



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Valdemaras Petrošius

**REKOMBINANTINIO TAU BALTYMO (1N4R IZOFORMOS)
GAMYBA IR JO AGREGACIJOS TYRIMAS**

**PRODUCTION OF RECOMBINANT TAU PROTEIN (1N4R
ISOFORM) AND STUDIES OF IT'S AGGREGATION**

Baigiamasis bakalaurinis darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, Pavardė)

(Data)

Valdemaras Petrošius

**REKOMBINANTINIO TAU BALTŲMO (1N4R IZOFORMOS)
GAMYBA IR JO AGREGACIJOS TYRIMAS**

**PRODUCTION OF RECOMBINANT TAU PROTEIN (1N4R
ISOFORM) AND STUDIES OF IT'S AGGREGATION**

Baigiamasis bakalaurinis darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovas Dr. Vytautas Smirnovas

(Parašas)

(Data)

Konsultantas Ričardas Mališauskas

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2015

Turinys

Santrumpų sąrašas

AA	Akrilamidas
AD	Alzheimerio liga
APS	Amonio persulfatas
BAA	Bis-akrilamidas
BMR	Branduolių magnetinis rezonansas
DTT	Ditioteritolis
EDTA	Etilenodiaminotetraacetatinė rūgštis
FRET	Fluorescencinis rezonansinis energijos perdavimas
FTDP-17	Frontotemporalinė demencija ir parkinsonizmas susiję su 17 chromosoma
FTIR	Frujė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-yl]etanosulfoninė rūgštis
MES	2-N-morfolinoetanosulfoninė rūgštis
mRNR	Matricinė ribonukleino rūgštis
NaDS	Natrio dodesilsulfatas
NaDS-PAAG	Natrio dodesilsulfato poliakrilamidinis gelis
NMDA	N-metil-D-asparto rūgštis
PLC	Fosfolipazė C
PMSF	Fenilmetansulfonil fluoridas
RFU	Santykiniai fluorescencijos vienetai
TEMED	Tetrametiletilendiaminas
ThT	Tioflavinas T
TRIS	2-Amino-2-hidroksimetil-propano-1,3-diolis

Įvadas

Neurodegeneraciniai sutrikimai yra grupė ligų, kurias charakterizuoja progresyvus neuronų nykimas ar jų struktūriniai pokyčiai. Tai tokios ligos kaip: Alzheimerio, Parkinsono ir kortikobasalinė degeneracija. Nors apie neurodegeneracinius sutrikimus žinoma, jau daugiau nei 100 metų, jų patologija lieka iki galo neišaiškinta. Neturint tokios esminės informacijos kurti vaistus, kurie sustabdytų ligos plitimą ar ją išgydytų, yra lengvai tariant, sudėtinga.

Dažniausias ir geriausiai ištirtas neurodegeneracinis sutrikimas yra Alzheimerio liga(?). Šia liga sergančių žmonių smegenyse aptinkamos dvi morfologiškai skirtingų filamentų san-kaupos: senatvinės plokštelės, sudarytos iš amiloido β , ir neurofibriliniai raizginiai, sudaryti iš Tau baltymo. Vėliau buvo pastebėta, kad Tau baltymas dalyvauja ne vien AD, bet ir apie 20 kitų neurodegeneracinių sutrikimų patologijoje.

Tau yra citozolinis baltymas skatinantis mikrovamzdelių polimerizaciją iš tubulino ir stabilizuojantis šias dinamines struktūras. Dėl mutacijų ir modifikacijų šis baltymas praranda savo natyvią ir įgauna toksiinę funkciją. Toks pakitęs baltymas agreguoja ir sudaro filamentus, kurie gali turėti įvairią morfologiją. Tačiau Tau baltymo agregacijos procesas nėra pilnai suprantamas, todėl pasaulyje atliekami įvairūs *in vitro* ir *in vivo* tyrimai, kuriais bandoma jį atskleisti. Pilnas ar bent aiškesnis mechanizmo suvokimas palengvintų vaistų nuo neurodegeneracinių sutrikimų paiešką.

Tokiems tyrimams reikalingi dideli baltymo kiekiai, kuriuos pirkti yra labai brangu, todėl baltymai gryninami laboratorijoje.

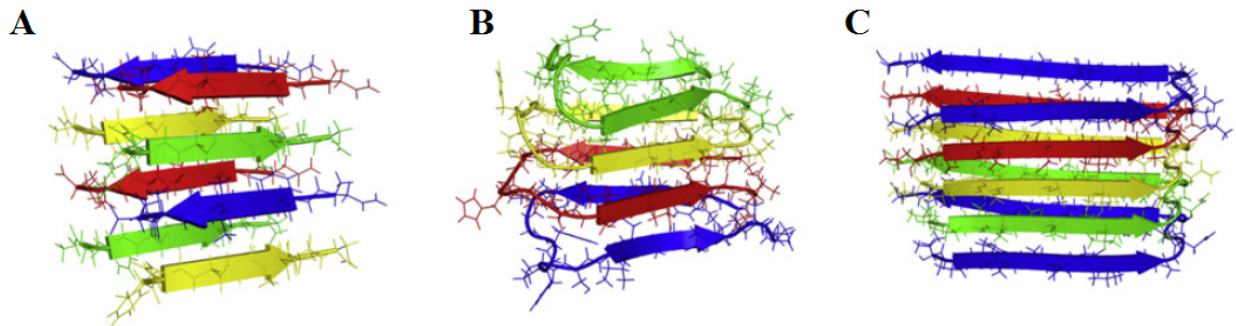
Taigi mano bakalaурinio darbo tikslas išgryninti rekombinantinio Tau baltymo izoformą 1N4R ir tirti jo agregaciją. Tikslui pasiekti išskelti tokie uždaviniai:

1. Pasigaminti rekombinantinio Tau baltymo (1N4R, izoforma).
2. Tirti Tau baltymo agregaciją esant įvairioms sąlygoms naudojant hepariną kaip agregacijos induktorių.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Amiloidiniai baltymai

Dėl netirpių baltyminių filamentinių sankauptų, kurios charakterizuojamos kaip amiloidinės fibrilės atsiranda daug įvairių ligų. Visos fibrilės turi bendrą bruožą, t.y. turi didelį kiekį β -klosčių, kurios išsidėsto statmenai fibrilės ašiai (?) (?? pav.). Taip pat pasižymi ypač dideliu atsparumu detergentų, temperatūros, bei organinių tirpiklių poveikiui, todėl sunkiai degraduojamos ląstelėse.



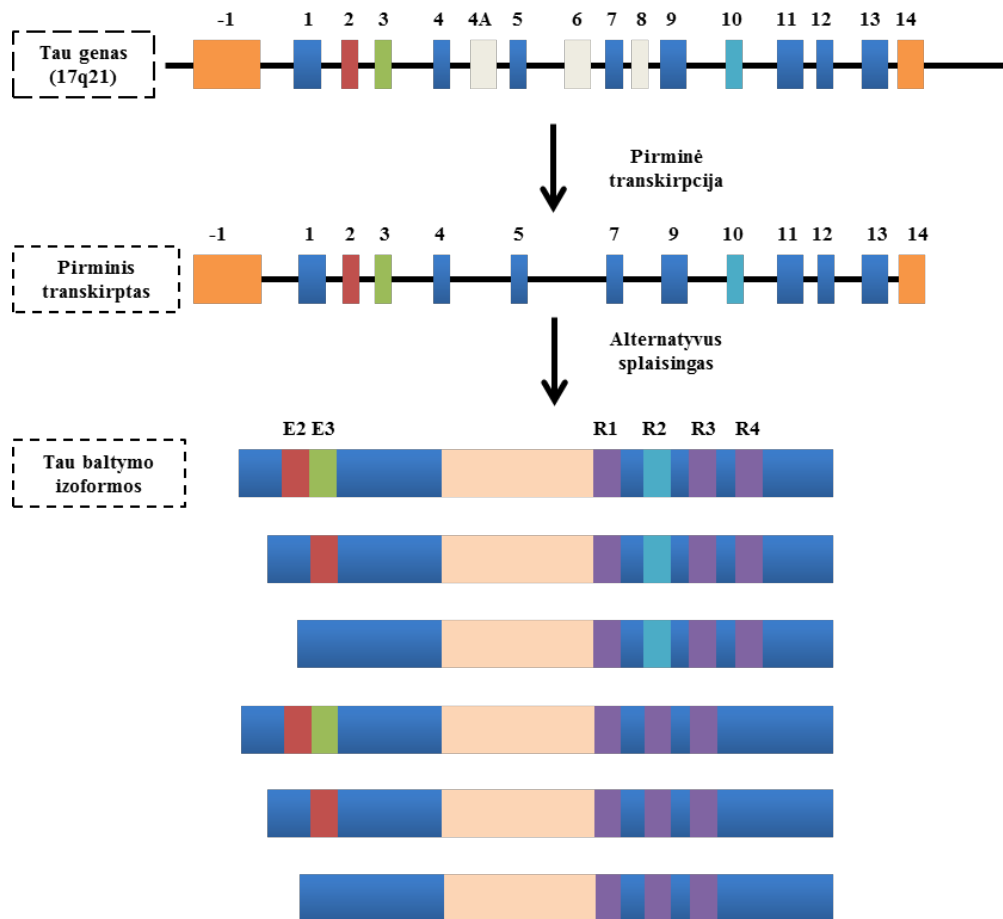
1 pav. Amiloidinių fibrilių struktūra. A–NFGAIL peptidas iš žmogaus amilino, B–iš β 2 mikroglubulino K3 peptidas, C–amiloidas β 1-40 (?).

Tam, kad baltymas galėtų pereiti į savo amiloidinę būseną, jis turi pereiti konformacinius pokyčius, kurių metu atidengiamos tam tikros baltymo sritys. Globulinio baltymo atveju, jam reikia bent dalinai išsivynioti prieš įvykstant agregacijai. Tačiau daugiau nei 30 procentų eukariotinių baltymų neturi specifinės globulinės struktūros (?), todėl energetinis barjeras skiriantis natyvę ir agregatuotą formą yra mažesnis. Tokie baltymai, kad apsisaugotų nuo agregacijos, turi mažai hidrofobinių, bet daug prolino liekanų, didelį krūvį ir mažą skaičių agregaciją skatinančių regionų. Nepaisant šių apsauginių mechanizmų tokie baltymai yra labiau linkę agreguoti nei globuliniai. Todėl, nenuostabu, kad daugelis baltymų susijusių su amiloidozėmis yra bestruktūriai. Tai tokie baltymai kaip: amiloidas β , α -sinukleinas, kalcitoinas ir Tau.

1.2. Tau baltymo struktūra ir domenai

Tau yra neuroninis su mikrovamzdeliais sąveikaujantis baltymas. Jis skatina tubulino polimerizaciją ir stabilizuoja neuronuose esantį mikrovamzdelių tinklą. Baltymas lokalizuotas aksone bei daug mažesnėmis koncentracijomis somoje. Tau koduojantis genas yra 17 chromosomoje ir turi 16 egzonų (?). Dėl alternatyvaus mRNR splaisingo neuronuose ekspresuojamos 6 šio baltymo izoformos (?? pav.). Izoformos žmogaus smegenyse yra skirtingai pasiskirsčiusios neuronų subpopuliacijose (?).

