

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra

Molekulinės biologijos studijų programos magistrantė
Gerda BLANTAITYTĖ

Magistro darbas

**β_2 -mikroglobulino ir $\Delta N6\beta_2$ -mikroglobulino genų konstravimas ir raiška,
rekombinantinių baltymų gryninimas bei jų agregacijos tyrimai**

Darbo vadovas
Dr. Vytautas Smirnovas

Vilnius, 2016

**β_2 -mikroglobulino ir $\Delta N6\beta_2$ -mikroglobulino genų konstravimas ir raiška,
rekombinantinių baltymų gryninimas bei jų agregacijos tyrimai**

Darbas atliktas Biotechnologijos instituto
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Gerda BLANTAITYTĖ

/parašas/

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

/parašas/

Turinys	
Santrumpos	4
Įvadas.....	5
1 Literatūros apžvalga.....	6
1.1 Amiloidinių baltymų apžvalga.....	6
1.2 β_2 -mikroglobulinas.....	6
1.3 β_2 m apykaita.....	8
1.4 Ligos, susijusios su β_2 m.....	9
1.5 β_2 m agregaciją skatinantys veiksniai	11
1.5.1 β_2 m ir kolagenas.....	12
1.5.2 β_2 m ir glikozaminoglikanai	13
1.6 β_2 m ir $\Delta N6\beta_2$ m struktūros įtaka fibrilių susidarymui.....	14
1.7 β_2 m tarpinė forma.....	16
1.8 β_2 m ir $\Delta N6\beta_2$ m agregacijos tyrimai	16
1.8.1 ThT fluorescencija	17
2 Medžiagos ir metodai.....	20
2.1 Naudoti reagentai, laboratoriniai įrenginiai, buferiniai tirpalai.....	20
2.1.1 Medžiagos ir rinkiniai (pagal gamintoją).....	20
2.1.2 Naudota laboratorinė įranga.....	20
2.1.3 Buferiniai tirpalai ir kiti tirpalai	21
2.1.4 Mitybinės terpės ir jų gamyba.....	22
2.1.5 Kitos priemonės	23
2.2 Metodai	23
2.2.1 Rekombinantinių genų klonavimas.....	23
2.2.2 Kompetentinių ląstelių transformacija	26
2.2.3 Bakterijų kultūros auginimas ir baltymo raiškos indukcija.....	26
2.2.4 Baltymo tirpumo įvertinimas	27
2.2.5 Baltymų elektroforezė.....	27
2.2.6 Renatūracija ir gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu.....	28
2.2.7 Fibrilių paruošimas ir jų susidarymo įrodymas.....	30
2.2.8 Fluorescencinė analizė	30
2.2.9 Rekombinantinių β_2 m ir $\Delta N6\beta_2$ m agregacijos tyrimai.....	31
3 Rezultatai ir jų aptarimas	32
3.1 Rekombinantinių β_2 m ir $\Delta N6\beta_2$ m klonavimas ir raiška.....	32
3.2 Rekombinantinių β_2 m ir $\Delta N6\beta_2$ m gryninimas	35
3.2.1 Renatūracija ir jonų mainų chromatografija.....	35
3.3 Rekombinantinių β_2 m ir $\Delta N6\beta_2$ m agregacijos tyrimai.....	40
Priedai.....	46
Literatūra.....	47

Santrumpos

ApE – angl. „A plasmid Editor“ – programa, panaudota kuriant teorinį konstruklą;

Apm – apsisukimai per minutę;

APS – amonio persulfatas;

BMR – branduolių magnetinis rezonansas;

DEAE-sefarozė – dietilaminoetilsefarozė;

dH₂O – dejonizuotas vanduo;

DSA (angl. *dialysis related amyloidosis*) – su dialize susijusi amiloidozė;

DTT – ditioneitolis;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

EtBr – etidžio bromidas;

hβ₂m (angl. *human*) – žmogaus β₂-mikroglobulinas;

IPTG – izopropiltio-β-D-galaktozidas;

MHC I – audinių suderinamumo kompleksas (angl. *major histocompatibility complex*);

NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinis gelis;

O. V. – optiniai vienetai;

Pfu – DNR polimerazė iš *Pyrococcus furiosus*;

PGR – polimerazės grandininė reakcija;

PMSF (angl. *phenylmethylsulfonylfluoride*) – fenilmetilsulfonilfluoridas;

RE – restrikcijos endonukleazė;

SAP – (angl. *shrimp alkaline phosphatase*) šarminė krevečių fosfatazė;

SOC – (angl. *super optimal broth with catabolite repression*) mitybinė terpė;

TAE – Triso-acetato-EDTA buferinis tirpalas;

TEMED – tetrametiletilendiaminas;

ThT – tioflavinas T;

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

WT (angl. *wild type*) – laukinio tipo, arba natyvus;

β₂m – beta-2-mikroglobulinas.

Įvadas

Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 30 žmogaus baltymų ir peptidų, kurie gali agreguoti į amiloidines fibriles ir taip sukelti sunkias žmonių ligas, vadinamas amiloidozėmis (Sipe et al., 2014). Vienas iš tokių sutrikimų – su dialize susijusi amiloidozė (DSA), kurios patogenezėje pagrindinį vaidmenį atlieka baltymas β_2 -mikroglobulinas (β_2m). Taip pat svarbi ir šešiomis aminorūgštimis N gale trumpesnė baltymo forma $\Delta N6\beta_2$ -mikroglobulinas, kurio amiloidinėse nuosėdose DSA ligos atveju gali būti net 30 %. β_2m yra MHC I komplekso lengvoji grandinė ir normaliomis sąlygomis yra lengvai pašalinamas per inkstus. Tačiau esant inkstų nepakankamumui pacientams vykdoma nuolatinė dializė - dirbtinis kraujo valymo būdas per pusiau pralaidžią membraną, pro kurią β_2m nedifunduoja ir pradeda kauptis organizme. Ilgainiui (maždaug per 10 metų) pasireiškia šio nereikalingo kaupimosi padariniai – susidaro sankaupos griaučių sistemoje, dėl kurių išsivysto riešo kanalo sindromas, destruktvyvi artropatija, lūžta kaulai. Surinkta labai daug duomenų apie šią ligą ir β_2m bei $\Delta N6\beta_2m$ vaidmenį joje, tačiau nepaisant to, dar labai nedaug yra žinoma apie β_2m fibrilių agregacijos mechanizmą molekulinio lygmeniu.

Darbo tikslas: pagaminti rekombinantinių β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ baltymų amiloidines fibriles.

Darbo uždaviniai:

1. Sukurti pET21b- β_2m ir pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ genetinius konstruktus;
2. Ekspresuoti rekombinantinius β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ baltymus *E. coli* ląstelėse;
3. Išgryninti baltymus;
4. Patikrinti, kokiomis sąlygomis šie baltymai agreguoja į amiloidines fibriles.

1 Literatūros apžvalga

1.1 Amiloidinių baltymų apžvalga

Terminas „amiloidas“ pirmiausiai buvo naudojamas botanikos terminologijoje, bet vėliau Virchovas pritaikė šį pavadinimą amiloidiniams kūneliams (lot. *corpora amyloacea*) smegenyse bei sisteminės amiloidozės nuosėdoms audiniuose apibūdinti. Dabar terminas dažniausiai naudojamas natūraliai atsirandančioms arba sintetinėms baltymų fibrilėms, turinčioms amiloidinių savybių, apibūdinti (Sipe et al., 2014).

Amiloidiniai baltymai yra tokie baltymai, kurie gali agreguoti į netirpias fibriles. Tai yra vienas po kito sekančių pokyčių baltymų susilankstyme rezultatas. Amiloidai audiniuose nusėda kietų ir ilgų fibrilių, kurių diametras – apie 10 nm, pavidalu. Fibrilės susidaro iš paprastesnių vienetų, vadinamų protofilamentais, bei filamentų, susipinančių į amiloidinėms fibrilėms būdingas struktūras (panašiai kaip suvejama virvė). Nors amiloidines ligas sukeliančių baltymų aminorūgščių sekos ir struktūros skiriasi, amiloidinėms fibrilėms yra būdinga bendra ir tvarkinga struktūra, kurioje β juostos yra statmenos fibrilės ašiai (Sunde et al., 1994). Amiloidinių fibrilių identifikavimui naudojamas Kongo raudonasis dažas, kuriam prisijungus prie fibrilių yra matomas charakteringas absorbcijos spektro poslinkis, o poliarizuotoje šviesoje galima matyti žalios, geltonos ar oranžinės spalvos dvejoją šviesos lūžimą. Taip pat amiloidinių fibrilių detekcijai yra naudojamas amiloidams specifinis fluorescencinis dažas tioflavinas T (ThT), kuris sugeria 440 nm bangos ilgio šviesą, o išspinduliuoja 480 nm (Sipe et al., 2014).

