33 mm diametro švirkštinį filtrą.

Išmatuojama baltymo koncentracija spektrofotometru ($\lambda = 280$) ir apskaičiuojama koncentracija (mg/mL) pagal formulę (1), kuri remiasi šviesos sugertį aprašančiu *Beer-Lambert* dėsnium:

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

kur A – baltymo optinis tankis, M – baltymo molekulinė masė (g/mol), ϵ – baltymo ekstinkcijos koeficientas ($25044 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), l – optinio kelio ilgis (1 cm).

Baltymas sukonzentruojamas iki $3 \pm 0,5$ mg/mL panaudojant koncentratorius „Amicon® Ultra-15“, kurių pralaidumas iki 10 kDa. Centrifuguojama kelis kartus po 8 min., 4°C , $5000\times g$ iš naujo kaskart papildant viršutinę koncentratoriaus dalį.

Sukonzentruotas baltymas išpilstomas į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius po 0,5 mg baltymo viename ir laikomas -80°C temperatūroje. Paimamas baltymo mėginys ir perduodamas atlikti masių spektrometrinę analizę.

Sorbento regeneravimas. Iš pradžių panaudotas *Sepharose™ 6 Fast Flow* sorbentas stiklinėje laikomas 1 val. 6 M guanidino chlorido, 0,1 M EDTA buferiniame tirpale. Po to taip pat pakartojama su 0,1 M NaOH tirpalu. ir 0,1 M HCl. Po kiekvieno iš šių žingsnių sorbentas gerai atplaunamas dejonizuotu vandeniu, naudojant Biuchnerio piltuvą. Galiausiai išvalytas

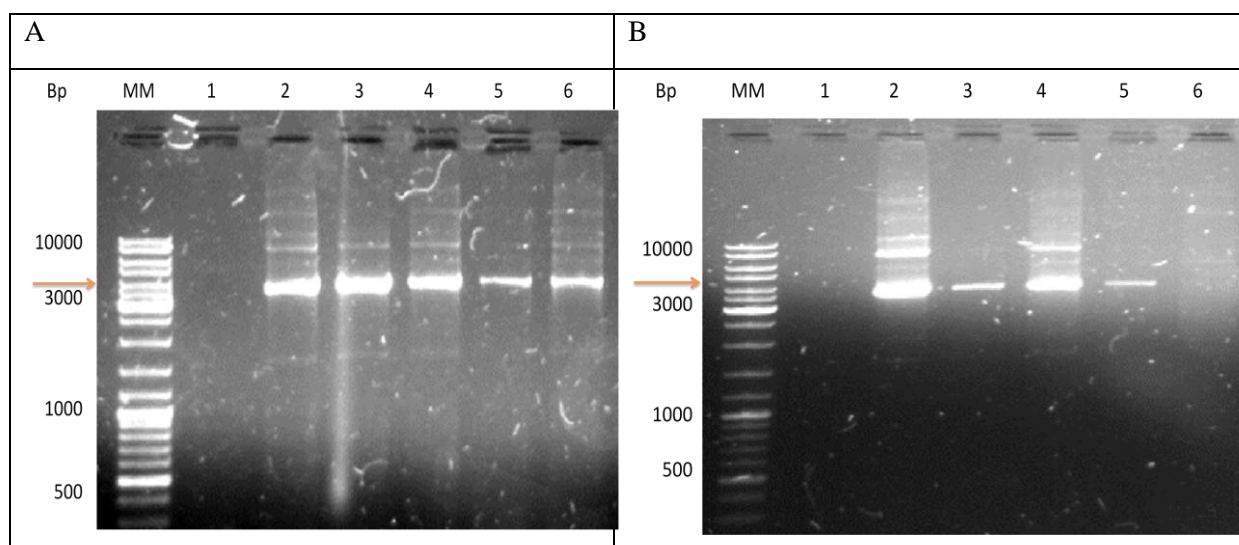
sorbentas užkraunamas Ni^{2+} jonais, palaikant 1 val. 0,1 M NiCl_2 tirpale ir po to taip pat gerai atplaunamas dejonizuotu vandeniu nuo NiCl_2 . Nuo sorbento nusiurbiamas vanduo ir užpilamas sorbentas 20 proc. etanolio tirpalu ir laikomas 4°C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1 E219K ir Q212P mutacijų gavimas