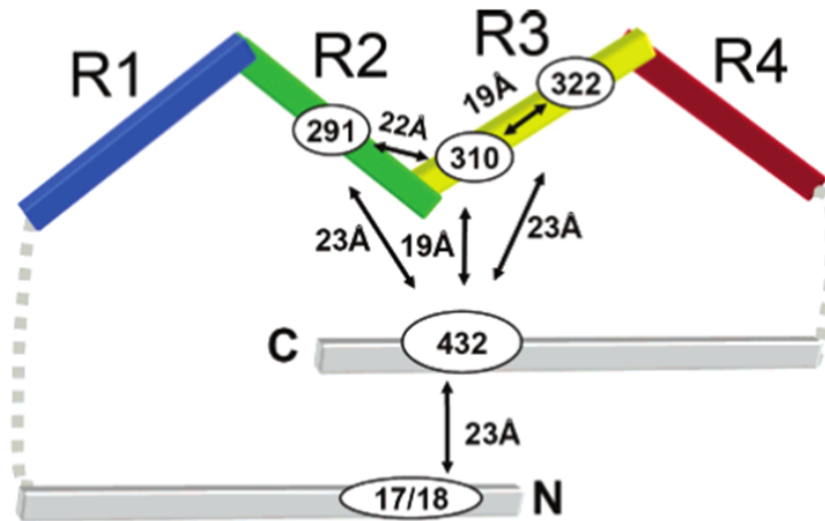
Tau baltymą sudaro du domenai: N gale yra projekcinis domenai, kuris gali sąveikauti su plazmine membrana ir kitomis citoskeleto struktūromis, o C galas sąveikauja su mikrovamzdeliais t.y. skatina tubulino polimerizaciją į mikrovamzdelius ir slopina depolimerizaciją



2 pav. Schematinė Tau baltymą koduojančio geno iliustracija. Tau genas yra maždaug 100 kbp ilgio ir turi 16 egzonų, iš kurių -1 yra promotoriaus dalis. 1,4,5,6,9,11,12,13 egzonai yra konstitutyvūs, o 2,3 ir 10 gali būti pašalinti splaisingo metu, taip sudarant transkriptus koduojančius 6 skirtingas izoformas. Jų ilgis gali varijuoti nuo 352 iki 441 aminorūgštis.

(?). Šiuos domenus dar galima išskirstyti į regionus t.y. projekcinį domeną į N-terminalinį ir prolinų turtingą, o su mikrotubulinu sąveikaujantį į mikrovamzdelius prisijungiantį ir C-terminalinį regionus. Su mikrovamzdeliais sąveikaujančiame regione yra heksapeptidai PHF6 (VQIVYK) ir PHF6* (VQIINK), kurie yra kritiniai fibrilių susidarymui (?).

Rentgeno spindulių difrakcijos, žiedinio dichroizmo spektroskopijos ir FTIR metodais nepavyko aptikti jokios antrinės struktūros, todėl baltymas buvo priskirtas natyviai bestruktūriams. Tačiau gali būti kažkokio globulinio susilankstymo dėl sąveikos tarp Tau regionų. Būtent tai parodė Jeganathan ir kolegų atlikta FRET analizė, kad Tau gali turėti kažkokią į sąvarželę panašią globulinę struktūrą (?? pav.) (?).



3 pav. Molekulinės sąveikos modelis. Su mikrovamzdelius prisijungiantys regionai pažymėti skirtingomis spalvomis (raudona, geltona, žalia, mėlyna), o šalia esančios C- ir N- galinės sekos pilka spalva. Langeluose sužymėtos vietos, kuriose yra specifinės žymės reikalingos FRET analizei. Adaptuota iš (?).

Detalesni duomenys apie Tau antrinę struktūrą buvo gauti panaudojus BMR. Parodytos trys antrinės struktūros: β -klostės, poliprolino spirалės, ir α -spirалės, tačiau šios struktūros yra trumpalaikės (?). β -klostės aptiktos R2 ir R3 pasikartojimuose egzistuoja 22-25% laiko (?). Iš to suprantama, kad Tau nėra visiškai bestruktūris baltymas, o egzistuoja kaip konformerų mišinys. Paprastai tokie žymios struktūros neturintys baltymai pasižymi žemu hidrofobiškumu ir dideliu krūviu, esant fiziologiniam pH (?), tačiau Tau krūvis esant fiziologiniam pH yra tik 2+ (?).

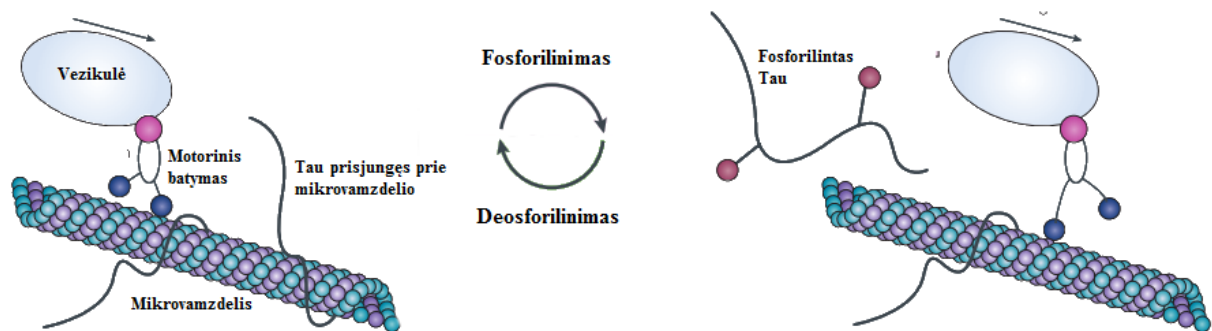
1.3. Tau baltymo funkcija

Viena geriausiai žinomų Tau funkcijų yra tubulino polimerizavimas į mikrovamzdelius ir jų stabilizavimas. Tau gali prisirišti mikrovamzdelius dėl savo turimų pasikartojančių regionų. Pastebėta, kad 4R Tau baltymo izoformas pasižymi 40 kartų didesniu afiniškumu mikrovamzdeliams nei 3R. Toks skirtumas atsiranda dėl peptido 274 KVQIINKK₂₈₁. Esančio tarp R1 ir R2 sekų (?). Tam, kad susidarytų mikrovamzdeliai, iš tubulino turi susiformuoti nukleacijos centrai. Tau baltymas būtent skatina šių centrų susidarymą. Prie mikrovamzdelių gali jungtis dviem būdais: kai vyksta, jau esančių mikrovamzdelių elongacija, jis jungiasi prie struktūros paviršiaus, tačiau jeigu Tau sąveikauja tik su tubuliniu jis inkorporuojamas į mikrovamzdelius kaip vidinė struktūra (?). Per savo su mikrovamzdeliais sąveikaujančius regionus Tau baltymas gali sąveikauti su spektrino ir aktino filamentais, dėl to mikrovamzdelius gali sujungti su kitomis neurone esančiomis citoskeleto struktūromis (?).

Projekcinio domeno funkcija kol kas nėra iki galo išaiškinta. Ši baltymo dalis būna „atsikišusi“ nuo mikrovamzdelio į išorę, kad galėtų sąveikauti su kitomis ląstelės struktūromis. Nuo N-terminalinio regiono ilgio priklauso tarpų dydis tarp mikrovamzdelių, tai gali įta-

koti aksono diametrą, kas yra ypač svarbu periferiniams neuronams. Šis regionas taip pat gali sąveikauti su viduląstelinėmis membranomis, kaip mitochondrijų ir neuronų plazminė membrana (?).

Kinezinas ir dineinas yra motoriniai baltymai, kurie transportuoja medžiagas per mikrovamzdelius į priešingas puses. Ląstelėje šie baltymai konkuruoja su Tau dėl prisijungimo prie mikrovamzdelių paviršiaus (?). Dėl sąveikos su Tau dineinas pakeičia savo judėjimo kryptį, kai tuo tarpu kinezinas disocijuoja nuo mikrovamzdelio (?) (?? pav.). Aksone didžiausia Tau baltymo koncentracija yra prie sinapsės, todėl manoma, kad tokia sąveika padidina aksoninio transporto efektyvumą (?).



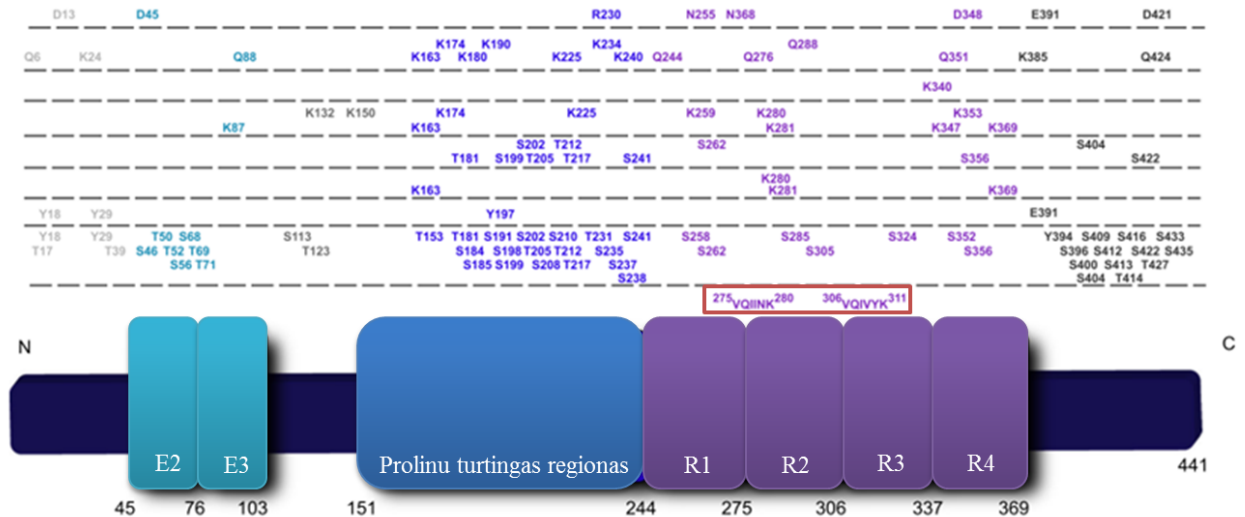
4 pav. Tau baltymo ir motorinio baltymo sąveika ant mikrovamzdelio paviršiaus. Tau baltymas yra fosforilinamas, todėl disocijuoja nuo mikrovamzdelio ir motorinis baltymas gali toliau transportuoti savo krovinį.

Fosfolipazė C- γ gausiausiai ekspresuojamas PLC šeimos izofermentas žmogaus smegenyse (?). Jis hidrolizuoja fosfatidilinozitolio 4,5-bifosfatą į dvi signalines molekules: diacilglicerolį, kuris aktyvuoja baltymų kinazę C ir inozitolio trifosfatą, kuris didina viduląstelinę Ca^{2+} koncentraciją. Izofermentas aktyvuojamas fosforilinimu, tačiau Hwang ir kolegos parodė, kad Tau baltymas gali sąveikauti SH3 PLC- γ domenu ir jį aktyvuoti esant nesočių riebalų rūgščių, tokių kaip arachidoninė rūgštis, be fosforilinimo pagalbos (?). Taip pat, Tau gali sąveikauti su nereceptorine tirozino kinaze, kaip fyn (?). Buvo parodyta, kad fyn sąveika su tau baltymu dalyvauja NMDA signalo reguliavime (?). Manoma, kad patloginė Tau forma transportuoja fyn prie postsinapsinės membranos, kur ji fosforilina NMDA receptorių ir taip sukelia eksitotoksiškumą (?). Tau baltymas gali sąveikauti ir su kitomis nereceptorinėmis tirozino kinazėmis, kaip Src ir Lck.

1.4. Tau baltymo modifikacijos

Neurodegeneraciniai sutrikimai, kurių patologijoje dalyvauja tau baltymas vadinami tau-patijomis. Tai tokios ligos kaip frontotemporalinė degeneracija, Piko liga, progresyvus supranuklearinis paralyžius, kortikobasalinė degeneracija, amiotrofinė lateralinė sklerozė, parkinsono liga, Alzheimerio liga ir daugelis kitų. Vienas pagrindinių patologiinių šių ligų požymių yra netirpių fibrilių iš Tau baltymo susidarymas. Nors Tau turi daug įkrautų ir hidrofilinių

aminorūgščių ir turėtų būti atsparus agregacijai, jis gali sudaryti netirpius filamentus. Su-
prantama, kad tam reikalingi konformaciniai pokyčiai, kuriuos sukelia įvairios potransliaci-
nės modifikacijos ar mutacijos. Tai fosforilinimas, fermentinis ir nefermentinis glikozilinimas,
ubikvitilinimas, nitrinimas, oksidacija, acetilinimas ir proteolitinis karpymas (?) (?? pav.).