1.2 β_2 -mikroglobulinas

1968 metais Berggard ir Bean pirmieji izoliavo mažos molekulinės masės (11,8 kDa) baltymą β_2 -mikroglobuliną (toliau – β_2m). β_2m pirminę struktūrą 1976 metais nustatė Cunninghamas – baltymas sudarytas iš 99 aminorūgščių (Cunningham, 1976) (β_2m ir toliau tekste nagrinėjamo $\Delta N6\beta_2$ -mikroglobulino ($\Delta N6\beta_2m$) aminorūgščių sekos pateiktos 1 pav.). Tolesni baltymo tyrimai parodė, kad jis labai svarbus ląstelių imunologijoje - eksponuojamas kartu su MHC klasės I tipo kompleksu. 1985 metais mokslininkai Becker ir Reeke ištyrė β_2m molekulės tretinę struktūrą ir parodė, kad ji sudaryta iš β klosčių (Becker ir Reeke, 1985) (2 pav.). Kompiuterinės grafikos metodais išanalizavus β_2m molekulės paviršiaus struktūrą buvo

nustatyta, kad hidrofobinės aminorūgštys labiausiai išsidėsčiusios molekulės centrinėje dalyje, o ją supa bazinės aminorūgštys (Yokoyama et al., 1989).

β_2m	MIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLL YYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM
$\Delta N6\beta_2m$	MIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFT PTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM

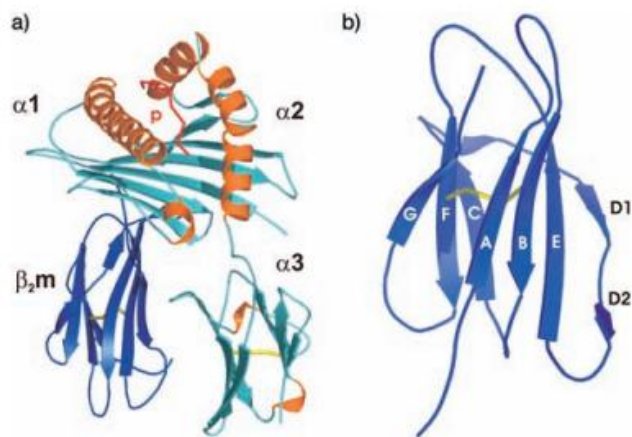
1 pav. Žmogaus β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ (šešiomis aminorūgštimis N gale trumpesnė β_2m forma) aminorūgščių sekos su įvestomis metionino aminorūgštimis N gale (PDB: atitinkamai, 1LDS ir 2XKU).



2 pav. β_2m tretinė struktūra (PDB prieiga: 2YXF). Žalios spalvos rodyklės – β struktūros, raudonai pažymėtas N galinis peptidas iš šešių aminorūgščių, kurio nėra $\Delta N6$ formoje, ir trys toliau tekste aptariamos aminorūgštys: Pro32, Trp60 ir Asp76.

β_2m priklauso imunoglobulinų superšeimos baltymams, o jiems būdinga β -sumuštinio struktūra. β_2m baltyme ši struktūra sudaryta iš 7 β juostų. Dvi iš jų jungia disulfidinis ryšys (Cys25-Cys80), kuris yra konservatyvus imunoglobulinų superšeimoje ir stabilizuoja β_2m tretinę struktūrą (Radford et al., 2005). Disulfidinis tiltelis yra ir *ex vivo* β_2m fibrilėse (Bellottiet al., 1998) bei yra būtinas amiloidinių β_2m fibrilių susidarymui *in vitro* (Smith ir Radford, 2001; Ohhashi et al., 2001).

β_2m yra MHC I klasės komplekso lengvoji grandinė, o MHC I klasės kompleksas yra integralusis membraninis baltymas, dalyvaujantis imuniniame atsake (Relini et al., 2006). Tokių molekulių yra visų branduolį turinčių ląstelių paviršiuje (Yomomoto et al., 2000). MHC I klasės kompleksas ir monomerinis β_2m pavaizduoti 3 paveiksle (atitinkamai, a ir b). Lengvoji grandinė nekovalentiniu ryšiu jungiasi su sunkiąja MHC I klasės komplekso grandine. Nors β_2m neturi jokio tiesioginio kontakto su antigeniniu peptidu (3 pav. (a) prisijungęs peptidas p nesąveikauja su β_2m), tačiau yra būtinas teisingo komplekso susidarymui (Hill et al., 2003).



3 pav. MHC I klasės komplekso kristalinė struktūra (a) ir monomerinio žmogaus β_2m branduolių magnetinio rezonanso (toliau – BMR) struktūra (b). Pavaizduoti MHC I klasės komplekso atskiri subvienetai ($\alpha 1$ -3), prisijungęs peptido fragmentas (p, raudonai) ir natyvaus β_2m β klostės. PDB: 1UVQ (a) ir 1JNJ (b)).

1.3 β_2m apykaita

β_2m sintetina visos branduolį turinčios ląstelės (Yomomoto et al., 2000), ypač limfocitai ir makrofagai (Svatonova et al., 2014). Sintezės greitis paprastai yra 2 - 4 mg kilogramui per dieną, o kiekis per pusę sumažėja per 2,5 val. Koncentracija plazmoje svyruoja nuo 1 iki 3 mg/ml (Floege ir Ketteler, 2001) ir atspindi ląstelės apykaitos bei jos membranos atsinaujinimo greičius (Svatonova et al., 2014). Katabolizmo metu β_2m disocijuoja nuo MHC I klasės komplekso ir pernešamas į inkstus, kur didžioji jo dalis (apie 95 %) yra suskaldoma ir pašalinama (Relini et al., 2006; Coppolino et al., 2014). β_2m yra nedidelis baltymas, todėl yra filtruojamas per inkstų glomerulų membranas ir beveik visiškai reabsorbuojamas proksimaliniuose kanalėliuose (Orlando et al., 1998). Įvairių patologijų atveju, β_2m nepašalinamas iš kraujo serumo, dėl to jo koncentracija didėja (Floege ir Ketteler, 2001; Ohhashi et al., 2005).

1.4 Ligos, susijusios su β_2m

β_2m kiekis kraujo serume ir šlapime gali kisti įvairių patologijų atveju. Serume padidėjęs β_2m kiekis yra aktyvuoto ląstelinio imuninio atsako žymuo, kai kurių piktybinių navikų atveju (pvz., mielomos, ne Hodžkinso limfomos) - ir vėžio markeris (Shrout et al., 2008). β_2m kiekis serume gali kisti sergant inkstų ligomis (pvz., inkstų nepakankamumu), nes 95 % šio baltymo pašalinama būtent per inkstus (Coppolino et al., 2014). β_2m gali suformuoti ilgas baltymų grandines, kurios sudaro sankaupas skeleto sistemoje (Kwon et al., 2011; Mangione et al., 2013). Padidėjusi baltymo koncentracija šlapime dėl sumažėjusios reabsorbcijos parodo inkstų kanalėlių pažeidimą (Nolen et al., 2013).

Patologija gali būti genetinės kilmės, kai heterozigotiniams nešiotojams su D76N (asparto rūgštis 76-oje padėtyje pakeista asparaginu) β_2m baltymo mutacija amiloidinės nuosėdos susidaro išskirtinai tik vidaus organuose. Įdomu tai, kad sergant šia liga kauluose ir raiščiuose neaptinkama jokių amiloidinių nuosėdų, nors baltymo tropizmas kolagenui yra gerai žinomas ir ištirtas (Stoppini et al., 2015) (plačiau - 1.5.1 sk.). Be to, tokiose amiloidinėse nuosėdose nerandama nei laukinio tipo (toliau – WT) β_2m , nei $\Delta N6\beta_2m$, tik β_2m baltymai su D76N mutacija (Valleix et al., 2012).

Labai įdomus β_2m vaidmuo yra ir daugelio vėžių (ypač prostatos) atveju, nes buvo parodyta, kad vėžinių ląstelių proliferacija gali būti slopinama antikūnais ir maža interferuojančia RNR, kurie nukreipti prieš β_2m ekspresiją (pvz., antikūnai prieš β_2m sukelia vėžinių ląstelių apoptozę) (Mink et al., 2010).