Žmogaus prioninio baltymo HuPrP23-231 E219K ir Q212P mutacijų gavimui buvo atlikta tikslinė HuPrP23-231 geno mutagenezė. Buvo naudojamos šešios skirtingos pradmenų prilydymo temperatūros (64, 66, 68, 70, 72 ir 74°C) ir du skirtingi matricos (plazmidinės DNR, turinčios natyvaus HuPrP23-231 geną su 6 histidino liekanomis ir atsparumo ampicilinui geną) kiekiai (13 ir 39 ng).

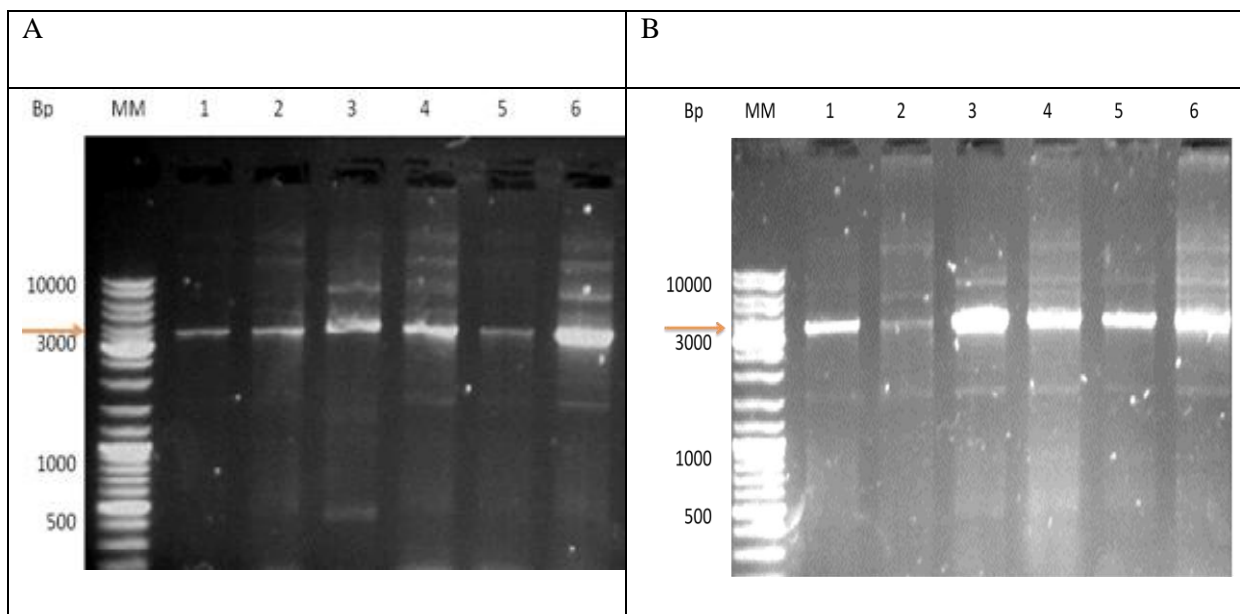
3.1 A ir B pav. elektroforezės geliuose matomi PGR produktai po E219K mutacijos įvedimo. Tolimesnei darbo eigai su šia mutacija buvo pasirinktas produktas A3 dėl mažo kiekio matomų šalutinių produktų ir buvo apdorotas DpnI restrikcijos endonukleaze bei transformuotas į *E. coli* XL1-Blue kompetentines ląsteles. Ląstelės buvo auginamos LB terpėje ir iš jų išgryninta plazmidinė DNR, kurios koncentracija buvo 171,2 ng/μL