5 pav. Tau baltymo modifikacijų iliustracija. Atitinkamai iš viršau į apačia pažymėtos vietos: karpymo, poliaminimo, SUMO'ilinimo, nefermentinio glikozilinimo, glikozilinimo, acetilinimo, nitrinimo, fosforilinimo. Raudonai apibrėžti labiau agreguoti linkusių heksapeptidų vietos. Adaptuota iš (?)

Fosforilinimas yra geriausiai ištirta ir daugiausiai tyrinėjama modifikacija ir daugelis tyrimų parodė, kad tai vienas pirmųjų žingsnių link filamentų susidarymo (?). *In vivo* fosforiliniu reguliuojamas baltymo biologinis aktyvumas. Ilgiausia Tau baltymo izoforma turi 80 serino ir treonino liekanų, kurios gali būti fosforilintos. Tam tikras fosforilinimo laipsnis reikalingas optimaliai funkcijai užtikrinti t.y. fosforilinant baltymą keičiasi jo afiniškumas mikrovamzdeliams. Tačiau hiperfosforilintas jis praranda savo biologinį aktyvumą (?). Tokia baltymo forma ne vien pati praranda savo funkciją, bet inhibuoja tinkamai fosforilinto Tau ir kitų su mikrovamzdeliais sąveikaujančių baltymų veiklą (?). Todėl sutrinka mikrovamzdelių dinamika ir viduląstelinis transportas.

Paprastai smegenyse būna apie 2-3 molių fosfato liekanų, kiekvienam moliui baltymo, tačiau sergant AD baltymas fosforilinamas 3 kartus daugiau (?). Ši modifikacija sukelia konformacinius pokyčius, dėl kurių baltymas pradeda agreguoti į netirpius filamentus. Tačiau defosforilinus baltymą, jis gali disocijuoti nuo fibrilių ir atgauti savo biologinę funkciją. Nustatyta, kad AD atveju pagrindinės Tau baltymo fosfatazės PP-2A aktyvumas yra sumažėjęs, o kinazių kaip GSK-3, padidėjęs. Manoma, kad hiperfosforilinta forma gali atsirasti dėl reguliacinių fosfatazių ir kinazių sutrikimų (?).

Glikozilinimas yra viena dažniausių potransliacinių modifikacijų, kuri skirstoma į dvi rūšis: O-glikozilinimas ir N-glikozilinimas. Paprastai N-glikozilinami membraniniai ir sekretiniai baltymai. Modifikacija vyksta endoplazminiame tinkle ir glodžio komplekse. Alz-

heimerio liga sergančių žmonių smegenyse Tau baltymas yra pagrįdė N-glikozilintas (?), todėl lieka neaišku, kaip Tau būdamas citoplazminis baltymas yra N-glikozilinamas. *In vitro* tyrimai parodė, kad N-glikozilinta Tau baltymo forma yra greičiau fosforilinama ir lėčiau defosforilinama (?). Priešingą funkciją atlieka O-glikozilinimas – inhibuoja baltymo fosforilinimą užimdamas vietas skirtas fosfato grupei, bei steriškai strukdo kinazėms. N-glikozilinta Tau forma, kuri dar nėra hiperfosforilinta aptinkama Alzheimerio liga sergančių žmonių smegenyse, todėl manoma, kad glikozilinimas įvyksta prieš hiperfosforilinimą (?).

Nefermentinis glikozilinimas – tai ne fermentinis sacharidų prijungimas prie polipeptido a.r. liekanų. Ši modifikacija aptinkama tik agreguotoje Tau formoje. Nustatyta, kad nefermentinis glikozilinimas sumažina kritinę koncentraciją reikalingą agregatų susidarymui ir juos stabilizuoja (?), bet pačios agregacijos nesukelia. Todėl manoma, kad tai yra viena vėlesnių modifikacijų.

Skirtingai nei natyvi Tau forma, patologinė yra poliubikvitilinta. Ubikvitinas tai yra 76 kDa baltymas, kuris atlieka reguliacinę funkciją proteosominei degradacijai. Natyvus Tau gali būti degraduotas 20S proteosomos be poreikio ubikvitilinimui (?). Tačiau suagregavęs hiperfosforilintas baltymas tampa atsparus proteosominei degradacijai. Netgi manoma, kad priešfibriliniai agregatai gali atsirasti būtent dėl kažkokių sutrikimų šaperoniniame/proteosominiame ar autofaginiame/lizosominiuose mechanizmuose (?). Nors baltymo negali pilnai degraduoti, jis gali būti apkarpytas. Deja, lieka neaiški konkreti apkarpyto rolė patologijoje, tik nustatyta, kad kaspazių ar kitų proteazių apkarpytas baltymas gali greičiau agreguoti (?).

Tyrimai parodė, kad proteosominė degradacija gali būti inhibuojama užkirtus kelią ubikvitilinimui acetilinant lizino liekanas (?). Acetilinimas inhibuoja Tau funkciją ir skatina fibrilizaciją (?), bei inhibuoja fosforilinto Tau proteosominę degradaciją (?). Nors galimų modifikacijos vietų yra apie 23, masių spektrometrija nustatyta, kad svarbiausia yra K280 (?). Fibrilinės Tau baltymo formos šios amino rūgšties liekana yra acetilinta. *In vitro* tyrimai parodė, kad susidarius fibrilėms K280 nebeacetilinama (?), vadinasi, modifikacija įvyksta prieš fibrilių susiformavimą.

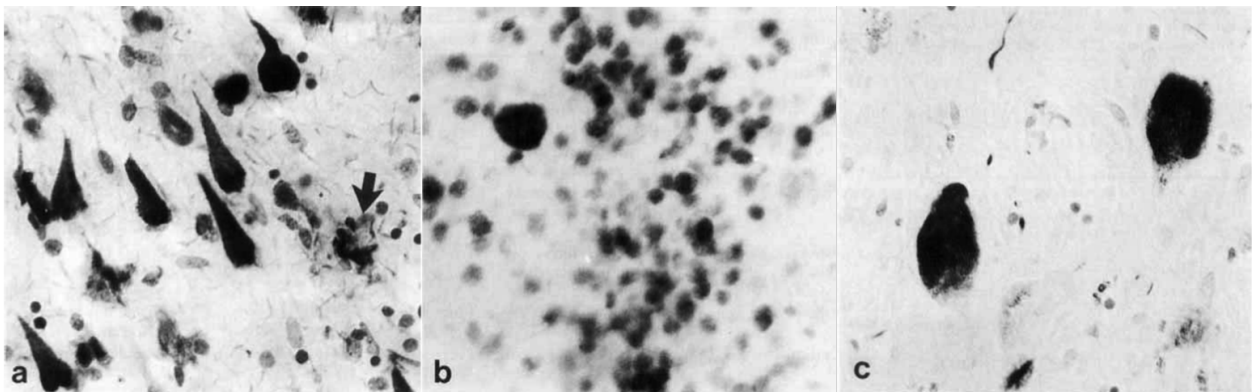
Oksidacinio streso metu susidaro peroksinitritas. Šis junginys gali nitrinti Tau baltymą 4 vietose. Buvo parodyta, kad paveikus baltymą peroksinitritu *in vivo* jis prarado savo funkciją ir pradėjo agreguoti (?). Nors ši modifikacija siejasi su uždegiminiu procesu ir patogeneze neurodegeneracinėse ligose, manoma, kad tam tikras nitrinimo lygis yra reikalingas tinkamai biologinei baltymo funkcijai užtikrinti. Tokia hipotezė iškelta pastebėjus, kad iš sveikų žmonių smegenų išskirtas Tau baltymas nitrifikuotas Y197 vietoje, tai reiškia, kad tam tikras šios modifikacijos kiekis gali būti nepatologiškas (?).

Be paminėtųjų modifikacijų, Tau gali būti izomerizuojamas, „susiuvamas glutaminu“, bei SUMO'ilinamas. Taip pat Tau baltymas gali agreguoti dėl mutacijų jį koduojančiame gene, kurios sukelia FDTP-17. Deja, šios modifikacijos šiame bakalauriniame darbe nebus aptartos.

1.5. Tau baltymo agregacija

In vivo Tau baltymo fibrilizacijos mechanizmas turi mažiausiai du pagrindinius žingsnius. Pirma, Tau baltymo funkcijos slopinimas potransliacinėmis modifikacijomis, priverčiantis jį disocijuoti nuo mikrovazmdelių, taip padidinant galinčio agreguoti baltymo koncentraciją. Tokia, savo funkciją praradusi forma gali sudaryti multimerinius Tau agregatus, vadinamus oligomerais arba priešfibrilniais agregatais, kurių negalima detektuoti β -klostėms specifiniais dažais (?), todėl manoma, kad jie dar neturi struktūros būdingos subrendusioms fibrilėms. Antra, priešfibriliniai agregatai įgauna β -klostių struktūras ir sudaro protofilamentus, kurie vėliau virsta subrendusiais filamentais. Visi šie etapai yra skatinami ar stabilizuojami tam tikrų potransliacinių modifikacijų.

Išskiriamos trys pagrindinės klasės protofilamentų: spiraliniai filamentai (PHF), tiesūs filamentai (SF), bei susukti kaspiniai (TR). Įvairiose ligose skiriasi šių protofilamentų sūkių periodiškumai, ilgiai ir pločiai. Šios protofibrilės gali sudaryti skirtingos morfologijos subrendusius filamentus, kurie aptinkami fenotipiškai skirtingose ligose (?? pav.). Alzheimerio atveju aptinkami filamentai, kuriuos galima suskirstyti į tris grupes: neurofibrilinius raizginius, neuropilinius filamentus ir neurotines plošteles (?), kurios sudarytos iš tiesių ir spiralinių filamentų. Tie patys protofilamentai gali sudaryti visiškai kitokios morfologijos filamentus vadinami piko kūneliais, Piko ligos atveju (?). O progresyvaus supranuklearinio paralyžiaus atveju filamentai būna globulinių raizginių pavidalo (?). Manoma, kad tokie skirtumai atsiranda dėl skirtingų izoformų įeinančių į filamentų sudėtį, tačiau tai yra ne labai tikėtina, nes publikuoti du darbai, kuriuose gautos visos trys protofibrilių klasės iš vienos izoformos (?) (?). Daug labiau tikėtina, kad tokia morfologinė įvairovė atsiranda dėl skirtingų kamienų, kuriuos gali sudaryti Tau baltymas (?).



6 pav. Netirpūs filamentai išskirti skirtingų taupatijų atveju. a) Alzheimerio ligos neurofibriliniai raizginiai, b) Piko ligos piko kūneliai, c) kortikobasalinės degeneracijos globuliniai raizginiai. Adaptuota iš (?).

Turbūt geriausiai ištirta protofibrilių klasė yra spiraliniai filamentai. Juos galima suskirstyti į dvi dalis: branduolį, kurį sudaro su mikrovazmdeliais sąveikaujantis regionas ir pūkuotą apvaskalą, kurį sudaro likusi baltymo dalis (?). Struktūra už branduolio ribų esančių sričių kol kas lieka neaiški, tik manoma, kad tai kažkas panašaus į „šepetį“ (?). Filamento branduolio struktūriniai tyrimai buvo sėkmingesni. Šiuo metu žinoma, kad branduolyje

esančios aminorūgštys yra susilanksčiusios į amiloidams būdingą β -klosčių struktūrą. Daebel ir kolegos pademonstravo, kad branduolį 3R izoformų atveju sudaro trys β -juostos, kurios sujungtos trumpais trūkiais (?). Tačiau aiški struktūra 4R izoformų atveju lieka nežinoma. Bet TANGO algoritmu, nustatytos dvi sekos, labiausiai linkusios formuoti β -juostas, t.y. PHF6 ir PHF6*. Li ir Lee, atliko agregacijos eksperimentus su deleciniais mutantais ir parodė, kad nors abu heksapeptidai turi įtakos Tau filamentų susiformavimui, tik PHF6 yra kritinis (?).