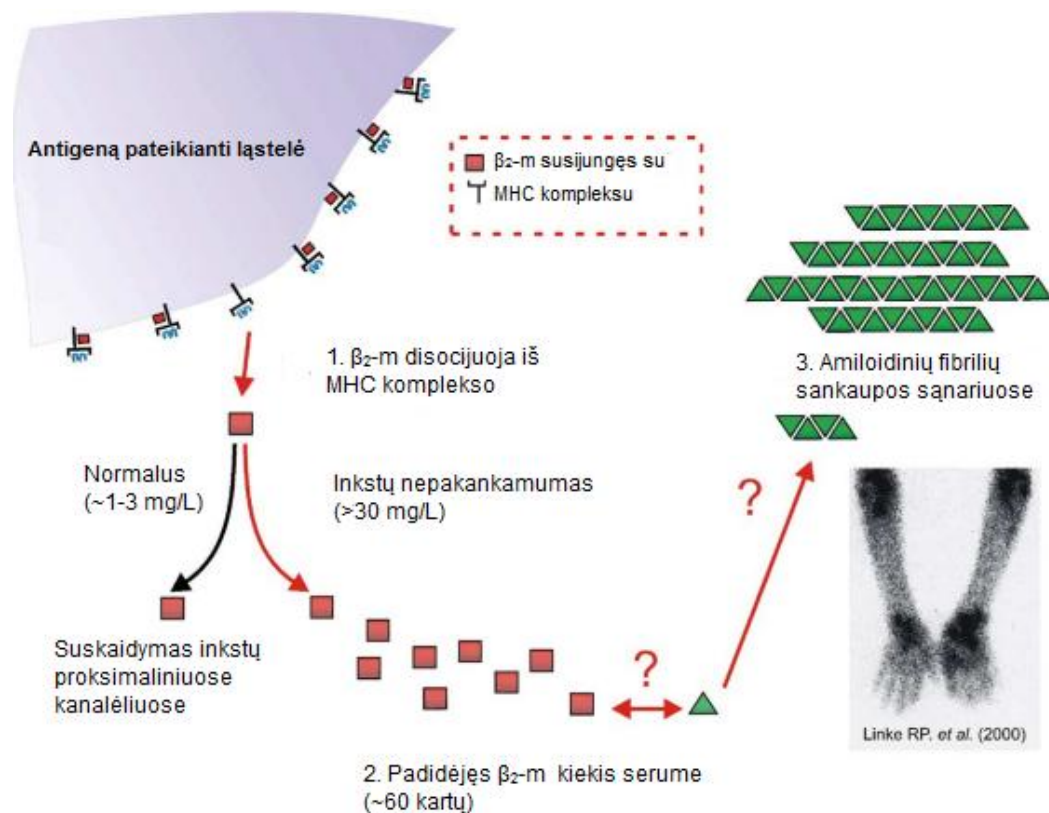
Visgi daugiausia literatūros sukaupta apie β_2m vaidmenį DSA. Tai liga, kuri yra daugelio veiksnių padarinys, tačiau pradžia duoda inkstų nepakankamumas, t.y., inkstai praranda 85 – 90 % funkcijos, kuri yra gyvybiškai svarbi, nes medžiagos, kurios turėtų būti pašalintos per inkstus, pradeda kauptis organizme ir taip sutrikdo jo veiklą. Jei inkstai netransplantuojami, vykdoma dializė, t.y., dirbtinis kraujo valymo būdas, pagrįstas pusiau laidžių membranų veikimo principu, kai vienoje membranos pusėje yra kraujas (plazma), o kitoje – dializės tirpalas. Dializė yra svarbiausias pakaitinės inkstų terapijos metodas. Dėl difuzijos per membraną, selektyviai praleidžiančią molekules, pašalinamos atliekos, druskos ir perteklinis vanduo, taip pat palaikomas natrio, kalio ir bikarbonato jonų balansas, kontroliuojamas kraujo spaudimas. β_2m nepraeina per dializės membraną, kaupiasi, ir jo koncentracija kraujo plazmoje ilgainiui gali padidėti 25-35 kartus, ar net iki 50 kartų (Yomomoto et al., 2000; Ohhashi et al., 2005). Ilgą

laiką vykdant dializę (10 metų ir ilgiau), iš natyvių β_2m baltymų susiformuoja patogeninės amiloidinės fibrilės, kurios kartu su kitomis makromolekulėmis sudaro sankaupas audiniuose (McParland et al., 2000). Jų pagrindinis struktūrinis komponentas yra baltymas β_2m (Chiba et al., 2003), bet nemažą dalį (apie 30 %) sankaupų sudaro sutrumpinta $\Delta N6\beta_2m$ baltymo forma (Esposito et al., 2008). Tai yra šešiomis aminorūgštimis N gale trumpesnė β_2m baltymo forma, ir nors modifikacija atrodo nedidelė, tačiau ji daro didelę įtaką baltymo savybėms, ypač amiloidiškumui (Su et al., 2014). Klinikiniai šios ligos simptomai yra riešo kanalo sindromas, destruktivi artropatija, patologiniai kaulų lūžiai, ir kt. (Kozhukh et al., 2002). Ypač rimtos komplikacijos pasireiškia pacientams dėl ilgalaikės hemodializės (įprastai vykdant hemodializę daugiau nei 10 metų, rimtos komplikacijos pasireiškia daugiau nei 90 % visų pacientų) (Chiba et al., 2003), o β_2m amiloidinės sankaupos gali būti identifikuojamos praėjus 18 mėnesių nuo ligos pradžios.

β_2m amiloido patologijos dažnai siejamos su sumažėjusiu pH audiniuose: pastebėta, kad sąnarių skysčio pH vertės esant įvairios kilmės sąnarių uždegimams gali būti žemesnės (apie 6,3 – 6,4), kuomet normaliomis sąlygomis pH yra apie 7,7 (Cummings ir Nordby, 1966; Piazza et al., 2006). Didelis β_2m afiniškumas kolagenui lemia nuosėdų susidarymą daugiausia skeleto sistemoje (Linke et al., 2000). Baltymas pamažu kaupiasi, suformuoja ilgas β_2m baltymų grandines ir su kitais ląsteliniiais komponentais sudaro sankaupas sinovijos skystyje, sąnariuose, sausgyslėse, kauluose, alkūnėse ir riešuose (4 pav.) (Svatonova et al., 2014; Stoppini et al., 2015), vidaus organuose (D76N mutacijos atveju) (Valleix et al., 2012).

4-ame paveiksle pavaizduotas β_2m fibrilogenozės kelias nuo antigenų pateikiančios ląstelės paviršiaus MHC I komplekse iki jo amiloidinių fibrilių sankaupų susidarymo sąnariuose ir alkūnėse (tamsesnės zonos scintigrafijos nuotraukoje). Tai yra ^{111}In izotopu žymėto β_2m sankaupos. Izotopu pažymėtas β_2m sušvirkščiamas į veną, susitelkia į sankaupas ir išspinduliuoja γ spindulius, kurie detektuojami γ kameros, o kompiuterinė programa sukuria tiriamos vietos vaizdą. Tamsesnės vietos nuotraukoje parodo, kad čia susikaupia daugiau radioaktyviųjų medžiagų, o tai tuo pačiu patvirtina β_2m baltymo tropizmą kolagenui (Linke et al., 2000).

Nors didelė β_2m koncentracija yra būtina sąlyga vystytis DSA, tačiau nėra jokios koreliacijos tarp ligos sunkumo ir β_2m kiekio. Nors atlikta daug tyrimų, kaip amiloidinės fibrilės susirenka į sankaupas *in vivo* sergant šia liga, nėra žinoma (Ban et al., 2006).



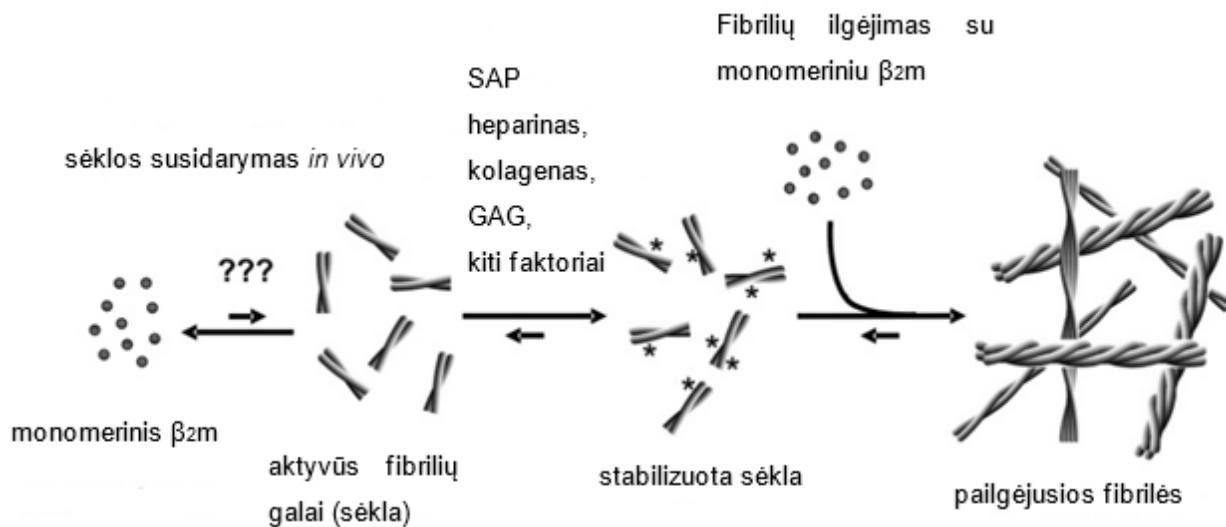
4 pav. Schematinė diagrama, apibendrinanti DSA ligos vystymosi eigą, kurios metu iš natyvaus β_2m susdaro amiloidininės fibrilės. Žemiau dešinėje: DSA sergančio žmogaus scintigrafijos nuotrauka, matomos β_2m amiloidinių fibrilių sankaupos alkūnėse ir riešuose. Pritaikyta pagal Linke et al. (2000) ir Radford et al. (2005).