3.1 pav. HuPrP23-231 E219K mutacijos įvedimas PGR metodu. PGR produktai frakcionuoti 1proc. agaroziniame gelyje. A) MM – molekulinis žymuo (O'GeneRuler DNA Ladder Mix); 1 – 64°C, 13 ng DNR; 2 – 64°C, 39 ng DNR; 3 – 66°C, 13 ng DNR; 4 – 66°C, 39 ng DNR; 5 – 68°C, 13 ng DNR; 6 – 68°C, 39 ng DNR. B) MM – molekulinis žymuo (O'GeneRuler DNA Ladder Mix); 1 – 70°C, 13 ng DNR; 2 – 70°C, 39 ng DNR; 3 – 72°C, 13 ng DNR; 4 – 72°C, 39 ng DNR; 5 – 74°C, 13 ng DNR; 6 – 74°C, 39 ng DNR. Rodykle pažymėtas tikslinis produktas ~3500 bp.

3.2 A ir B pav. elektroforezės geliuose matomi Q212P mutaciją koduojančios plazmidinės DNR juostelės. Transformacijai pasirinktas B3 produktas ir atlikti identiški veiksmai, kaip ir

su E219K mutaciją koduojančiu produktu. Išgrynintos plazmidinės DNR koncentracija 201,2 ng/ μ L.