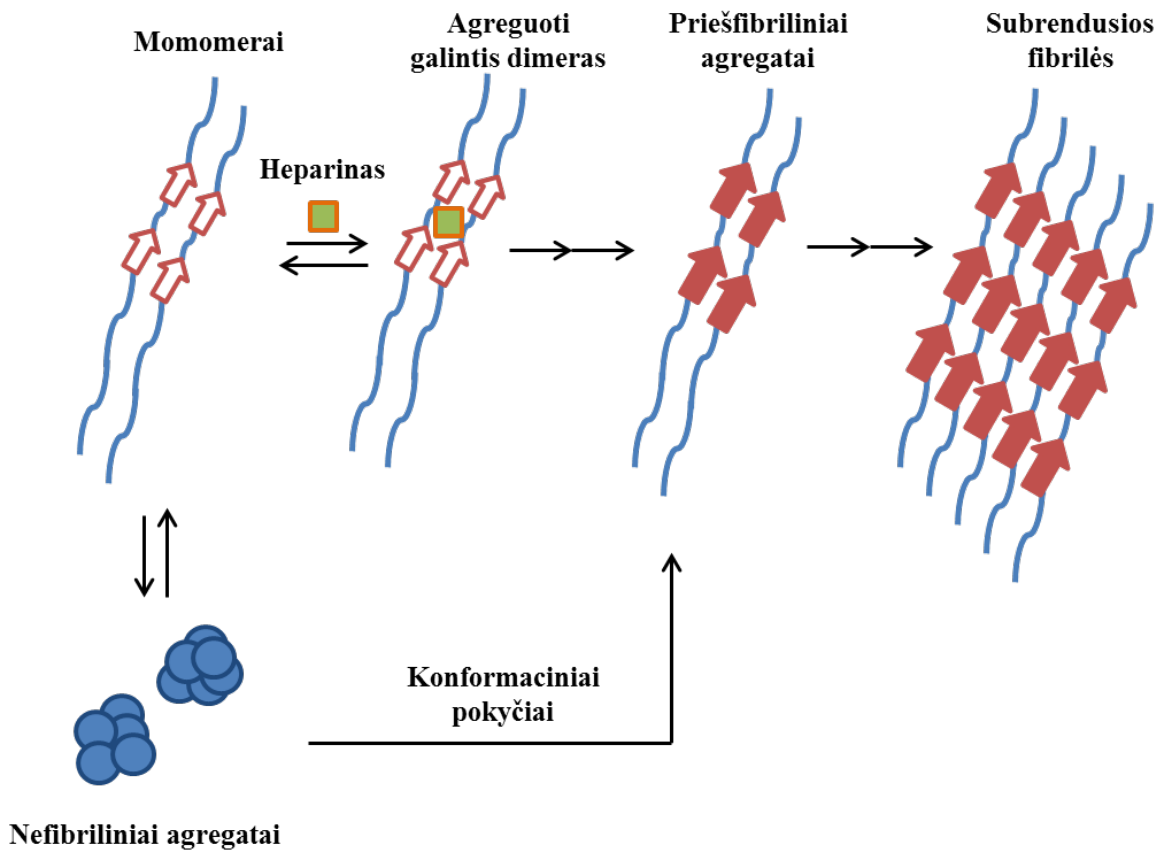
In vitro Tau baltymo fibrilizacijos kinetinis modelis yra panašus į kitų amiloidinių baltymų. Stebima lag fazė, kurios metu formuojasi nukleacijos centrai ir ją sekantis greitas fibrilių augimas (?). Dėl to galime teigti, kad limituojanti stadija yra nukleacijos centrų susiformavimas. Aktyvacijos energija reakcijai yra tokia didelė, kad reikia daugiau nei vienos savaitės norint pastebėti Tau baltymo agregaciją net esant didelėms koncentracijoms (?). Todėl atliekant Tau agregacijos tyrimus naudojami polianijonai, kurie gali sumažinti aktyvacijos energiją trimis būdais: 1) neutralizuoti teigiamą baltymo krūvį, sumažinat atostūmos jėgas 2) prisirišant baltymą atidengiant hidrofobines sekas 3) skatinant hidrofobinę sąveiką, nes stabilizuoja vandenilinius ryšius tarp vandens molekulių (?). Sibille ir kolegos nustatė, kad dėl sąveikos su heparinu Tau baltymas įgauna būtent β -klosčių struktūrą (?). Dažniausiai naudojamas polianijonas yra heparinas, bet gali būti naudojami ir kiti, tokie kaip RNR ar arachidoninė rūgštis.

Tau baltymo agregacijos greičio priklausomybė nuo polianijonų yra varpo formos (??). Tikslus agregacijos mechanizmas nežinomas, bet yra Ramachandran ir Udgaonkar pasiūlytas modelis; heparinas padeda susiformuoti agreguoti galinčiam dimerui, kuris atlieka nukleacijos centro funkciją (?). Tolimesnė eleongacija vyksta pridėdant monomerą prie augančios fibrilės. Svarbu tai, jog pats heparinas į fibrilių branduolį nėra inkorporuojamas?. Tačiau pats heparino disociacijos mechanizmas lieka neaiškus: ar heparino disocijacija sukelia tolimesnius struktūrinius pokyčius, ar struktūriniai pokyčiai sukelia disociaciją (?) (?? pav.).

Formuojant fibriles su heparinu kaip ir *in vivo* gaunamos trys skirtingos protofilamentų morfologijos (?) (?). Tačiau lieka pagrindinis klausimas, dėl kurio kyla daug debatų: ar šios fibrilės yra tokios pat kaip randamos *in vivo*. Nors keletas tyrimų nustatė protofibrilių parametrus panašius kaip AD atveju (?), kiti gavo dydžius labai skirtingus (?). Lieka vienas svarbiausias požymis, kad tiek iš AD išskirtos, tiek *in vitro* gautos fibrilės naudojant rekombinantinį baltymą ir hepariną gali veikti kaip šablonas natyvaus Tau baltymo fibrilizacijai.

1.6. Tau fibrilės ir toksiškumas

Ilgai buvo daroma prielaida, kad Tau baltymo fibrilės yra toksiškos, nes jų susidarymas turėjo sąsajos su smegenų funkcijos silpnėjimu (?). Tačiau vis didėjantis skaičius tyrimų parodo, kad Tau oligomerai gali būti citotoksiškesni nei subrendusios fibrilės, nes fibrilių turintys neuronai gali išgyventi dešimtmečius (?). Taip pat, tyrimuose su gyvūnais, kurių smegenyse yra padidinta ekspresija Tau baltymo, neurodegeneracija pastebima prieš susida-



7 pav. Heparino veikimo mechanizmas. Heparinas padeda susiformuoti agreguoti galintiems dimerams. Šis dimeras veikia kaip nukleacijos centras ir prie jo jungiant po Tau monomerą vyksta fibrilės elongacija.

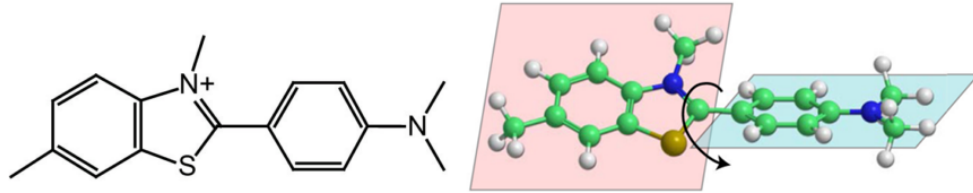
rarrant fibrilėms (?). Be to, kai pelėms suleidžiami išskirti oligomerai, o ne monomerai ar fibrilės, atsiranda atminties sutrikimų ir sinapsinė disfunkcija (?).

Nors neaptikta, kad fibrilės pasižymėtų tokiais citotoksinėmis savybėmis kaip oligomerai, jos gali atlikti visiškai kitokią funkciją nei ilgą laiką buvo manoma. Tau oligomerų pasižyminčių neurotoksinėmis savybėmis, vertimas inertinėmis fibrilėmis galėtų būti ląstelių apsauginis mechanizmas prieš tokias patologines baltymo formas. Tačiau fibrilių kaupimasis palieka mažai vietos organoidams. Ultrastruktūriniai tyrimai parodė, kad fibrilių turinčiuose neuronuose nyksta endoplazminis tinklas ir ribosomos, bet išlieka mitochondrijos, vadinasi, sumažėja baltymų sintezė, tačiau išlieka oksidacinis metabolizmas (?). Taip pat pademonstruota, kad Tau fibrilės gautos su arachidone rūgštimi inhibuoja nuo kinezino priklausomą transportą, tačiau nepakeičia mikrovamzdelių morfologijos (?). Bet šis pastebėjimas buvo vėliau patikslintas, kad būtent už mikrovamzdelių destabilizavimą yra atsakinga patologiškos Tau forma, kuri dar nėra suagregavusi (?). Todėl dabar fibrilės laikomos netiesiogiai citotoksiška forma, kurių rolė gali būti apsauginė (?).

1.7. Tioflavinas T

Vienas dažniausiai naudojamų metodų tiriant amiloidines fibriles yra fluorescencinės spektroskopija, naudojant fibrilių struktūrai specifinius dažus. Stebint fibrilių susidarymą

dažniausiai naudojamas benzotiolo dažas tioflavinas T (?? pav.). Laisvo ThT sužadavimo ir emisijos bangos ilgių maksimumai yra 380 nm ir 445 nm, tačiau prisijungus amiloidines fibriles šie bangos ilgiai pasikeičia atitinkamai į 450 nm ir 480 nm. ThT selektyviai jungiasi prie amiloidinėms fibrilėms būdingos β -klosčių struktūros ir pradeda intensyviau fluorescuoti. Manoma, kad dramatiškas ThT fluorescencijos intensyvumo sustiprėjimas atsiranda dėl tam tikros konformacijos imobilizavimo (?). Laisvoje formoje, junginys dėl mažos aktyvacijos energijos, benzilamido ir benzationo žiedai gali laisvai sukis, apie savo bendrą C-C jungtį (?). Dėl šios rotacijos, junginio sužadavimas greitai nuslopinamas, todėl laisvas ThT



8 pav. Tioflavino T struktūra Adaptuota iš (?)

prastai fluorescuoja. Prisijungus dažui prie amiloidinių fibrilių inhibuojama rotacija, todėl nebeslopinamas sužadavimas. Deja, buvo parodyta, kad ThT gali sąveikauti su hidrofobinėmis globulinių baltymų spiralėmis ir daug α -spiralių turinčiomis struktūromis (?). Todėl, norint garantuoti, kad suformuotos fibrilės reikėtų atlikti papildomus eksperimentus.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

- TRIS, ROTH, >99%
- MES, Fisher Scientific, >98%
- HEPES, ROTH, >99%
- CH₃COOH, Across Organic, >99.5%
- Tioflavinas T, Sigma Aldrich
- Heparinas, Across organic
- EDTA, Fisher Scientific, >99%
- Triptonas, Fisher Scientific
- Mielių ekstraktas, Oxoid
- NaH₂PO₄, Across Organic, >99%
- Na₂HPO₄, Across Organic >99%
- KH₂PO₄, ROTH, >99%
- K₂HPO₄, >99%
- NH₄Cl, Across Organic, 99.6%
- Na₂SO₄, Across Organic, 99.6%
- MgSO₄ · 7 H₂O, Fisher Scientific
- Glicerolis, Across Organic, >99%
- Dekstroze, Fisher Scientific, 99.8%
- HCl, Across Organic, 37%
- NaOH, Across Organic
- DTT, Fisher Scientific
- NaDS, Fisher Scientific, >99%
- Glicinas, Fisher Scientific, >98,5%
- (NH₄)₂SO₄, Across Organic, 99.5%

- PMSF, ROTH, >99 %
- TEMED, Fisher Scientific
- APS, Across Organic, 99,5 %

2.2. Laboratorinė įranga

- PCB analitinės svartyklės d=0.01, KERN
- IB-15G termostatas, Fisher Scientific
- Rotor-GEne Q real-time PGR cikleris, QIAGEN
- AS 4.500 rotorius, Herolab
- UV-1800 spektrofotometras, Shimadzu Scientific
- Techno Maxi centrifūga, Fisher Scientific,
- Kolonėlė XK-26, GE Healthcare
- Kolonėlė Triton 10/600, GE Healthcare
- AKTA chromatografinė sistema, GE Healthcare
- Mini Dry Bath Termostatinė vonelė, Fisher Scientific
- ARE magnetinė maišyklė, VELP Scientific
- AF 6.500 rotorius, Herolab
- AF 8.50.2 rotorius, Herolab
- KS 4000i purtyklė, IKA
- HiCen SR superspeed centrifūga, Herolab
- Homogenizavimo zondas VS70T, Bandelin
- Ultragarsinis homogenizatorius Sonopuls HD 3100, Bandelin

2.3. Tirpalai ir buferiai

2.3.1. Gryninimo buferiniai tirpalai

- **A:** 25mM TRIS, 10mM EDTA, 0.1mM DTT, 0.1mM PMSF pH 7.4
- **B:** 1M NaCl, 25mM TRIS, 10mM EDTA, 0.1mM DTT, 0.1mM PMSF pH 7.4
- **C:** 20mM PBS, 0,1 PMSF pH 7.4

- **D:** 10mM HEPES pH 7.4
- **E:** 8M Urėja, 10mM TRIS pH 8.0

2.3.2. Mitybinės terpės

- **ZYM-5052:** terpė ruošiama kaip aprašyta literatūros šaltinyje (?).
- **LB (Luria Broth):** 10 g NaCl, 10 g baltymų hidrolizato, 5 g mielių ekstrakto ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.
- **S.O.C.:** 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. Ataušinus iki kambario temperatūros, pridedama Mg druskų ir gliukozės ir steriliai nufiltruojama.