1.5 β_2m agregaciją skatinantys veiksniai

β_2m turi natyvią konformaciją, kai aplinkos pH yra ~ 7 . Tyrimuose *in vitro* naudojamos biologinės molekulės, tokios kaip glikozaminoglikanai (toliau – GAG), lizofosfolipidai (Ookoshi et al., 2008), proteoglikanai, kolagenas, heparinas, (Yamamoto et al., 2004; Sipe, 2005; Platt ir Radford, 2009). Manoma, kad kai kurios biologinės molekulės gali stabilizuoti β_2m amiloidines fibriles ir tokiu būdu padidinti *in vitro* fibrilių išėigą (5 pav.) (Relini et al., 2008).

Siekiant skatinti amiloidinių fibrilių susidarymą *in vitro* nenaudojant biologinių molekulių, galima keisti pH, naudoti natrio dodecilsulfatą (toliau – NDS) (Yamamoto et al., 2004), pakeisti fizikinę aplinką ultragarsinimu (Ohhashi et al., 2005), reakcijas vykdyti aukštesnėje temperatūroje ir maišyti ar kratyti reakcijos mišinį skirtingose druskų koncentracijose (Platt ir Radford, 2009). Išvardytos sąlygos gali skatinti tarpinės būsenos

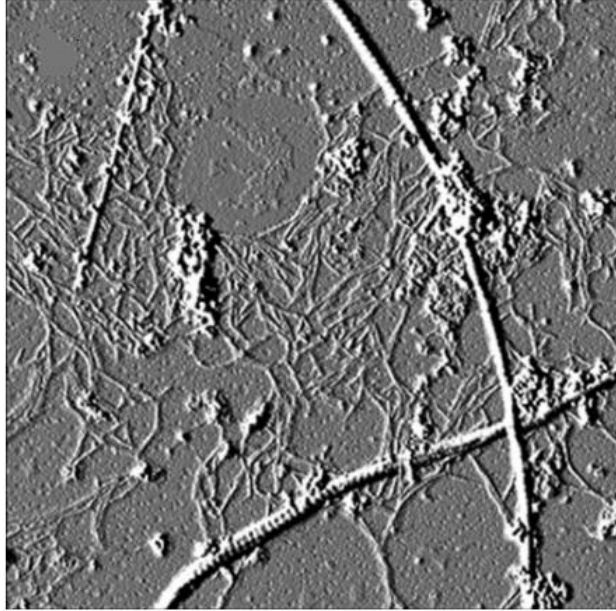
susidarymą (I_T) (plačiau 1.7 skyrelyje), kuri, manoma, yra reikalinga amiloidinių fibrilių susidaryme bei jų ilgėjime (Yamamoto et al., 2000).



5 pav. Biologinės molekulės, galinčios turėti įtakos *in vivo* amiloidinių fibrilių formavimesi neutraliame pH. Šios molekulės gali prisijungti prie „sėklos“ (aktyvių fibrilių galų) ir ją stabilizuoti, tokiu būdu atverdami paviršių ilgėjimo reakcijoms su monomeriniu β_2m . Pritaikyta pagal Myers et al. (2006).

1.5.1 β_2m ir kolagenas

β_2m dažniausiai kaupiasi skeleto sistemoje, dėl tropizmo kolagenui (išskyrus β_2m su D76N mutacija (Valleix et al., 2012)). Manoma, kad ši sąveika pagrįsta tuo, jog kolagenas turi teigiamai įkrautų sričių savo paviršiuje, su kuriomis ir sąveikauja baltymas. *In vitro* ši sąveika buvo parodyta tiriant I ir II tipo kolageno įtaką β_2m amiloidogeniškumui (Relini et al., 2006). 6 paveikslėlyje pavaizduotos β_2m amiloidinės fibrilės, kurios sudaro tinklą, jungiantį I tipo kolageno fibriles. β_2m oligomerai ir GAG padeda augti fibrilėms kolageno paviršiuje (Relini et al., 2008).



6 pav. β_2m , inkubuoto su fibriliniu kolagenu ir heparinu ($37^\circ C$, pH 6,4, 24 val.) atominės jėgos mikroskopijos nuotrauka. Fibrilių tinklas jungia izoliuotas kolageno fibriles. Galima matyti ir nefibrilinius agregatus. Skenavimo dydis – $5,7 \mu m$ (Relini et al., 2008).

Parodžius, kad $\Delta N6\beta_2m$ gali suformuoti amiloidines fibriles *in vitro*, fibrilogenezės metodai pasistūmėjo iki biologiškai labiau *in vivo* atitinkančių sąlygų, nes anksčiau *in vitro* tyrimuose įvairios makromolekulės nebuvo naudojamos. Giorgetti et al. (2005) tyrė įvairias β_2m izoformas ir parodė, kad $\Delta N6\beta_2m$ turi didesnę afiniškumą kolagenui nei β_2m . Tokį afiniškumą bandyta paaiškinti tuo, kad β_2m baltymo neutraliame pH bendras krūvis yra -2,4, o $\Delta N6\beta_2m$ krūvis -4,3. Taip pat parodyta, kad *in vitro* „mėgdžiojant“ uždegimo metu sąnariuose esančias sąlygas (pH, temperatūrą) bei naudojant fibrilinį kolageną, vyksta β_2m fibrilogenezė; nesant kolageno, fibrilės nesusidaro. Tai parodo, kad kolagenas yra būtinas susidarant β_2m amiloidinėms fibrilėms ir paaiškina β_2m specifiškumą būtent skeleto sistemos audiniams (Giorgetti et al., 2005).

1.5.2 β_2m ir glikozaminoglikanai

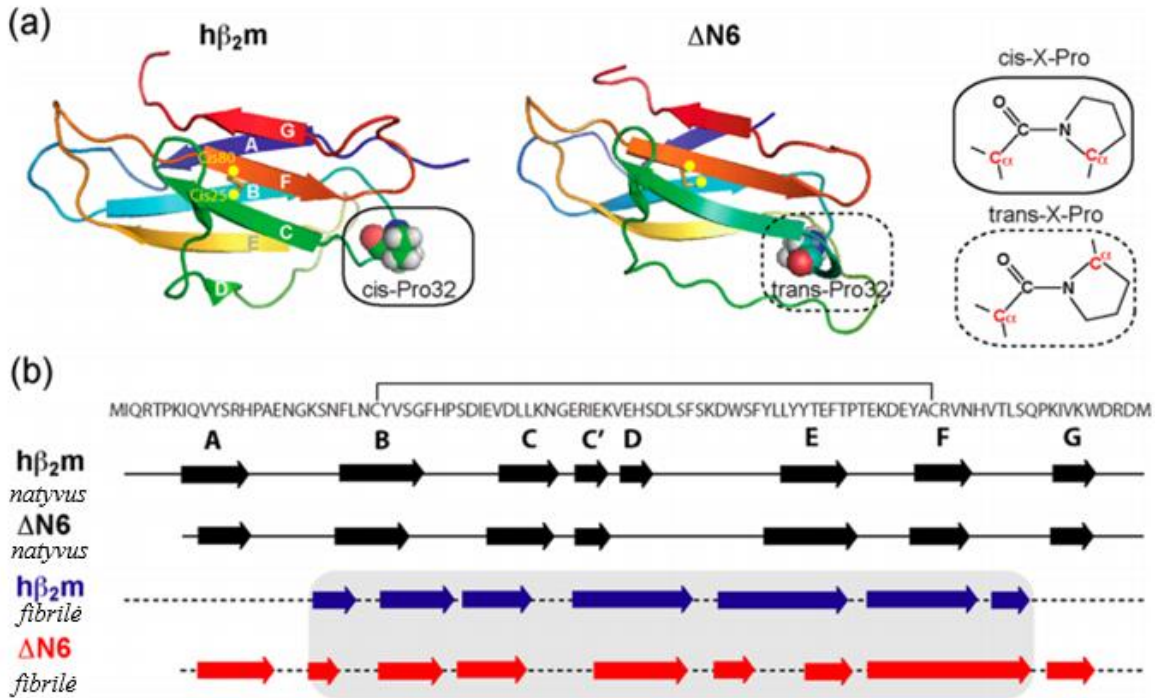
Kolagenas yra ne vienintelis β_2m bei $\Delta N6\beta_2m$ molekulinis taikiny. GAG gali elgtis panašiai kaip kolagenas, nes taip pat yra amiloidinių sancaupų komponentai. *In vitro* tyrimuose parodyta, kad GAG gali skatinti amiloidinių baltymų branduolių susidarymą, padėti susiformuoti fibrilėms bei jas stabilizuoti. Iš visų GAG labai aktualus heparinas, kurį sergantieji DSA vartoja kaip antikoagulantą (Relini et al., 2008). Ohhashi et al. (2002) nustatė, kad sąveika tarp β_2m ir

heparino yra tokia pati, kaip β_2m ir kolageno ($K_d = 1 \times 10^{-5} M$), vadinasi, jis yra pozityvus fibrilogenezės efektorius, kaip ir kolagenas. Taip pat buvo parodyta, kad heparinas slopina β_2m fibrilių depolimerizaciją *in vitro* (Yamaguchi et al., 2003) bei skatina jau suformuotų fibrilių ilgėjimą (Yamamoto et al., 2004; Myers et al., 2006). Paveikus heparinu $\Delta N6\beta_2m$ baltymą, skatinamas amiloidinių fibrilių formavimasis net fiziologiniuose buferiniuose tirpaluose (Borysik et al., 2007).