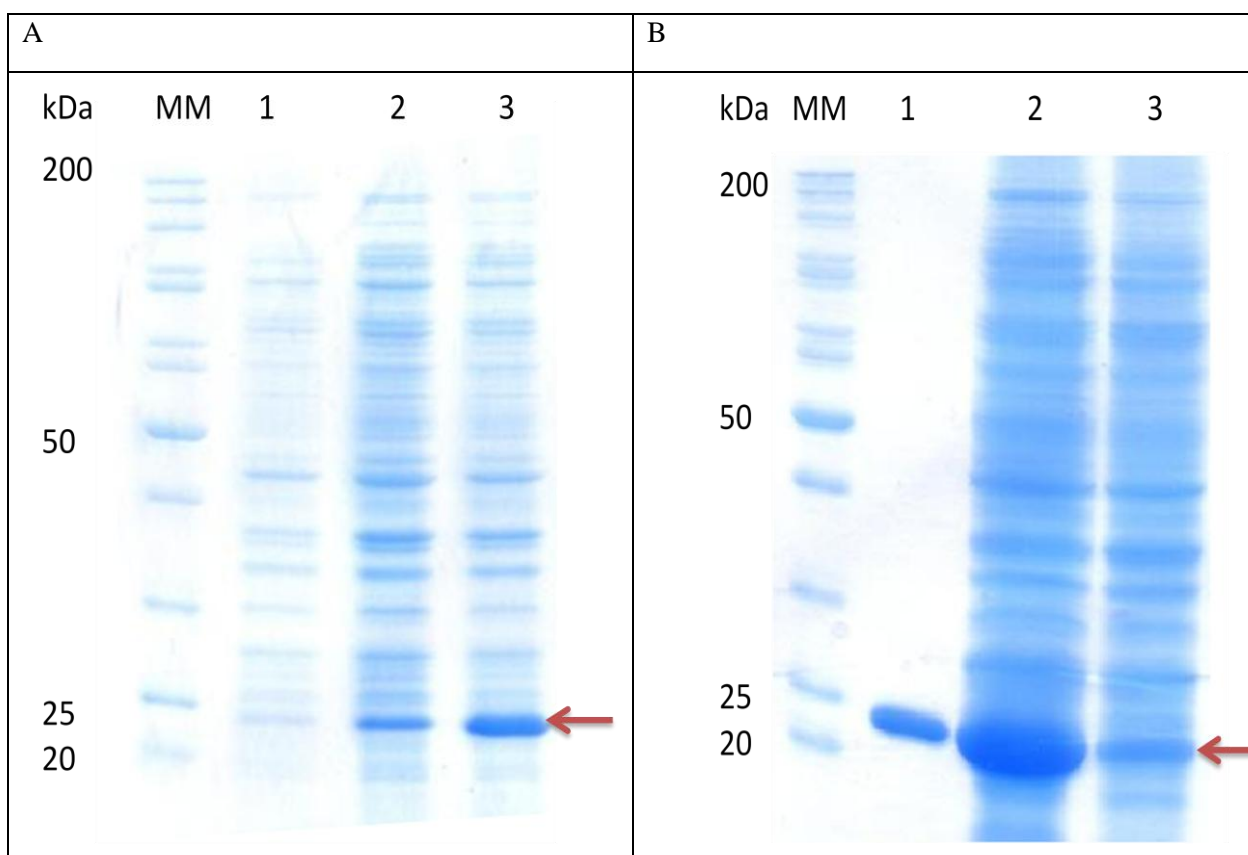


3.2 pav. HuPrP23-231 Q212P mutacijos įvedimas PGR metodu. PGR produktai frakcionuoti 1 proc. agaroziniame gelyje. A) MM - molekulinis žymuo (O'GeneRuler DNA Ladder Mix); 1 – 64°C, 13 ng DNR; 2 – 64°C, 39 ng DNR; 3 – 66°C, 13 ng DNR; 4 – 66°C, 39 ng DNR; 5 – 68°C, 13 ng DNR; 6 – 68°C, 39 ng DNR. B) MM - molekulinis žymuo (O'GeneRuler DNA Ladder Mix); 1 – 70°C, 13 ng DNR; 2 – 70°C, 39 ng DNR; 3 – 72°C, 13 ng DNR; 4 – 72°C, 39 ng DNR; 5 – 74°C, 13 ng DNR; 6 – 74°C, 39 ng DNR. Rodykle pažymėtas tikslinis produktas ~3500 bp.