2.3.3. Tirpalai

- 50mM MES pH 6,11 6,22 6,33 6,44, 6,55, 6,66
- 50mM CH₃COOH pH 5
- 50mM HEPES pH 7,41
- 50mM TRIS 50mM pH 8.84
- 10mM ThT
- 2,7g/ml Heparino
- 1M NaOH
- 1M HCl
- 7% TCA

2.4. Metodai

2.4.1. Transformacija į kompetentines ląsteles

1N4R izoformą koduojantį geną turinti plazmidė pRK172 buvo gauta iš M.Goedert (?). Paimama petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, kurioje yra 100 µg/ml ampicilino ir šildoma termostate, kuriame nustatyta 37 °C temperatūra. Tada į 30 µL kompetentinių ląstelių įdedamas 1µL plazmidės ir laikoma ledo vonioje 30min. Po inkubacijos vykdomas termoshokas, 90s inkubuojama 42 °C temperatūroje, praėjus laikui mišinys greitai perkeliamas į ledo vonią ir laikoma 2 min. Streso pašalinimui į transformacijos mišinį pridedama 400 µL S.O.C. terpės ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 45 min, esant pastoviam purtymui (220

aps/min). Ląstelės centrifuguojamos ir nupilama 300 μL supernatanto. Likusiam 130 μL resuspenduojamos ląstelės ir išsėjamos ant petri lėkštelės. Auginama 16 h, esant 37 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrai.

2.4.2. Rekombinantinio baltymo ekspresija

Pirma paruošiama naktinė kultūra. Į 100 ml LB mitybinės terpės, kurioje yra 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ampicilino užsėjama viena kolonija nuo petri lėkštelės ir auginama 16 h esant 37 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrai ir pastoviam purtymui (220 aps/min). Tada 20 ml naktinės kultūros persėjama į kolbą, kurioje yra 400 ml ZYM-5052 terpės su 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilino. Auginama esant 37 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrai ir pastoviam purtymui 220 aps/min 5h. Auginimo metu imami mėginiai kas 1 valandą, kurie vėliau analizuojama NaDS-PAAG metodu. Baigus auginimą kultūrinis skystis centrifuguojamas 35 min 5000 aps/min. Supernatantas nupilamas, o biomasė surenkama ir užšaldoma -20 $^{\circ}\text{C}$.

2.4.3. Baltymų elektroforezės mėginių ruošimas

1. Reikalingas kultūrinio skysčio mėginių tūris apskaičiuojamas pagal optinį tankį. Po vienos valandos paimame 300 μL mėginį. Dar po valandos imant mėginį pamatuojamas optinis tankis ir mėginio tūris apskaičiuojamas pagal formulę(1). Tada mėginiai centrifuguojami esant 6000 aps/min 2 min. Supernatantas nusiurbiamas, o nuosėdos resuspenduojamos 20 μL 6x dažo.

$$V_2 = \frac{OD_1 \times V_1}{OD_2} \quad (1)$$

kur OD_1 - optinis tankis pirmo mėginio paėmimo metu, V_1 - paimto pirmo mėginio tūris, OD_2 -optinis tankis antro mėginio paėmimo metu.

2. Iš chromatografijos metu gautų frakcijų ruošiami mėginiai juos sumaišant atitinkamu santykiu su 6x dažu.
3. Mėginiai turintys daug stipriai joninę jėgą pasižymintį druskų, kaip $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ išsodinami su TCA. 50 μL mėginio užpilama 1 ml TCA 7 % tirpalu ir inkubuojama 10 min. Centrifuguojama 5 min esant 10000 aps/min. Nuosėdos ištirpinamos po truputį pridėdant 0,1 M NaOH kol pilnai ištirpsta.

Visi mėginiai kaitinami 10 min esant 98 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrai.

2.4.4. NaDS-PAAG elektroforezė

Geliai ruošiamas sumaišant lentelėje nurodytus reagentus, pagal surašytą eiliškumo tvarką. Pirma sumaišomi reagentai reikalingi skirstomajam geliui stiklinėlėje. Stiklinėlė lengvai sukama palei stalą, kad gerai susimaišytų reagentai. Tada gelis supilamas tarp elektroforezės plokštelių ir užsluoksniuojamas 1 ml dH_2O . Skirstomojo gelio polimerizacija vykdoma apie

1 lentelė. Elektroforezės gelio reagentai

Frakcionuojantis gelis		Koncentruojamasis gelis	
dH ₂ O	2,55 ml	dH ₂ O	1,27 ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,53 ml	1M Tris-HCl pH 6,8	500 µl
40% AA/BAA	1,83 ml	40% AA/BAA	201 µl
10% NaDS	61 µl	10% NaDS	20 µl
APS	30,5 µl	APS	10 µl
TEMED	3,65 µl	TEMED	2 µl

40 min. Taip pat kaip ir skirstomasis sumaišomas koncentruojamasis gelis ir supilamas ant skirstomojo gelio tarp elektroforezės plokštelių. Supylus gelį įstatomos šukos, kad susiformuotų šulinėliai ir polimerizuojama 30 min. Susipolimerizavus geliui plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą ir užpildoma elektroforezės bueriniu tirpalu. Ištraukiamos šukos, suleidžiami mėginiai ir paleidžiama srovė ($I=30$ mA).

2.4.5. Biomės paruošimas chromatografijai

Iš šaldiklio ištraukta biomės užpilama 50 ml buferinio tirpalo A ir atitirpinama. Biomės perkeliama į homogenizatorių ir jame homogenizuojama. Homogenizuota biomės praskiedžiama dar 50 ml buferinio tirpalo A ir įstatoma į ledo vonią. Tada ardoma ultragarsu 17 min 60 s darbo ir 60 s poilsio intervalais, esant 70 % amplitudei, naudojamas VS70T homogenizavimo zondas. Suardyta biomės centrifuguojama 30 min esant 17000 aps/min, taip pašalinamos ląstelių nuolaužos.

2.4.6. Chromatografinis gryninimas

- Anijonų mainų chromatografija.** 10 ml sorbento DEAE-Sepharose Fast Flow™ supilams į kolonėlę XK-26 ir praplaunamas distiliuotu vandeniu. Toliau pusiausvyrinama buferiniu tirpalu A, tol kol sorbento tirpalo pH bus 7,4. Ant nulygsvarinto sorbento užnešamas suardytos biomės supernatantas, tikslinis baltymas nesisorbuoja, todėl renkamas pratekėjimas. Likus šiek tiek supernatanto virš sorbento dar papildomai užpilama 50 ml buferinio tirpalo A, kad iš sorbento išplauti galimus tikslinio baltymo likučius. Procesas vykdomas šaldytuve esant 4°C temperatūrai. Likusios ant sorbento priemaišos pašalinamos regeneracijos metu, jį praplaunant 1M NaCl tirpalu.
- Katijonų mainų chromatografija.** 15 ml sorbento CM Sepharose Fast Flow™ pusiausvyrinamas stiklinėleje buferiniu tirpalu A vis nupilant seną buferį ir užpilant naują, tol kol sorbento tirpalo pH bus 7,4. Nupusiausvyrinus sorbentą ant jo užpilamas pratekėjimas po anijonų mainų chromatografijos ir inkubuojama 30 min, lengvai maišant. Po inkubacijos sorbentas su prisirišusiais baltymais supilamas į XK-26 kolonėlę ir prijungiama prie AKTA chromatografinės sistemos. Chromatografija vykdoma esant 3 ml/min greičiui ir elucijai naudojamas 40 min 0-40 % gradientas buferinio tirpalo B. Renkamos frakcijos po 6 ml.

3. **Išsodinimas amonio sulfatu.** Po katijonų mainų chromatografijos frakcijos turinčios tikslinį baltymą išsodinamos amoniosulfatu per naktį, naudojamas 30 % įsisotinimas. Nuosėdos centrifuguojamos 20min esant 17000aps/min ir resuspenduojamos 1,6 ml buferinio tirpalo C.
4. **Gelfiltracinė chromatografija.** 60 ml sorbento Superdex 200 Prep Grade. Sorbentas praplaunamas distiliuotu vandeniu ir supilamas į Triton 10/600 kolonėlę prie kurios yra prijungtas papildomas 10/300 rezervuaras. Supylus sorbentą vieną valandą 1 ml/min greičiu distiliuotu vandeniu plaunamas ir tuo pačiu pakuojamas sorbentas. Praėjus valandai 10min leidžiama 3 ml/min greičiu, kad dar stipriau susipakuotų sorbentas. Sorbentui susispaudus nuimamas papildomas rezervuaras ir viršutinis adapteris perkeliamas ant Triton 10/600 kolonėlės. Tada dar 10 min pakuojamas sorbentas esant 3 ml/min greičiu. Baigus susipakavimui greitai nuleidžiamas viršutinis adapteris iki pat sorbento. Kolona pusiausvyrinama buferiniu tirpalu C. Naudojamas 1mL/min greitis ir užnešinėjama po 0,4 ml mėginio. Surenkamos frakcijos po 1 ml.

Koncentravimas ir koncentracijos matavimas

Po gelfiltracijos atliekamas koncentravimas. Baltyminis tirpalas supilamas į „Amicon® Ultra–15“ koncentratorių ir centrifuguojamas 20 min esant 5000 aps/min. Koncentratas užpilamas 10 mM HEPES pH 7,4 buferiniu tirpalu ir vėl centrifuguojama. Taip pakeičiamas buferinis tirpalas.

2.4.7. Sorbentų regeneravimas

1. Jonų mainų sorbentai regeneruojami iškrovus juos iš kolonos. Pirma sorbentas gerai atplaunamas H₂O tada sorbentas užpilamas 1 M NaCl tirpalu ir laikomas 1 h, po to vėl gerai atplaunamas vandeniu. Ta pati veiksmų seka kartojama su 1 M NaOH ir 1 M CH₃COOH. Sorbentas užpilamas 20 % EtOH ir padedamas į šaldytuvą.
2. Gelfiltracinis sorbentas regeneruojamas kolonoje prijungtoje prie chromatografo. Praplaunama buferiniu tirpalu E, kad pasišalintų galimai percipitavę ir hidrofobiškai prisijungę baltymai. Tada kolona gerai atplaunama H₂O, atjungiama nuo chromatografo ir įstatoma į stovą.

2.4.8. Tau baltymo agregacijos tyrimai fluorescencinės spektroskopijos būdu

Fluorescencijos prilausomybei nuo laiko naudojamas realaus laiko PGR aparatas „Qiagen Rotor-Gene Q“. Naudojamas žaliasis aparato kanalas t.y. sužadinimas 470 nm, o emisija detektuojama 510 nm. Naudojamas rotorius, kuriame patalpinti mėginiai sukasi 400 aps/min greičiu ir emisija matuojama kas 1 min, palaikant pastovią temperatūrą. Agregacija tirinama esant žemiau pateiktoms sąlygoms.