1.6 β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ struktūros įtaka fibrilių susidarymui

Nustatyta, kad β_2m disulfidinis ryšys (Cys23-Cys80) nėra reikalingas MHC I klasės komplekso susidarymui, tačiau būtinas amiloidinėms fibrilėms žemame pH suformuoti (Ohhashi et al., 2002). Redukuotas β_2m nesuformuoja tiesių amiloidinių fibrilių, kurias suformuoja baltymo oksiduota forma. Vietoj to, suformuojami ploni filamentai, kurie gali susijungti ir suformuoti fibrilę iš kelių subvienetų (Chiba et al., 2003). Vadinasi, β_2m disulfidinis ryšys yra būtinas fibrilių susidarymui, taip pat yra baltymo amiloidiškumą apsprendžiantis veiksnys.

Naudojant įvairius $^{13}C/^{15}N$ žymėjimo ir BMR metodus, Su ir Sarel komanda nustatė β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ amiloidinių fibrilių β struktūrų domenų. Nustatyta, kad β_2m fibrilių β klosčių regionas apima apie 70 aminorūgščių, pasiskirsčiusių 7-iose β juostose, tuo tarpu $\Delta N6\beta_2m$ fibrilės turi 2 papildomas (iš viso 9) β juostas, tad β klosčių regionas apima 87 aminorūgštis (7 pav. b). Taip pat buvo parodyta, kad amiloidinėms β_2m fibrilėms iš monomerinio baltymo susidaryti būtina *cis-trans* izomerizacija, kuri nebūdinga $\Delta N6\beta_2m$ baltymo formai, nes Pro32 tiek natyvioje formoje, tiek fibrilėse yra *trans* konformacijoje (7 pav. a). Mažiau judrūs sutrumpinto baltymo galai (dėl papildomų β klosčių abiejuose galuose), *trans* Pro32 konformacija monomeriniame baltyme ir fibrilėse paaiškina $\Delta N6\beta_2m$ gebėjimą greičiau suformuoti fibriles (Su et al., 2014). Radford mokslinė grupė tyrinėjo $\Delta N6\beta_2m$ baltymo struktūrines savybes ir jo gebėjimą paversti WT β_2m į amiloidines fibriles. Jie parodė, kad kai Pro32 yra *cis* konformacijoje, β_2m yra „apsaugomas“ nuo spontaninės agregacijos, tuo tarpu *trans* konformacija padidina β_2m agregatyvumą (Eichner et al., 2011; Su et al., 2014).



7 pav. (a) β_2m (PDB: 2XKS) ir $\Delta N6\beta_2m$ (PDB: 2XKU) monomerų natyvioje formoje β -sumuštinio struktūros. Skirtingos Pro32 *cis* ir *trans* konformacijos pažymėtos apibrauktuose langeliuose. (b) Aukštai – β_2m baltymo aminorūgščių seka, stogeliu išskiriama aminorūgščių seka, sudaranti baltymo šerdį. Žemiau – β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ natyvios formos bei fibrilių šerdis sudarančių β klosčių palyginimas. Pritaikyta pagal Su et al. (2014).

Mutacijos ir modifikacijos gali skatinti WT β_2m baltymą sudaryti fibriles neutraliame pH. Konkrečiai, N galo trumpinimas šešiomis aminorūgštimis ($\Delta N6\beta_2m$), taip pat mutacija šiame regione (P5G) arba B/C ar D/E kilpose (P32A, P32G, D59P) (7 pav. (a)). Visos šios modifikacijos padidina baltymo gebėjimą suformuoti amiloidines fibriles *in vitro*, t.y., inicijuoja dalinį β_2m išsilankstymą, tokiu būdu polipeptidinės sekos regionai, skatinantys agregaciją, atveriami ir dalyvauja tarpmolekulinėse sąveikose. Buvo tikrinama ir daugiau mutacijų, tačiau kitur įvestos jos neturėjo didelės įtakos baltymo amiloidogeniškumui (Platt ir Radford, 2009).

Kita baltymo struktūrai svarbi aminorūgštis, Trp60, yra baltymo D ir E β struktūras jungiančioje kilpoje. Trp 60 vaidmuo dvejopas: jis yra būtinas β_2m sąveikai su MHC I klasės komplekso sunkiąja grandine (Esposito et al., 2008), tačiau taip pat turi destabilizuojantį, proamiloidogeninį efektą (manoma, dėl to, kad laisvame (ne komplekse) β_2m baltyme Trp60 yra nukreiptas į išorę), su sąlyga, kad β_2m koncentracija plazmoje yra pakankamai didelė (Stoppini et al., 2015). Įvedus mutaciją Trp60Gly (t.y., triptofanas 60-oje padėtyje pakeistas glicinu), padidėja natyvios būsenos stabilumas ir sumažinama galimybė baltymui agreguoti neutraliame

pH (Esposito et al., 2008). Pašalinus hidrofobinę šoninę grupę ne tik sumažinamas agregacijos potencialas, bet kartu sumažinamas įtempimas kilpoje (esančioje šalia aromatinių pakaitų); tokiu būdu natyvi būseną yra stabilizuojama ir agregacija nevyksta (Platt ir Radford., 2009).

1.7 β_2m tarpinė forma

β_2m 32-oje padėtyje įvedus gliciną arba valiną (mutacijos žymimos Pro32Gly ir Pro32Val), baltymas suformuoja į natyvią formą panašią tarpinę I_T būseną, kuriai pereinant į natyvią formą susidaro *trans* Pro32 ryšys. Tokios tarpinės būsenos santykinis pagausėjimas yra susijęs su baltymo gebėjimu ilginti β_2m fibrilių galus. Teigiama, kad *trans* Pro32 yra svarbus β_2m amiloidinių fibrilių branduolio susidarymui neutraliame pH, nes Pro32Gly ir Prp32Val mutantai, kurie formuoja *trans* Gly32 ir Val32, į amiloidines fibriles spontaniškai neagreguoja, nors Pro32Gly tam tikromis sąlygomis gali efektyviai dalyvauti fibrilių ilgėjimo procese. Pro5Gly mutacija ir $\Delta N6\beta_2m$ taip pat turi įtakos Pro32 peptidinio ryšio izomerizacijai, skatindami I_T tarpinės būsenos susidarymą, dėl ko gali susidaryti fibrilių užuomazgos neutraliame pH (Platt ir Radford, 2009).

Tarpinės būsenos struktūros tyrimai padėjo nustatyti galimus β_2m agregacijos neutraliame pH mechanizmus. β_2m susilankstymo realaus laiko BMR parodė, kad regionai, kurie yra toliau nuo Pro32, tarpinėje būsenoje išlaiko savo struktūrą, tuo tarpu regionai, esantys netoli Pro32 B/C kilpoje, yra judresni, kol įvyksta Pro32 izomerizacija iš *cis* į *trans*. Pro32 mutantų kristalografijos duomenys parodė, kad I_T konformerai lemia aromatinių ir hidrofobinių aminorūgščių šoninių grupių reorganizaciją baltymo šerdyje. Tokiu būdu baltymo paviršiuje atveriamas eilė hidrofobinių pakaitų, kuri gali skatinti baltymų agregaciją. Be to, struktūriniai pakitimai lemia aminorūgščių 52-56 padėtyse reorganizaciją, dėl kurių dingsta β išsikišimas (*β -bulge*), įprastai esantis D grandinėje ir neleidžiantis agreguoti kraštinėms β struktūroms. Be to, tokia tarpinė būseną iškristalizuojama kaip dimeras, o tai parodo šios tarpinės būsenos potencialą suformuoti tarpmolekulines sąveikas (Chiti et al., 2001; Platt ir Radford, 2009).