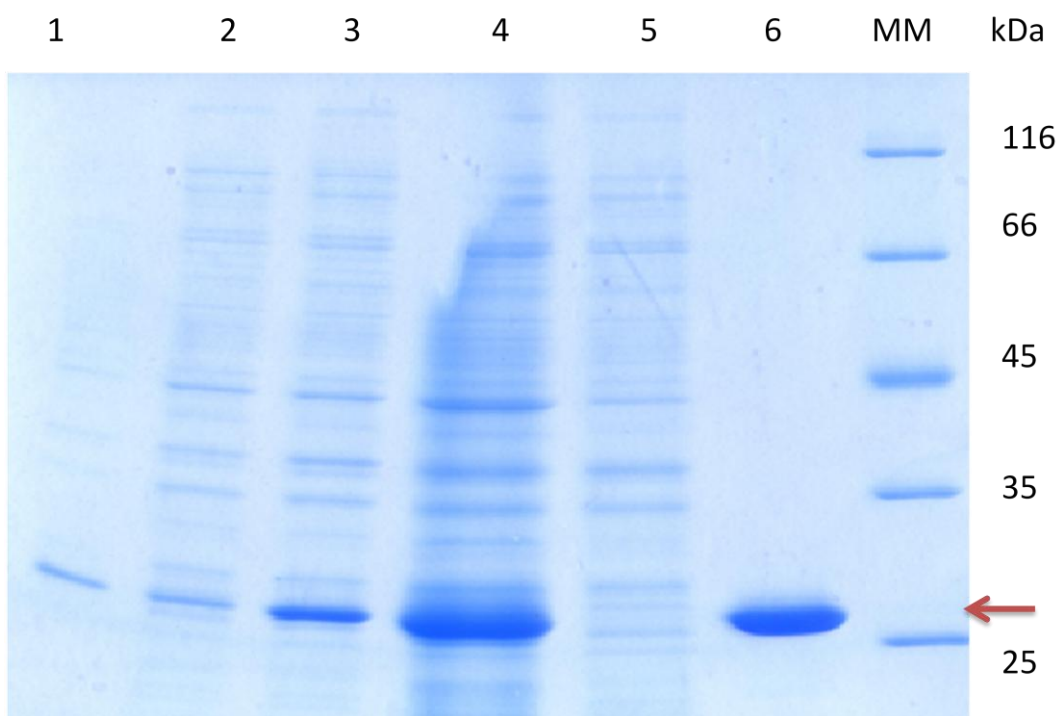
3.2 Sekoskaitos rezultatų analizė

Išgrynintos plazmidinės DNR, turinčios žmogaus prioninio baltymo genus su numanomomis E219K ir Q212P mutacijomis, buvo atiduotos į sekoskaitos centrą. Duomenys buvo analizuojami *NCBI Blast* sekų analizavimo įrankiu. E219K mutacijos atveju natyvaus prioninio baltymo geno sekoje tripletas GAG, koduojantis glutamo rūgštį, buvo pakeistas į AAA, kuris koduoja liziną (3.3 pav.). Q219P mutacijos atveju glutaminą koduojantis tripletas buvo pakeistas į CCG, kuris koduoja proliną baltymo peptidinėje grandinėje (3.4 pav.).

Remiantis 3.5 ir 3.6 pav. galima teigti, jog gautų mutantinių prioninių baltymų E219K ir Q212P raiška BL21 Star™(DE3) kamiene vyksta gerai, tačiau nėra aiškiai matomas indukcijos momentas. E212K mutantinį baltymą ekspresuojančių ląstelių biomasės buvo surinkta $12,05 \pm 0,01$ g, o Q212P baltymą ekspresuojančių ląstelių $15,40 \pm 0,01$ g. Suardžius ląsteles ultragarsu ir išanalizavus baltyminio ekstrakto mėginius prieš ir po sąveikos su sorbentu, aiškiai pastebima, jog sorbentas sorbavo didžiąją dalį tikslinio baltymo. Iš kolonėlės ištekėjusiame skystyje nebuvo tikslinio baltymo arba jo buvo labai mažai.



3.5 pav. E219K raiškos ir grynumo patikrinimas SDS-PAAG metodu, 12 proc. gelyje. A) MM – molekulinis žymuo (EZ-Run Rec Protein Ladder); 1 – mėginys po 2 val. auginimo; 2 – mėginys po 4 val. auginimo; 3 – mėginys po 8 val. auginimo. B) MM – molekulinis žymuo (EZ-Run Rec Protein Ladder); 1 – baltymo mėginys po dializės; 2 – mėginys atskyrus supernatantą nuo ląstelių nuolaužų; 3 – mėginys po supernatanto inkubacijos su sorbentu. Rodykle pažymėtas tikslinis baltymas ~25 kDa.