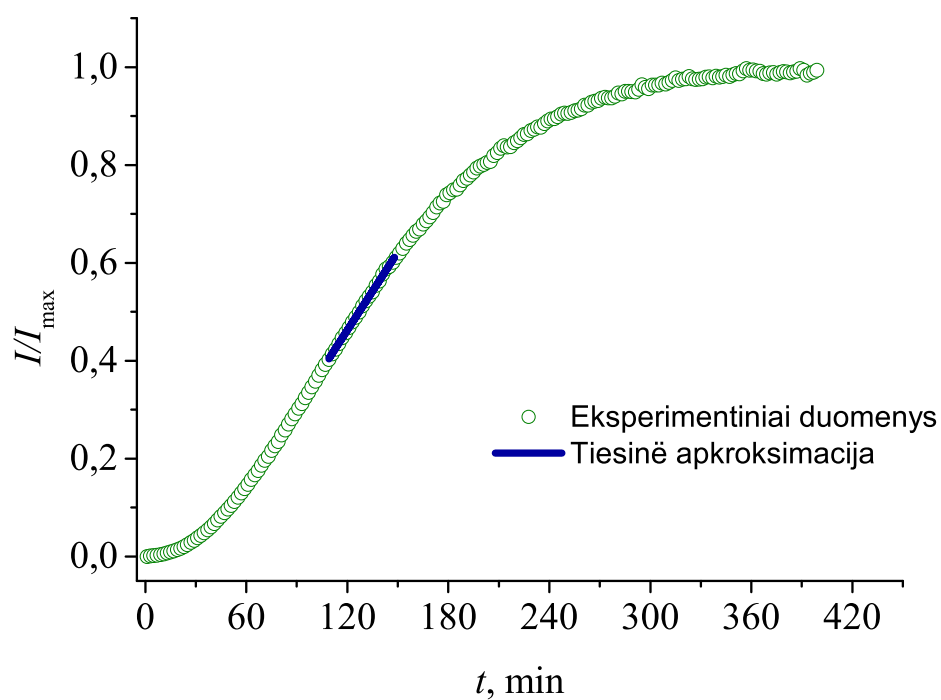
- **Buferinio tirpalo įtakos tyrimas.** Naudojama 30 μM baltymo, 50 μM ThT, 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparino. Naudojami buferiniai 50 mM CH_3COO^- pH 5, 50 mM MES pH 6, 50 mM HEPES pH 7, 50 mM Tris pH 8, esant 50 $^\circ\text{C}$.
- **Heparino koncentracijos įtakos tyrimas.** Naudojama 30 μM baltymo, 50 μM ThT, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir heparino koncentracijos: 67,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 135 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 202,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 270 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 337,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 405 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 472,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 540 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 607,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 675 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 742,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 810 $\mu\text{g}/\text{ml}$, esant 50 $^\circ\text{C}$.
- **Joninės jėgos įtakos tyrimas.** Naudojama 30 μM baltymo, 50 μM ThT, 135 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparino, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir NaCl koncentracijos: 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, esant 50 $^\circ\text{C}$.
- **Baltymo koncentracijos įtakos tyrimas.** Naudojama, 50 μM ThT, 135 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparino, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir baltymo koncentracijos: 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM , esant 50 $^\circ\text{C}$.
- **Sėklos įtakos tyrimas.**
 1. Naudojama, 30 μM 1N4R+sėkla, 50 μM ThT, 135 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparino, 10 % sėklos ir 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas, esant 50 $^\circ\text{C}$.
 2. Naudojama, 30 μM 1N4R+sėkla, 50 μM ThT, 10 % sėklos ir 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas, esant 50 $^\circ\text{C}$.

2.4.9. Duomenų apdorojimas

Visos gautos fluorescencinės kreivės yra normalizuojamos pagal formulę:

$$I/I_{max} = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \quad (2)$$

Agregacijos reakcijos greičiai buvo apskaičiuojami panaudojant tiesinę aproksimaciją tarp 0,4 ir 0,6 nuo kreivės maksimumo (?? pav.). Nepritaikytas matematinis modelis duomenų gluodinimui, nes esant skirtingoms sąlygoms gaunama skirtinga kreivių forma. Vienu atveju labiau hiperbolinė, kitu labiau sigmoidinė. Paklaidos skaičiuojamos pagal studento metodą, naudojant 0,95 pasiklovimo tikimybę.



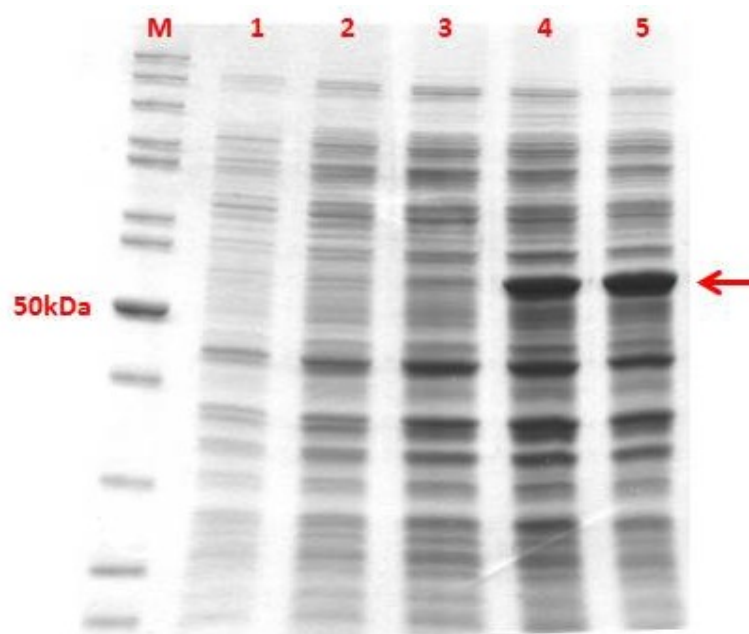
9 pav. ThT fluorescencijos kreivė esant 30 μ M 1N4R, 10 μ M heparino, 50 μ M ThT, 50mM MES pH buferinis tirpalas, esant 50°C.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Tau baltymo 1N4R izoformos gryninimas

3.1.1. 1N4R izoformos ekspresija

Atlikta transformacija į *E.coli* BL21star(DE3) kamieną. Transformantai auginti LB terpėje, po to persėti į ZYM terpę, kurioje vykdoma izoformos sintezė. Tikslinio baltymo ekspresija išanalizuota NaDS-PAAG elektroforezės metodu (?? pav.). Aiškiai pastebėta, kad izoformos ekspresija prasideda tarp 3 ir 4 valandos. Nors remiantis programos „Prot-Param“ pateikiamais duomenimis rekombinantinės 1N4R izoformos molekulinė masė turėtų būti 42835,5 Da (?), bet NaDS-PAAG stebima daug didesnė molekulinė masė. Tačiau iš analizuotos literatūros žinoma, kad tai dažnas neatitikimas, leidžiant Tau baltymo izoformas poliakrilamidiniame gelyje jų molekulinės masės gaunamos ribose 45 – 65 kDa (?).

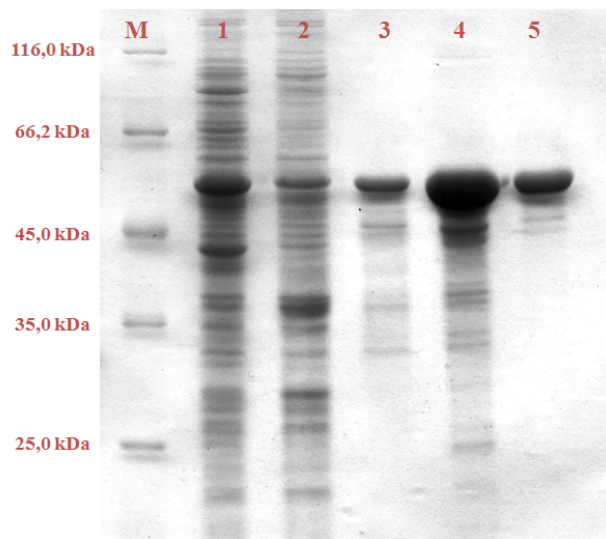


10 pav. Rekombinantinės 1N4R izoformos ekspresija. Raudona rodykle pažymėtas tikslinis baltymas. M- molekulių masių markeris, 1-5 kas vieną valandą imti kultūrinio skysčio mėginiai.

3.1.2. 1N4R izoformos gryninimas

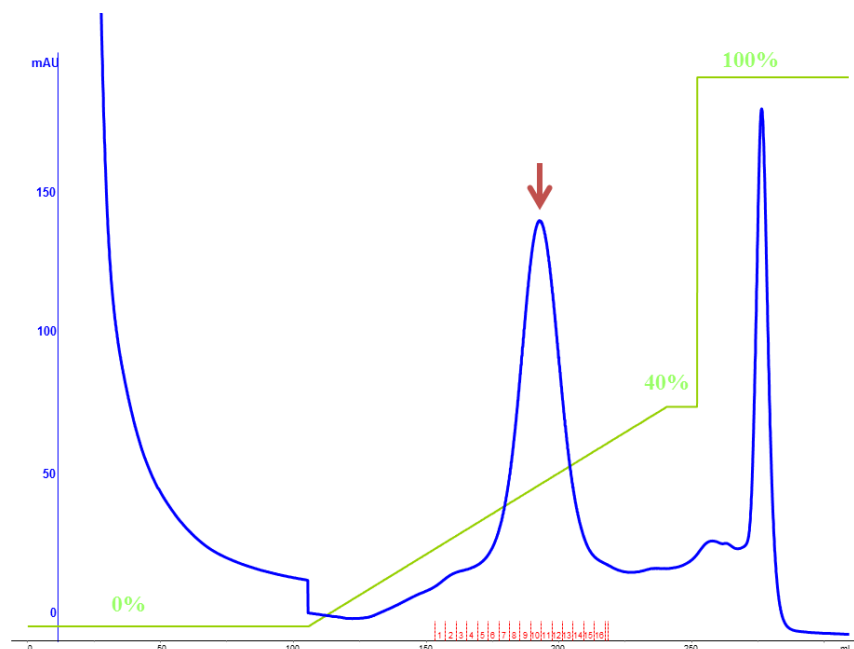
Užauginta biomasė buvo surinkta centrifuguojant ir suardyta ultragarsu. Pašalinus suardytų ląstelių nuolaužas, iš lizato gryninta Tau baltymo izoforma 4 žingsniais: katijonų ir anijonų mainų chromatografijos, išsodinimas amonio sulfatu ir gelfiltracija. Pirma, atliekama anijonų mainų chromatografija. Pratekėjimas analizuojamas NaDS-PAAG elektroforezės metodu (?? pav.). Iš elektroforeogramos matoma, kad pratekėjo tikslinis baltymas, o ant sorbento liko daug priemaišų. Toliau atlikta katijonų mainų chromatografija. Buferinio tirpalo tekėjimo srovė nuo sorbento pašalina didelį kiekį priemaišų, kurios prie sorbento sor-

buojasi dėl nespecifinės sąveikos, joms pasišalinus izoforma eliuota NaCl gradientu (?? pav.). Gryninimo metu surinktos frakcijos buvo analizuotos NaDS-PAAG elektroforezės metodu (?? pav.).



11 pav. Tau baltymo izoformos 1N4R gryninimo elektroforeograma. M-molekulinių masių markeris, 1-ląstelių lizatas, 2-po anionų mainų chromatografijos, 3-po katijonų mainų chromatografijos, 4- išsodinimas amonio sulfatu, 5-po gelfiltracijos.

Atsižvelgiant į elektroforeogramą, frakcijos, kuriose yra Tau baltymo izoforma apjungtos iš išsodintos amonio sulfatu (?? pav.). Po percipitacijos, nuosėdos nucentrifuguotos ir supernatantas pašalintas.



12 pav. Gryninimo su CM Sepharose Fast Flow chromatograma. Mėlyna linija žymima absorbcija esant 280nm bangos ilgiui, buferinio tirpalo B gradientas, raudona rodykle pažymėta smailė, kurioje yra tikslinis baltymas.