1.8 β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ agregacijos tyrimai

Naudojantis algoritmais, padedančiais nuspėti baltymų sekų amiloidiškumą, buvo nustatyta, kad apie 60 % β_2m sekos yra labai amiloidogeniška (Platt ir Radford, 2009). Tačiau β_2m amiloidiškumas yra apspręstas ne tik aminorūgščių sekos, nes neutraliame pH *in vitro* baltymas neagreguoja (net esant didelėms β_2m koncentracijomis (Ono ir Uchino, 1994)), nebent gali

spontaniškai agreguoti į tirpius oligomeras (Piazza et al., 2006; Belloti ir Chiti, 2008). Kad agreguotų, baltymas turi bent dalinai išsilankstyti *in vivo*, jog būtų eksponuojamas bent vienas agregacijai imlus sekos regionas. Dėl šių priežasčių β_2m fibrilių susidarymas *in vitro* inicijuojamas destabilizuojant baltymą, pvz., denatūrantais, taip paskatinant agregacijos procesą biofizikiniams tyrimams patogia trukme (Platt ir Radford, 2009).

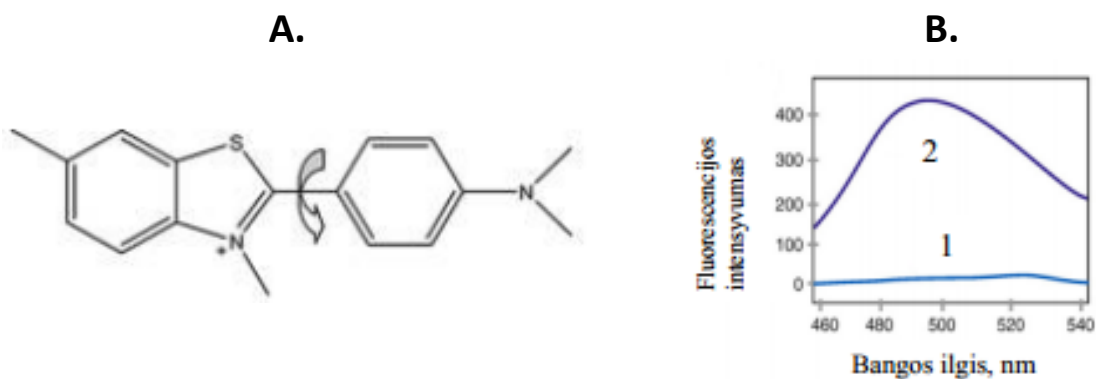
Dėl savo nedidelio dydžio (11,8 kDa) β_2m yra tinkamas įvairiems fizikocheminiams tyrimams. β_2m gali būti paverstas į amiloidines fibriles nuo branduolio priklausomo fibrilių augimo metu naudojant *ex vivo* fibriles kaip sėklą (Naiki et al., 1997) arba *in vitro* spontaninės agregacijos metu suformuotas fibriles (Platt ir Radford, 2009). Abiem atvejais suformuotos fibrilės turi amiloidams būdingus žymenis. Tiek *ex vivo*, tiek *in vitro* suformuotos fibrilės yra labai panašios ir turi pakankamai homogenišką morfologiją. Tai privalumas analizuojant biochemines ir biofizikines β_2m amiloidinių fibrilių savybes (Chatani ir Goto, 2005; Ban et al., 2006).

Kaip jau minėta, $\Delta N6\beta_2m$ taip pat randamas amiloidinių fibrilių nuosėdose DSA ligos atveju. 6 aminorūgščių pašalinimas β_2m baltymo gale turi didžiulį poveikį ne tik struktūrai ar aukščiau aptartam amiloidogeniškumui, bet ir stabilumui. Trumpesnis baltymas greičiau agreguoja (Esposito et al., 2000). Priešingai nei β_2m , $\Delta N6\beta_2m$ gali greitai suformuoti fibriles fiziologinėmis sąlygomis. Manoma, kad tai yra pagrindinis veiksnys ligos patogenezėje. Pakanka nedidelės $\Delta N6\beta_2m$ koncentracijos, kad formuotųsi agregatai (Piazza et al., 2006; Stopponi et al., 2015).

Eksperimentų, kurių metu vykdomos nuo sėklos priklausomos ilgėjimo reakcijos, rezultatai yra pakankamai gerai atsikartojantys ir tinkantys charakterizuoti β_2m amiloidinių fibrilių kinetiką (Chiba et al., 2003). Taip suformuotos amiloidinės fibrilės yra nestabilios neutraliame pH, nes nėra ląstelinių komponentų, galinčių jas stabilizuoti.

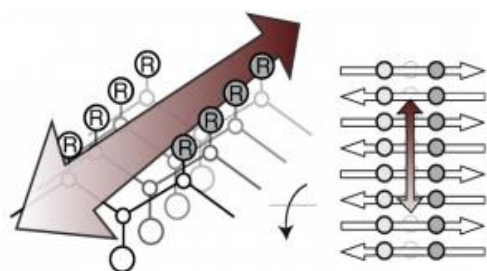
1.8.1 ThT fluorescencija

Amiloidinių fibrilių struktūrinių savybių bei kinetikos analizei yra sukurtas platus spektras savitų molekulinų žymenų, iš kurių dažniausiai naudojamas ThT dažas (Hudson et al., 2009; Biancalana ir Koide, 2010). Tai benzotiazolo dažas, naudojamas baltymų agregacijos biofizikiniuose tyrimuose kaip fluorescuojanti molekulinė žymė (sužadavimo bangos ilgis – 440 nm, emisijos – 490 nm) (Hudson et al., 2009). Šio dažo cheminė struktūra pateikta 8 pav. A.



8 pav. A – ThT cheminė struktūra. Dažas turi hidrofobinę dalį (fenilo grupė prijungta prie dimetilamino grupės) ir polinę benzotiazolo grupę. Tokia polinės ir hidrofobinės dalies kombinacija leidžia ThT molekulėms prisijungti prie amiloidinių fibrilių vandeniniuose tirpaluose. **B** – fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo bangos ilgio, kai ThT neprisijungęs prie fibrilių (1 kreivė) ir prisijungęs (2 kreivė) (Biancalana ir Koide, 2010; Amdursky et al., 2012).

Manoma, kad fluorescencijos intensyvumo padidėjimas yra selektyvios ThT imobilizacijos pasekmė (fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo bangos ilgio pateikiama 8 pav. B). ThT elgiasi kaip molekulinis rotorius: tirpale žemas energijos barjeras leidžia benzilamino ir benzotiazolo žiedams laisvai sukis apie jų bendrą C-C ryšį (8 pav. A pažymėta rodykle). Toks sukimasis „gesina“ sužadintas būsenas, tai lemia nedidelę ThT fluorescencijos emisiją. Susidariusios amiloidinės fibrilės „sukuria“ ThT surišimo vietą; ThT imobilizacija užfiksuoja sužadintą būseną, o tai lemia fluorescencijos intensyvumo padidėjimą (Biancalana ir Koide, 2010).



9 pav. ThT prisijungimo prie fibrilių β struktūrų „kanalo“ modelis. ThT jungiasi išilgai šoninių grandinių suformuoto „kanalo“ paviršiaus.

Nepaisant ThT dažo populiarumo, jo veikimo principas nėra visiškai aiškus. Siūlomi keli modeliai molekuliniam mechanizmui apibūdinti, bet šiuo metu pasikliaunama „kanalo“ modeliu

(Biancalana ir Koide, 2010) (9 pav). Amiloidiniai baltymai turi daug β struktūrų; manoma, kad ThT jungiasi būtent jų paviršiuje. Susidaro lygiagrečios fibrilių šoninių grandinių eilės, kurios išsidėsto statmenai β klostėms. Taip suformuojamas kanalo formos motyvas, kuris yra nukreiptas į fibrilės išorę ir suformuoja griovelį, kuriame gali prisijungti ThT. Kadangi ThT dažas atpažįsta daugeliui fibrilių bendrą struktūrą, tai toks modelis gerai paaiškina, kodėl ThT gali jungtis prie skirtingų fibrilių (Biancalana ir Koide, 2010).

2 Medžiagos ir metodai

2.1 Naudoti reagentai, laboratoriniai įrenginiai, buferiniai tirpalai

2.1.1 Medžiagos ir rinkiniai (pagal gamintoją)

- Fisher Scientific: agarozė, DNR ilgio standartas *O'Gene Ruler DNA Ladder Mix*, DNR mėginių užnešimo dažas *6x Orange DNA Loading Dye*, dNTP mišinys, restrikcijos endonukleazės *NdeI* ir *XhoI*, izopropiltio-β-D-galaktozidas (IPTG), TRIS, karbamidas, bis-akrilamidas, TEMED, molekulinės masės žymuo „*Ez-Run Rec ladder*“, dažas elektroforezės geliams dažyti „*Ez-Run Protein Gel Staining Solution*“;
- Fluka: etidžio bromidas;
- Acros Organics: glicerolis, HCl, NaOH, APS;
- AppliChem: NDS, TRIS;
- Carl Roth: akrilamidas, ampicilinas, PMSF;
- MERCK: natrio chloridas;
- SERVA: 2-merkaptoetanolis.