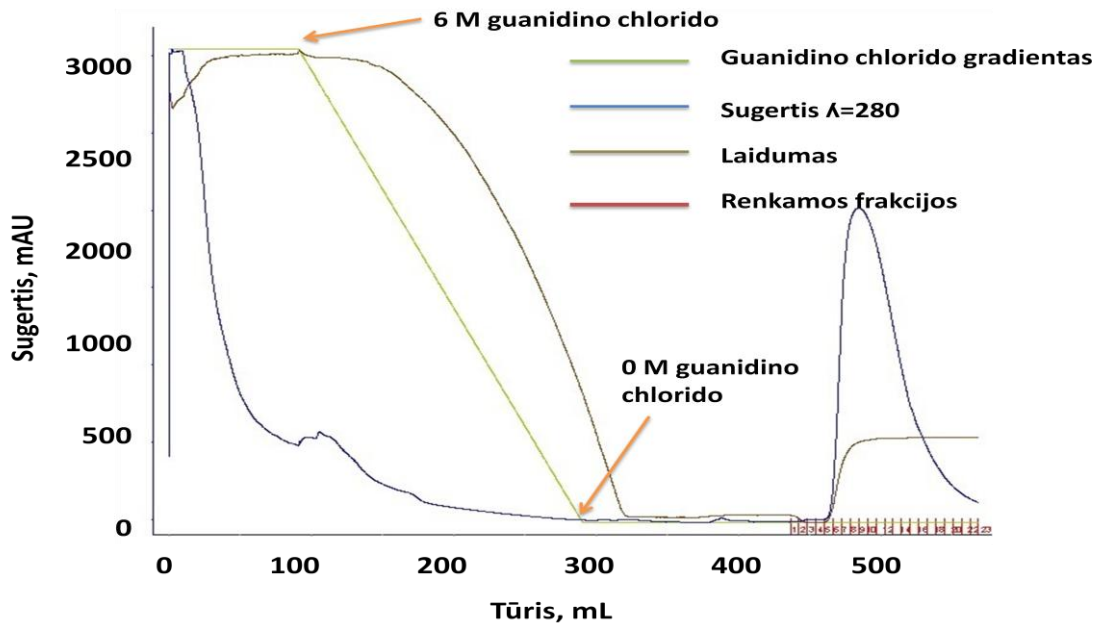


3.6 pav. Q212P raiškos ir grynumo patikrinimas SDS-PAAG metodu, 12 proc. gelyje. A) MM – molekulinis žymuo (Pierce™ Unstained protein MW Marker); 1 – mėginys po 2 val. auginimo; 2 – mėginys po 4 val. auginimo; 3 – mėginys po 8 val. auginimo; 4 – mėginys atskyrus supernatantą nuo ląstelių nuolaužų; 5 – mėginys po supernatanto inkubacijos su sorbentu; 6 – baltymo mėginys po dializės. Rodykle pažymėtas tikslinis baltymas ~25 kDa.

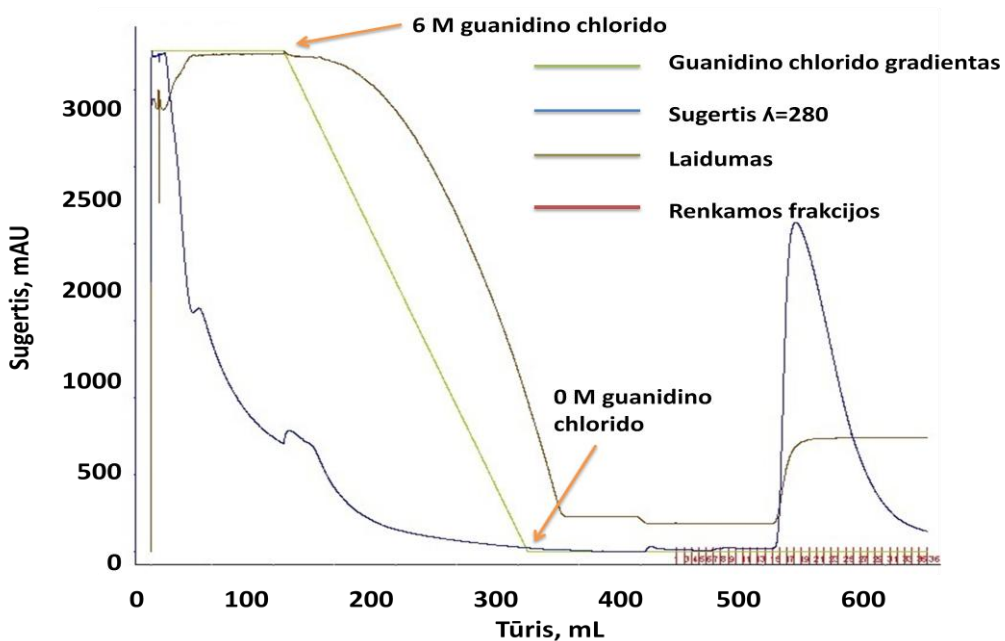
3.4 Rekombinantinių prioninių baltymų gryninimas