Resuspenduotos nuosėdos ir vykdyta, paskutinė gryninimo stadija - gelfiltracija, kurios

metu pašalintos likusios priemaišos. Chromatografijos metu pašalinamos mažesnės molekulinės masės priemaišos. Surinktos frakcijos išnaluotos taip pat baltymų NaDS-PAAG elektroforezės metodu ir matomas baltymas su minimaliu kiekiu priemaišų (?? pav.). Frakcijos su grynu baltymu koncentruojamos iki 5mg/mL koncentracijos. Molekulinės masės patikrinimui atlikta masių spektrometrija, išgryninto baltymo molekulinė masė gauta 42835,8 Da (atliko Dr. Vytautas Smirnovas). Gauta molekulinė masė sutampa su teorine, todėl buvo galima teigti, kad sėkmingai išgrynintas tikslinis baltymas. Iš viso atlikti 5 tokie gryninimai, jų metu gauti baltymų kiekiai pateikti ?? lentelėje ir apskaičiuota kiek toks kiekis baltymo kainuotų perkant iš įmonių ?? lentelėje.

2 lentelė. Gryninimo metu gauti 1N4R izoformos kiekiai

Gryninimo Nr.	Biomassės kiekis,(g)	1N4R kiekis, (mg)
1	8,50 ± 0,01	7,53 ± 0,01
2	8,40 ± 0,01	10,85 ± 0,01
3	8,34 ± 0,01	8,16 ± 0,01
4	5,90 ± 0,01	5,07 ± 0,01
5	15,20 ± 0,01	15,61 ± 0,01
	Iš viso:	47,22 ± 0,05

3 lentelė. 1N4R izoformos gamintojų kainos

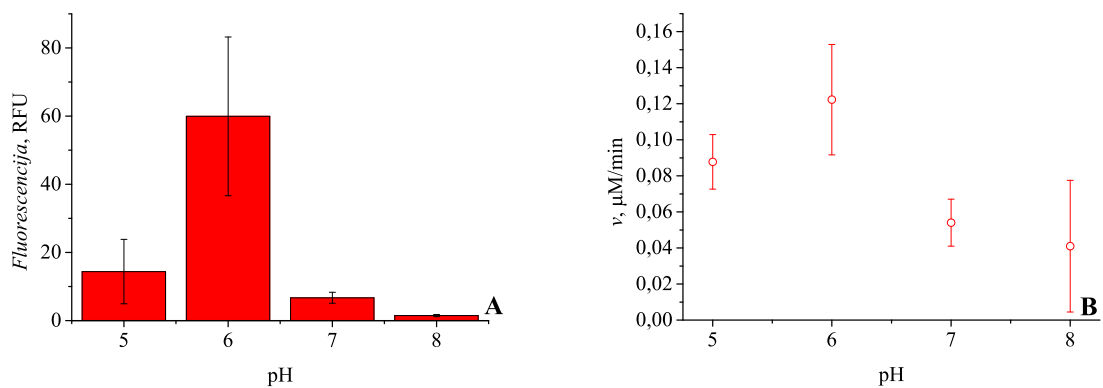
Įmonės pav.	Grynumas	Kaina (50µg/eur)	Išgryninto kiekio kaina (eur)
Sigma-Aldrich	>90	498,5	468590
rPeptide	>90	200,9	188846

3.2. Agregacijos tyrimas

3.2.1. Buferinio tirpalo įtaka

Agregacijos tyrimai atlikti matuojant ThT fluorescenciją, tačiau su Tau baltymo 1N4R izoforma laboratorijoje, kurioje atlikau savo bakalaurinį darbą, nebuvo dar atlikti jokie eksperimentai todėl, reikėjo parinkti tinkamą agregacijos reakcijos buferį.

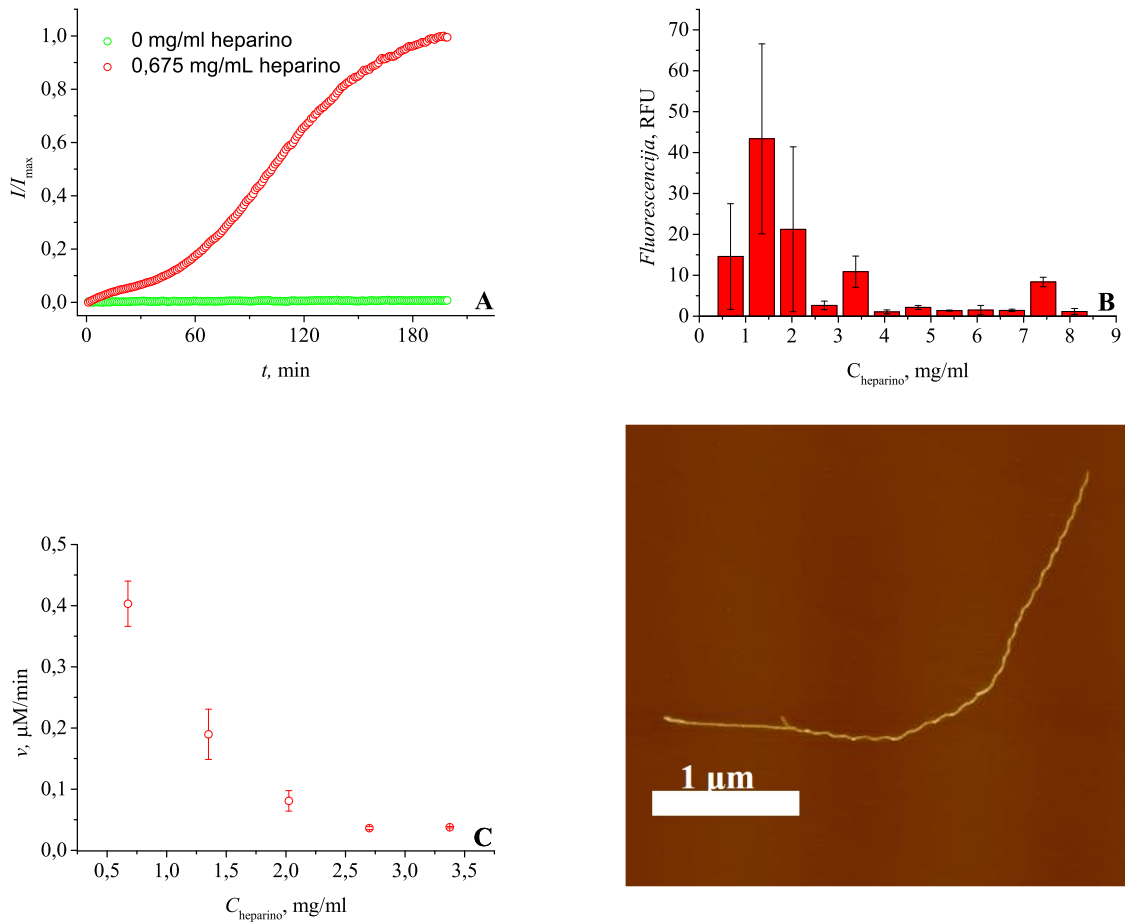
Analizuotoje literatūroje daugelyje straipsnių buvo paminėta, kad joninė jėga slopina Tau baltymo agregaciją naudojant polianijoną hepariną (??). Todėl pasirinkti keturi skirtingą pH ir mažą joninę jėgą turintys buferiniai tirpalai. Matuojant ThT fluorescenciją nustatyta, kad intensyviausia fluorescencija ir didžiausias agregacijos greitis pastebimas esant 50mM MES pH 6 buferiniam tirpalui (?? pav.). Todėl tolimesniems eksperimentams buvo pasirinktas šis buferinis tirpalas.



13 pav. Agregacijos greičio priklausomybė naudojant skirtingus buferinius tirpalus. A–ThT fluorescencijos kreivės B–agregacijos greičiai.

3.2.2. Heparino koncentracijos įtaka

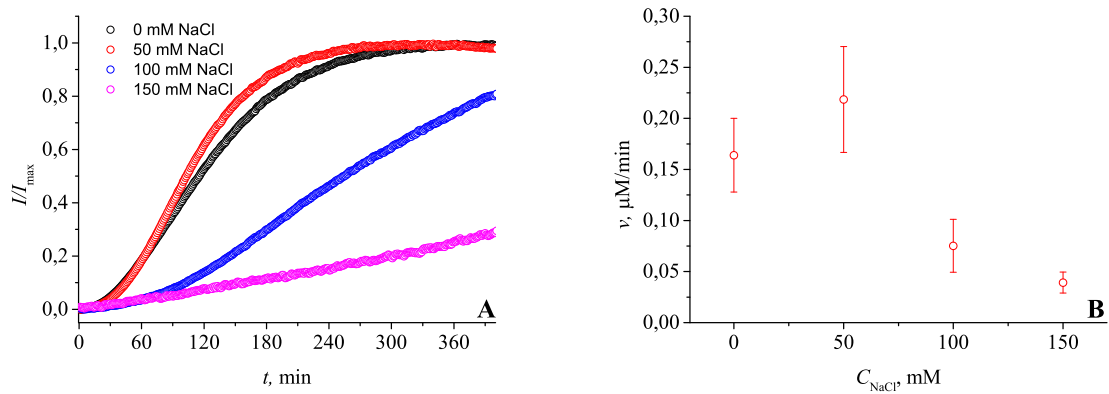
Pasirinkus agregacijos reakcijos buferį, toliau tirta izoformos ir heparino stochiometrijos įtaka agregacijos greičiui. Tiek ThT fluorescencijos, tiek elongacijos greitis buvo didžiausias esant mažoms heparino koncentracijoms (?? pav.). Toks rezultatas sutapo su straipsniuose aprašytais dėsningumais (??). Kaip jau buvo minėta literatūrinėje dalyje, ThT fluorescencijos sustiprėjimas nebūtinai reiškia β -klosčių susidarymą, todėl buvo padaryta nuotrauka su atominės jėgos mikroskopu (atliko Tomas Šneideris). Aiškiai matoma ilga susisukusi fibrilė, savo forma panaši į spiralinį filamentą. (?? pav.).



14 pav. Agregacijos priklausomybė nuo heparino koncentracijos. A–pateiktos ThT fluorescencijos kreivės, kai reakcijos mišinyje yra (raudona) ir nėra (žalia) heparino. B–ThT fluorescencijos intensyvumai esant skirtingoms heparino koncentracijoms. C–Agregacijos greičiai esant skirtingoms heparino koncentracijoms. D–fibrilės nuotrauka padaryta su atominės jėgos mikroskopu

3.2.3. Joninės jėgos įtaka

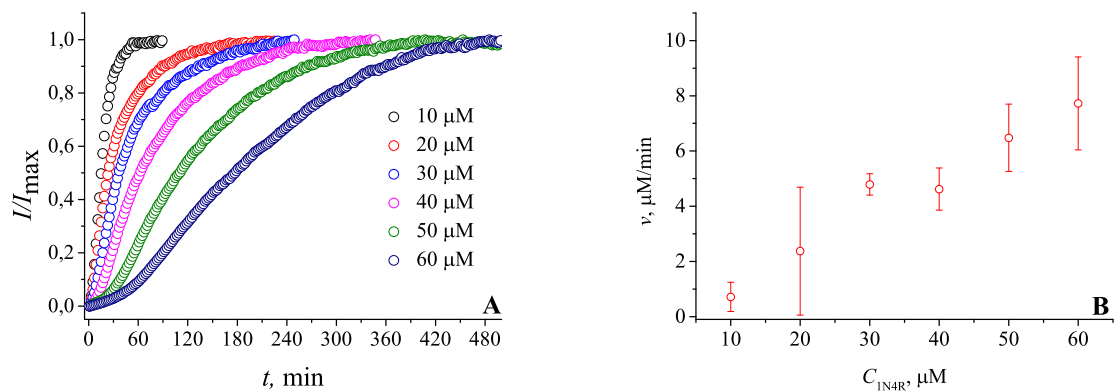
Nieko nuostabaus, kad reakcija, kurioje dalyvauja polianijonas priklauso nuo joninės jėgos. Naudojant buferinius tirpalus, kuriuose yra skirtinga NaCl koncentracija buvo ištirta joninės jėgos įtaka. Didžiausias greitis buvo pastebėtas esant 50mM NaCl, tačiau koncentracijai viršijus 150mM reakcijos mišinyje esantys jonai ekranuoja elektrostatinę sąveiką tarp baltymo ir heparino, todėl agregacija nebevyksta (?? pav.). Šie duomenys sutampa su (?) gautais rezultatais, nors buvo naudota kita temperatūra ir kitoks buferinis tirpalas, nei jų aprašytame eksperimente.