Fisher Scientific rinkiniai:

- Polimerazių rinkiniai „Pfu DNA Polymerase“, „Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNR Polymerase“, „Thermo Scientific *DreamTaq* Green DNA Polymerase“;
- Plazmidžių išskyrimui: „Thermo Scientific GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“;
- Polimerazinės grandininės reakcijos (toliau – PGR) produktui ir vektoriui iš gelio išskirti: „GeneJET™ Gel Extraction Kit“,
- PGR produktų gryninimui: „GeneJET™ PCR Purification Kit“.

Pastaba: visi rinkiniai naudojami pagal gamintojo pateiktus nurodymus.

2.1.2 Naudota laboratorinė įranga

- 50 ml užnešimo kilpa (GE Healthcare);
- autoklavas „AHS-75N“ (Raypa);

- centrifugos: „Eppendorf 5424”; “Herolab HiCen SR” (šaldoma) (rotoriai: AF 8.50.2, AF 6.500 ir AS 4.500);
- chromatografijos sistema „ÄKTA purifier” (GE Healthcare);
- chromatografinės kolonėlės „Tricorn5/10”, „XK26/20” (GE Healthcare);
- dializės žarnos: „Zellu Trans Roth” (pralaidumas - 8 kDa);
- DNR elektroforezės aparatas „SIGMA–ALDRICH“;
- koncentratoriai „Amicon Ultra®-15”, kurių pralaidumas - 10 kDa ir 30 kDa;
- pH-metras „Orion DUAL STAR meter” (Thermo Scientific);
- realaus laiko PGR analizatorius „Rotor-Gene Q real-time analyzer” (GE Healthcare);
- refraktometras „RL3” (PZO);
- spektrofotometras „UV-1800” (Schimadzu);
- fluorescencinis spektrometras „Cary Eclipse” (Varian);
- termocikleris „Veriti® 96-Well Thermal Cycler” (Life Technologies);
- termostatas „Eppendorf Thermostat plus”
- ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls 3100” (VS70T ir MS72 antgaliai);
- UV/WL šaltinis su gelių dokumentavimo sistema „MiniBis Pro“;
- vakuuminė filtravimo įranga „Sigma-Aldrich”.

2.1.3 Buferiniai tirpalai ir kiti tirpalai

- A. Bakterijų ardymo buferinis tirpalas: 25 mM TrisHCl, 0,2 M NaCl (pH 8);
- B. 20 mM TrisHCl, 8 M karbamido, pH 8. 48 g karbamido tirpinama nufiltruotame TrisHCl (pH 8) buferiniame tirpale. Ištirpus druskai, tirpalas filtruojamas naudojant vakuuminio filtravimo įrangą per 0,22 µm porų dydžio filtrą ir matuojamas lūžio rodiklis refraktometru. Internetiniame puslapyje (<http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>) pagal lūžio rodiklį apskaičiuojama karbamido koncentracija. Jei reikia, skiedžiama 20 mM TrisHCl buferiniu tirpalu iki 8 M, koreguojamas pH.
- C. 20 mM TrisHCl, 1 mM PMSF, pH 8;
- D. 10 mM TrisHCl, pH 8;
- E. 20 mM TrisHCl, 2 M NaCl, pH 8.

Tirpalai, naudoti „miniprepų“ skyrimui šarminės lizės būdu:

- 50 mM TrisHCl (pH 8), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNazės;
- 200 mM NaOH, 1 % NDS;
- 3 M CH₃COOK (pH 5,5);
- 70 % EtOH ir 95 % EtOH (laikoma -20 °C);
- Tris-EDTA buferinis tirpalas: 10 mM Tris (pH 8,0 – 8,5); 1 mM EDTA.

2.1.4 Mitybinės terpės ir jų gamyba

Agarizuota LB (Luria/Broth) terpė: 10 g sausos LB mitybinės terpės ir 6 g agaro ištirpinami 400 ml dH₂O, autoklavuojama 121 °C 30 min. Atvėsinama iki ~55 °C, pridedama ampicilino (100 µg/ml) ir išpilstoma į Petri lėkštes po ~20 ml;

S.O.C. mitybinė terpė;

Skysta LB (Luria/Broth) terpė: 25 g sausos LB mitybinės terpės ištirpinami 1 l dejonizuoto vandens, autoklavuojama +121 °C 20 min 1 papildomos atmosferos slėgyje;

Autoindukcinė terpė ZYM-5025: komponentai pateikiami 1-oje lentelėje. Komponentai (eil. nr. 1-7) ištirpinami ir autoklavuojami, kiti komponentai (eil. nr. 8-11) sudedami mišiniui atvėsus (Studier, 2005).

1 lentelė. Autoindukcinės terpės komponentai ir jų kiekiai vienam litrui terpės pagaminti.

Eil. nr	Komponentai	Vienam litrui terpės
1.	Kazeino hidrolizatas	10 g
2.	Mielių ekstraktas	5 g
3.	Na ₂ HPO ₄	3,55 g
4.	KH ₂ PO ₄	3,4 g
5.	NH ₄ Cl	2,68 g
6.	Na ₂ SO ₄	0,7 g
7.	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,49 g
8.	Glicerolis	5 g
9.	Dekstrozė	0,5 g
10.	Laktozė	2 g
11.	Ampicilinas (100 mg/L)	1000 µl

2.1.5 Kitos priemonės

- Žmogaus β_2m baltymą koduojanti DNR (Source BioScience);
- Plazmidinis klonavimo vektorius pET21b – bakterijų ekspresijai skirtas vektorius (Novagen). Jis turi T7 promotorių, atsparumo ampicilinui geną, jam būdingas aukštas ekspresijos lygis;
- Teoriškai sukonstruoti oligonukleotidiniai pradmenys buvo parsisiųsti iš „Metabion international AG“ (Vokietija) ir ištirpinti šių gamintojų nurodytame tūryje. Oligonukleotidinių pradmenų sekos pateiktos priede (7 lentelė).

2.2 Metodai

2.2.1 Rekombinantinių genų klonavimas

Teorinis ekspresijos plazmidžių konstravimas

β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ baltymus koduojantys genai konstruojami naudojantis „A plasmid Editor v2.0.47“ (toliau - *ApE*) ir “ExPASy Translate Tool” programomis. Naudojantis *ApE* programa galima „teoriškai“ atlikti klonavimą, pamatyti sukurto konstrukto pilną DNR seką, o “ExPASy Translate Tool” programa parodo visus konstrukto koduojamus atviro skaitymo rėmelius, tokiu būdu galima pasitikrinti, ar naudojant sukurtą konstruklą vyktų tikslinio baltymo sintezė. Taip įsitikinama, kad klonavimo schema paruošta teisingai.

Klonavimo etapai

1. β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ genų padauginimas PGR metodu. PGR mišinio komponentai supilstomi tokia eilės tvarka, kaip pateikta 2-oje lentelėje.

2 lentelė. PGR mišinio komponentai (naudojant *Pfu* natyvią DNR polimerazę; tūris – 20 μ L).

Eil. nr.	Komponentai	Galutinė koncentracija arba kiekis
1.	Dejonizuotas vanduo	Tiek, kiek reikia iki 20 μ L
2.	10X <i>Phu</i> buferis (be $MgSO_4$)	1 X
3.	25 mM $MgSO_4$	3 mM
4.	dNTP mišinys	0,2 mM
5.	Tiesioginis pradmuo	0,5 μ M
6.	Atvirkštinis pradmuo	0,5 μ M
7.	Matricinė DNR	1 ng, 10 ng arba 37,5 ng
8.	<i>Pfu</i> DNR polimerazė	0,025 U/ μ L

Reakcijos vykdomos PGR aparate „Veriti® 96-Well Thermal Cycler” pagal 3-ioje lentelėje pateiktą programą.

3 lentelė. PGR programa.