Šie rekombinantiniai baltymai sintetinami intarpiniais kūneliais, todėl gryninimui yra naudojamas stiprus denatūrantas guanidino chloridas. Dėl to pirmame gryninimo žingsnyje atliekama renatūracija, kurios metu yra palaipsniui mažinama guanidino chlorido koncentracija, o tik po to eliucija, naudojant imidazolo druskos buferį.

Q212P mutantinio baltymo gryninime (3.8 pav.), kitaip nei E219K baltymo gryninime, (3.7 pav.), buvo papildomai naudojamas 200 mM imidazolo druskos tirpalas, siekiant gauti grynesnį baltymą. Kaip matoma 3.8 pav. pirma nepageidaujamų priemaišų smailė buvo stebima esant 50 mM imidazolo buferiui (420 mL), taip pat nedidelis UV sugerties pakilimas buvo fiksuojamas ir padidinus koncentraciją iki 200 mM (480 mL), tačiau dėl stiprios histidinių sąveikos su sorbentu, esant šioms koncentracijoms, tikslinis baltymas neeliuoja. Eliucijai buvo naudojama 700 mM imidazolo druskos koncentracija, kuriai esant, maždaug po 20 mL buvo stebėtas UV sugerties kilimas tiek E219K, tiek Q212P mutantinių baltymų gryninime.



3.7 pav. HuPrP23-231 E219K baltymo renatūracija iš intarpinių kūnelių ir gryninimas giminingumo chromatografijos metodu naudojant 20 mL *Sepharose™ 6 Fast Flow* sorbentą ir XK 26 kolonėlę. Surinkta 14 frakcijų po 5 mL (70 mL).



3.8 pav. HuPrP23-231 Q212P baltymo renatūracija iš intarpinių kūnelių ir gryninimas giminingumo chromatografijos metodu naudojant 20 mL *Sepharose™ 6 Fast Flow* sorbentą ir XK 26 kolonėlę. Surinkta 19 frakcijų po 6 mL (114 mL).

Išgrynintų, dializuotų ir nufiltruotų baltymų koncentracija buvo nustatyta spktrofotometriškai. Gauti rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Mutantinių baltymų gryninimo rezultatai

Baltymas	Biomasė, g	Surinktas frakcijų tūris, mL	Konc, mg/mL	Baltymo kiekis, mg
HuPrP23-231 E219K	12,05 ± 0,01	70 ± 1	1,15 ± 0,03	80,50 ± 2,39
HuPrP23-231 Q212P	15,40 ± 0,01	114 ± 1	0,96 ± 0,03	109,44 ± 3,25

Išgrynintų baltymų mėginiai po koncentravimo buvo perduoti masių spektrometrijos analizei. Masių spektrometrijos analizės rezultatai pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Masių spektrometrinės analizės duomenys (atliko dr. Vytautas Smirnovas).

Baltymas	Teorinė molekulinė masė, Da	Praktiškai išmatuota masė, Da
HuPrP23-231E219K	25044	25042 ± 1
HuPrP23-231Q212P	25014	25012 ± 1

Baltymų praktinė molekulinė masė dėl susidariusio disulfidinio tiltelio gali skirtis nuo teorinės molekulinės masės per 2 Da. Remiantis masių spektrometrijos duomenimis, galima teigti, jog išgryninti mutantiniai baltymai atitinka teorinę molekulinę masę.

Išvados

1. Įvestos E212K ir Q212P mutacijos į HuPrP23-231 baltymą koduojantį geną.
2. Gauta HuPrP23-231 E219K ir HuPrP23-231 Q212P mutantinių baltymų raiška *E. coli* ląstelėse.
3. Giminingumo chromatografijos metodu gauta 81 mg HuPrP23-231 E219K ir 109 mg HuPrP23-23 Q212P.