15 pav. Agregacijos priklausomybė nuo joninės jėgos. A–ThT fluorescencijos kreivės, esant skirtingoms NaCl koncentracijoms. B–agregacijos greičiai, esant skirtingoms NaCl koncentracijoms

3.2.4. Baltymo koncentracijos įtaka

Atliktas eksperimentas, kurio metu išlaikant pastovų heparino ir baltymo santykį ir tirta didėjančios baltymo koncentracijos įtaka agregacijos greičiui. Toks bandymas nebuvo pastebėtas nei viename analizuotame straipsnyje. Paprastai didinant baltymo koncentraciją pastebima intensyvesnė ThT fluorescencija, bei greitesnė agregacija. Gauti rezultatai nebuvo išimtis (?? pav.).

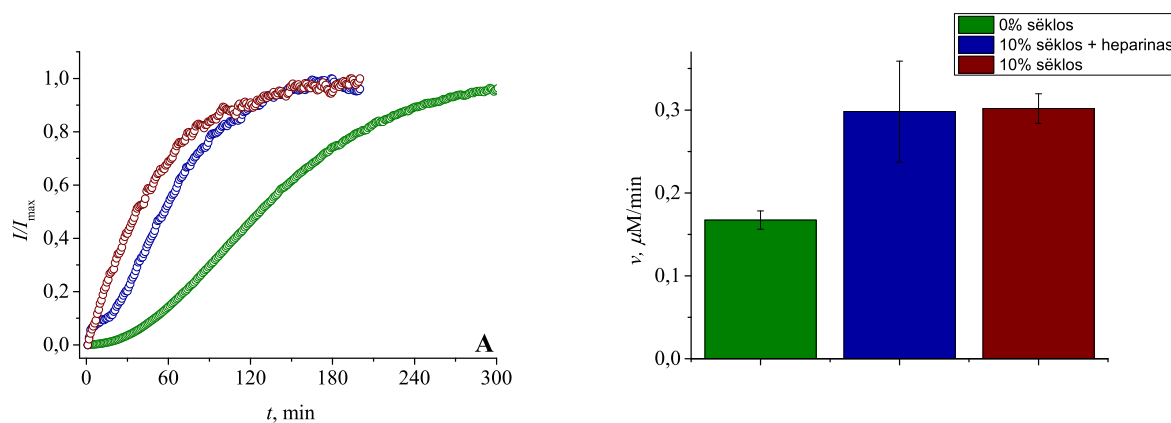


16 pav. Agregacijos priklausomybė nuo baltymo koncentracijos. A–ThT fluorescencijos kreivės, esant skirtingoms baltymo koncentracijoms. B–agregacijos greičiai esant skirtingoms baltymo koncentracijoms.

3.2.5. Sėklos įtaka agregacijai

Tiriant prieš tai minėtų veiksnių įtaką suformuota daug fibrilių, kurias buvo galima panaudoti kaip sėklą. Į reakcijos mišinį buvo pridėta 10 % tokios sėklos. Gauti duomenys aiškiai parodo, kad pridėjus sėklos agregacija vyksta greičiau (?? pav.). Remiantis Ramachandran ir Udgoankar modeliu, jau suformuotos fibrilės turi versti monomerus į jų amiloidinę for-

mą be polianijono, todėl iš reakcijos mišinio buvo pašalintas heparinas ir pridėta tik sėklos. Agregacijos greitis buvo labai panašus kaip ir su heparinu (?? pav.).



17 pav. Agregacijos priklausomybė nuo sėklos. A–ThT fluorescencijos kreivės, žalia spalva pažymėta kreivė gauta agregacijos reakciją vykdant be sėklos, raudona su sėkla ir heparinu, o mėlyna su sėkla be heparino. B–agregacijos greičiai

4. Išvados

1. Bakalaurinio darbo metu išgryninta $47,22 \pm 0,05$ mg Tau baltymo 1N4R izoformos.
2. Agregacijos reakcija vyksta greičiausiai esant 50mM NaCl, tačiau viršyjus 150mM agregacija nebevyksta.
3. Didinant baltymo koncentraciją agregacijos reakcija greitėja.
4. Pridėjus iš anksto suformuotų fibrilių į reakcijos mišinį agregacijos reakcija vyksta greičiau.

Literatūros sąrašas

- Ballatore, C., Lee, V. M.-Y., ir Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(9):663–672.
- Barghorn, S., Davies, P., ir Mandelkow, E. (2004). Tau Paired Helical Filaments from Alzheimer's Disease Brain and Assembled in Vitro Are Based on β -Structure in the Core Domain. *Biochemistry*, 43:1694–1703.
- Bretteville, A. ir Planel, E. (2008). Tau aggregates: toxic, inert, or protective species? *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 14(4):431–436.
- Buée, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., ir Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. These authors contributed equally to this work. *Brain Research Reviews*, 33:95–130.
- Carlson, S. W., Branden, M., Voss, K., Sun, Q., Rankin, C. a., ir Gamblin, T. C. (2007). A complex mechanism for inducer mediated tau polymerization. *Biochemistry*, 46(30):8838–8849.
- Cohen, T. J., Guo, J. L., Hurtado, D. E., Kwong, L. K., Mills, I. P., Trojanowski, J. Q., ir Lee, V. M. Y. (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nature communications*, 2:252.
- Daebel, V., Chinnathambi, S., Biernat, J., Schwalbe, M., Habenstein, B., Loquet, A., Akoury, E., Tepper, K., Müller, H., Baldus, M., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Mandelkow, E., Vijayan, V., ir Lange, A. (2012). β -sheet core of tau paired helical filaments revealed by solid-state NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 134:13982–13989.
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., ir Holzbaur, E. L. F. (2010). Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *319(5866):1086–1089*.
- Eichner, T. ir Radford, S. E. (2011). A Diversity of Assembly Mechanisms of a Generic Amyloid Fold. *Molecular Cell*, 43(1):8–18.
- Eisenberg, D. ir Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 148(6):1188–1203.
- Feany, M. ir Dickson, D. (1996). Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: A comparative study and review. *Neurological Progress*, 40(2):139–148.
- Fink, A. L. (2005). Natively unfolded proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(1 SPEC. ISS.):35–41.
- Fontaine, S. N., Sabbagh, J. J., Baker, J., Martinez-Licha, C. R., Darling, A., ir Dickey, C. a. (2015). Cellular factors modulating the mechanism of tau protein aggregation. *Cellular and Molecular Life Sciences*.

- Frost, B., Ollesch, J., Wille, H., ir Diamond, M. I. (2009). Conformational diversity of wild-type tau fibrils specified by templated conformation change. *Journal of Biological Chemistry*, 284(6):3546–3551.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., ir Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, pages 571–607.
- Go, L. ir Derosa, S. (2014). The Role of Tau Oligomers in the Onset of Alzheimer's Disease Neuropathology. *Acs Chemical Neuroscience*.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., ir Crowther, R. a. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4):519–526.
- Gong, C. X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., ir Iqbal, K. (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 112:813–838.
- Hwang, S. C., Jhon, D. Y., Bae, Y. S., Kim, J. H., ir Rhee, S. G. (1996). Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *The Journal of biological chemistry*, 271(31):18342–18349.
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B. C., Christie, M. J., Napier, I. a., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., ir Götz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3):387–397.
- Jeganathan, S., Von Bergen, M., Brutilach, H., Steinhoff, H. J., ir Mandelkow, E. (2006). Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry*, 45(7):2283–2293.
- Jeganathan, S., Von Bergen, M., Mandelkow, E. M., ir Mandelkow, E. (2008). The natively unfolded character of Tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry*, 47:10526–10539.
- King, M. E., Ghoshal, N., Wall, J. S., Binder, L. I., ir Ksiezak-Reding, H. (2001). Structural analysis of Pick's disease-derived and in vitro-assembled tau filaments. *The American journal of pathology*, 158(4):1481–1490.
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Rícný, J., ir Ripova, D. (2012). Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012.
- Lapointe, N. E., Morfini, G., Pigino, G., Gaisina, I. N., Alan, P., Binder, L. I., ir Brady, S. T. (2009). The Amino Terminus of Tau Inhibits Kinesin-Dependent Axonal Transport: Implications for Filament Toxicity. *Journal of Neuroscience*, 87(2):440–451.

- Lee, V. M. Y. (2011). Pathological Tau Aggregation. *Nat Commun*, 2:252.
- Li, W. ir Lee, V. M. Y. (2006). Characterization of two VQIXXK motifs for tau fibrillization in vitro. *Biochemistry*, 45(51):15692–15701.
- Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Merkle, R. K., ir Gong, C. X. (2002). Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Letters*, 512:101–106.
- Morozova, O. a., March, Z. M., Robinson, A. S., ir Colby, D. W. (2013). Conformational Features of Tau Fibrils from Alzheimer's Disease Brain Are Faithfully Propagated by Unmodified Recombinant Protein. *Biochemistry*, 52:6960–6967.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., ir Mucke, L. (2011). The Many Faces of Tau. *Neuron*, 70(3):410–426.
- Mukrasch, M. D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., ir Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue Tau at single residue resolution. *PLoS Biology*, 7(2):0399–0414.
- Murphy, R. M., Walters, R. H., Tobelmann, M. D., ir Bernacki, J. P. (2012). *The Role of Aβ and Tau Oligomers in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease*.
- Necula, M. ir Kuret, J. (2004). Pseudophosphorylation and glycation of tau protein enhance but do not trigger fibrillization in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48):49694–49703.
- Ramachandran, G. ir Udgaonkar, J. B. (2011). Understanding the kinetic roles of the inducer heparin and of rod-like protofibrils during amyloid fibril formation by tau protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45):38948–38959.
- Ramachandran, G., Udgaonkar, J. B., ir Puranik, M. (2014). Resonance Raman Spectroscopic Measurements Delineate the Structural Changes that Occur during Tau Fibril Formation. *Biochemistry*, 3(53):6550–6565.
- Reyes, J. F., Fu, Y., Vana, L., Kanaan, N. M., ir Binder, L. I. (2011). Tyrosine nitration within the proline-rich region of tau in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, 178(5):2275–2285.
- Sabate, R., Rodriguez-Santiago, L., Sodupe, M., Saupe, S. J., ir Ventura, S. (2013). Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 49(51):5745–7.
- Sibille, N., Sillen, A., Leroy, A., Wieruszeski, J. M., Mulloy, B., Landrieu, I., ir Lippens, G. (2006). Structural impact of heparin binding to full-length Tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 45(41):12560–12572.

- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification*, 41:207–234.
- Tolnay, M. ir Probst, a. (1999). REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuropathology and applied neurobiology*, 25(3):171–187.
- Wang, J. Z. ir Liu, F. (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in Neurobiology*, 85:148–175.
- Wang, J. Z., Xia, Y. Y., Grundke-Iqbal, I., ir Iqbal, K. (2012). Abnormal hyperphosphorylation of tau: Sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Advances in Alzheimer's Disease*, 3:123–139.
- Ward, S. M., Himmelstein, D. S., Lancia, J. K., ir Binder, L. I. (2013). Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans*, 40(4):667–671.
- Wegmann, S., Yu, J. J., Chinnathambi, S., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., ir Muller, D. J. (2010). Human tau isoforms assemble into ribbon like fibrils that display polymorphic structure and stability. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35):27302–27313.
- Xu, S., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., ir Lee, V. M. (2011). Characterization of tau fibrillization in vitro. *Alzheimers Dement*, 6(2):110–117.
- Zhang, Y. J., Xu, Y. F., Chen, X. Q., Wang, X. C., ir Wang, J. Z. (2005). Nitration and oligomerization of tau induced by peroxynitrite inhibit its microtubule-binding activity. *FEBS Letters*, 579:2421–2427.

Padėka

Norėčiau padėkoti savo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui, Tomui Šneideriui ir Lina Baranauskienei už suteiktas naudingas žinias ir patarimus.