Parašas

Algirdas Šerėnas

(Vardas ir pavardė)

Naudota literatūra

1. Acevedo-morantes, C. Y., Wille, H. (2014). The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models — Considerations and Pitfalls. *Viruses*, 6, 3875–3892.
2. Aguzzi, A., Calella, A. M. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiological Reviews*, 89, 1105–1152.
3. Biljan, I., Giachin, G., Ilc, G., Zhukov, I., Plavec, J., Legname, G. (2012). Structural basis for the protective effect of the human prion protein carrying the dominant-negative E219K polymorphism. *Biochemical Journal*, 446, 243–251.
4. Brown, K., Mastrianni, J. a. (2010). The prion diseases. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 23, 277–298.
5. Cappai, R., Collins, S. J. (2004). Structural biology of prions. *Contributions to Microbiology*, 11, 14–32.
6. Cheang, M. C. U., van de Rijn, M., Nielsen, T. O. (2008). Gene expression profiling of breast cancer. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*, 3, 67–97.
7. Chesebro, B. (2003). Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br. Med. Bull.*, 66, 1–20.
8. Colby, D. W., Prusiner, S. B. (2011). Prions. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*, 3, 1–23.
9. Collinge, J., Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, 318, 930–936.
10. Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: Classification and characterisation. *British Medical Bulletin*, 66, 213–239.
11. Hizume, M., Kobayashi, A., Teruya, K., Ohashi, H., Ironside, J. W., Mohri, S., Kitamoto, T. (2009). Human prion protein (PrP) 219K is converted to PrPSc but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jakob disease infection. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 3603–3609.
12. Horiuchi, M., Caughey, B. (1999). Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure*, 7, R231–R240.

13. Ilc, G., Biljan, I., Giachin, G., Legname, G., Plavec, J. (2013). NMR Structural Studies of Human Cellular Prion Proteins. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(19), 2407–2418 (12).
14. Ilc, G., Giachin, G., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Benetti, F., Plavec, J., ... Legname, G. (2010). NMR structure of the human prion protein with the pathological Q212P mutation reveals unique structural features. *PLoS ONE*, 5(7), 1–11.
15. Imran, M., Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virology Journal*, 8, 559.
16. Jahandideh, S., Jamalana, M., Faridounnia, M. (2014). Molecular dynamics study of the dominant-negative E219K polymorphism in human prion protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–11.
17. Kalikiri, P. C., Sachan, R. G. (2003). Prions – Proteinaceous Infectious Particles. *Clinical Medicine*, 4(4), 334–337.
18. Kobayashi, A., Hizume, M., Teruya, K., Mohri, S., Kitamoto, T. (2009). Heterozygous inhibition in prion infection: the stone fence model. *Prion*, 3, 27–30.
19. Laurent, M. (1996). Prion diseases and the “protein only” hypothesis: a theoretical dynamic study. *The Biochemical Journal*, 318 (Pt 1, 35–39.
20. Morales, R., Abid, K., Soto, C. (2007). The prion strain phenomenon: Molecular basis and unprecedented features. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772, 681–691.
21. Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 13363–13383.
22. Shibuya, S., Higuchi, J., Shin, R. W., Tateishi, J., Kitamoto, T. (1998). Codon 219 Lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of Neurology*, 43, 826–828.
23. Smirnovas, V., Baron, G. S., Offerdahl, D. K., Raymond, G. J., Caughey, B., Surewicz, W. K. (2011). Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(4), 504–506.
24. Westergard, L., Christensen, H. M., Harris, D. a. (2007). The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772(6), 629–644.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju baigiamojo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui, Tomui Šneideriui ir Dariui Šulskiui už suteiktas žinias ir pagalbą baigiamojo bakalaurinio darbo metu.