Pradinis kaitinimas	95 °C	5 min	35 ciklai
DNR grandinių atskyrimas	95 °C	30 s	
Pradmenų prilydymas	63 ir 66 °C	30 s	
DNR sintezė	72 °C	1 min	
DNR grandinės galų prisintetinimas	72 °C	10 min	

2. PGR produktų analizė agaroziniame gelyje vykdoma siekiant įvertinti, ar susidarė pageidaujami produktai ir ar nesudarė papildomų nespecifinių produktų. Pirmiausia ruošiamas 1,5 % agarozinis gelis. 500 mg agarozės ištirpinama 33 ml 1xTAE buferiniame tirpale. Mišinys virinamas, kol agarozė pilnai išsilydo, ir atvėsinaamas iki ~ 60 °C temperatūros, įpilama EtBr (0,5 µg/ml). Šitaip paruoštas agarozės tirpalas supilamas į gelio formavimo indelį, atsargiai įstatomos šukutės ir leidžiama sustingti. Padaugintos DNR mėginiai (po 5 µl) skiedžiami 6x DNR mėginių užnešimo dažų (1 µl), sumaišomi ir pernešami į gelio suformuotus šulinėlius. Prie PGR mėginių į šulinėlius taip pat pernešama 7 µL DNR ilgio standarto. Vykdoma horizontali elektroforezė (150 V, 70 mA), kurios pabaiga fiksuojama, kai bromfenolio mėlio dažo nueitas kelias yra pusė gelio ilgio. Po to gelis fotografuojamas ultravioletinėje šviesoje.
3. Padaugintos DNR išskyrimas iš PGR mišinio. DNR iš PGR mišinio išskiriama naudojant „GeneJET™ PCR Purification Kit“ rinkinį. Išskirtos DNR koncentracija nustatoma „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda=260$ nm).
4. Kirpimas restrikcijos endonukleazėmis. PGR produktas ir vektorius kerpami *NdeI* ir *XhoI* restrikcijos endonukleazėmis. Karpymui naudojama 500-700 ng DNR ir po 10-15 *NdeI* ir *XhoI* restrikcijos endonukleazių aktyvumo vienetų. Inkubuojama 2 h 37 °C temperatūroje, po to fermentai inaktyvuojami 15 min 80 °C temperatūroje.
5. Vektoriaus 5' galų modifikavimas. Kad restrikcijos metu perkirptas vektorius savaime nesusijungtų atgal į žiedinę struktūrą, vektorius defosforilinamas. Tam naudojama iš krevečių išskirta šarminė fosfatazė SAP, kuri pašalina fosfato grupę nuo perkirpto

vektoriaus 5' galo. Į vektoriaus restrikcijos mišinį dedamas 1 aktyvumo vienetas SAP fermento ir reikiamas kiekis 10X SAP buferio. Reakcija vykdoma 15 min 37 °C temperatūroje, o jai pasibaigus fermentas inaktyvuojamas reakcijos mišinį inkubuojant 15 min 75 °C temperatūroje.

6. PGR produkto ir vektoriaus išskyrimas iš agarozės gelio. Vykdoma sukarpytų fragmentų elektroforezė 1,5 % agaroziniame gelyje, po kurios fragmentai išpjaunami iš gelio ir išskiriami naudojant „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ rinkinį. Išskirtos DNR koncentracija matuojama „NanoDrop“ spektrofotometru ($\lambda=260$ nm).
7. Baltymą koduojančios DNR ir raiškos vektoriaus susiuvimas. DNR perteklius gali sumažinti susiuvimo reakcijos efektyvumą, tad susiuvimo reakcijai reikalingas įterpiamos DNR kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$x = \frac{\text{įterpiamos DNR ilgis (kb)}}{\text{linearizuoto vektoriaus ilgis (kb)}} \times \text{vektoriaus kiekis (ng)} \times S, \quad (2.1)$$

čia x – inserto kiekis, reikalingas reakcijai, S – koeficientas, nurodantis įterpiamos DNR moliarinį santykį vektoriaus atžvilgiu. Šiame darbe $S=3$. Susiuvimo reakcijos mišinio komponentai pateikiami 4-oje lentelėje.

4 lentelė. Susiuvimo reakcijos ir kontrolinių reakcijų mišinių komponentai (tūris – 20 μ l).

Eil. nr	Komponentai	Kiekis
1.	Dejonizuotas vanduo	Tiek, kiek reikia iki 20 μ L
2.	5x <i>Rapid Ligation</i> buferis	4 μ l
3.	Sukarpytas vektorius	50 ng
4.	įterpiama DNR	x ng (pagal 2.1 formulę)
5.	T4 DNR ligazė	1 μ l

Paraleliai ruošiami kontrolinių reakcijų mišiniai (kirptas ir nekirptas pET21b vektorius, susiuvimo reakcijos mišinys be inserto).

8. *E. coli* XL1-Blue kamieno ląstelių transformacija gautais pET21b- β_2 m ir pET21b- Δ N6 β_2 m konstruktais (2.2.2 sk.).
9. DNR išskyrimas iš ląstelių:
 - a) šarminės lizės būdu (pagal Bimboim ir Doly (1979));
 - b) naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį.

10. Gauto konstrukto patikrinimas. Siekiant patikrinti iš pavienių *E. coli* kolonijų išskirtas ir išgrynintas plazmidės, jos buvo karpomos *NdeI* ir *XhoI* restrikcijos endonukleazėmis, o po restrikcijos fragmentai analizuoti 1,5% agaroziniame gelyje. Taip pat buvo ruošiami mėginiai sekvenavimui (VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centras).

2.2.2 Kompetentinių ląstelių transformacija

Konstruktams padauginti naudojamas *E. Coli* XL1-Blue bakterijų kamienas, o rekombinantinių baltymų raiškai gauti naudojamas *E. coli* BL21 Star™ (DE3) bakterijų kamienas. Į 30 µl ant ledo atšildytų kompetentinių ląstelių perkeliamas reikiamas tūris sukonstruotų genetinių konstrukto, atsargiai sumaišoma ir inkubuojama 30 min ledo vonioje. Vykdomas temperatūrinis šokas (90 s, 42 °C) ir 2 min inkubuojama ledo vonioje. Į transformacijos mišinį pridėjus 400 µl S.O.C. terpės, transformantai auginami termostatinėje purtyklėje (45 min, 220 apm, 37 °C). Po to centrifuguojama (2 min, 6000 apm), o nusiurbus dalį supernatanto ir ląsteles suspendavus likusiame jo tūryje, jos išsėjamos ant sušildytos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe ir ampicilinu (100 µg/ml) ir inkubuojamos termostate (37 °C, ~ 16 val).

Naktinės bakterijų kultūros paruošimas. Į 100 ml autoklavuotos (20 min, 121°C) LB terpės dedama 100 µl ampicilino (100 µg/ml). Iš Petri lėkštelės į šią terpę perkeliama atsitiktinė transformuota *E. coli* bakterijų BL21 Star™ (DE3) kolonija; auginama purtyklėje per naktį (~ 16 val., 37 °C, 220 apm).

2.2.3 Bakterijų kultūros auginimas ir baltymo raiškos indukcija

LB terpėje (indukuojant IPTG). Paruošiamos 4 kolbos su 400 ml autoklavuota LB terpe, į kurias dedama ampicilino (100 µg/ml) ir perkeliama 10 ml naktinės kultūros. Ląstelės auginamos 37 °C, 220 apm, nustatomas optinis tankis (spektrofotometru UV-1800, $\lambda = 600$ nm) bei imami mėginiai elektroforezei. Optiniam tankiui pasiekus 0,6-0,8 O. V., vykdoma tikslinio baltymo raiškos indukcija: į kiekvieną kolbą įdedama 400 µl 1 M IPTG, toliau auginama kultūra ir kas valandą imami mėginiai elektroforezei (mėginių kiekis apskaičiuojamas pagal 2.2 formulę). Po indukcijos praėjus 4 val, užauginta kultūra centrifuguojama (20 min, 4 °C, 5000 apm), dekantavus supernatantą – surenkama ir pasverama biomasė.

Autoinduktyvioje mitybinėje terpėje ZYM-5052. Ruošiamos 6 kolbos su autoinduktyvia mitybine terpe *ZYM-5052* (po 400 ml kiekvienoje); 90 ml naktinės kultūros

paskirstoma į paruoštą terpę ir auginama 37 °C, 220 apm, 4 val. Indukcija vyksta pasibaigus gliukozės šaltiniui.

2.2.4 Baltymo tirpumo įvertinimas

Pagal baltymo izoelektrinį tašką ir cisteino aminorūgščių skaičių suformuojamas bakterijų ardymo buferinis tirpalas A. Juo užpilamas 1 g biomasės, susmulkinama, pridedama β-merkaptoetanolio (2 mM) bei PMSF (1 mM) ir maišoma ledų vonelėje ant magnetinės maišyklės (1 h, 4 °C, 110 apm.). Po to ultragarsinama (VS70T antgalis) tokiomis sąlygomis: 10 min, ultragarsinimo/ramybės ciklas – 30 s/30 s, amplitudė – 70 %. Ardymo metu biomasė taip pat laikoma šaltai. Suardyta biomasė centrifuguojama (rotorius AF 8.50.2 (Herolab), 25 min, 4 °C, 18000 apm). Paimamas supernatanto mėginys NDS-PAAG elektroforezei, o nuosėdos suspenduojamos buferiniame tirpale C (~ 2 ml tirpalo, maišoma, kol nebelieka gniūžulų). Centrifuguojama 25 min, 4 °C, 18000 apm (rotorius AF 8.50.2 (Herolab)) bei paimamas supernatanto mėginys NDS-PAAG elektroforezei. Mėginiai analizuojami NDS-PAAG (į takelius užnešami skirtingi kiekiai tirpios ir netirpios frakcijos).

2.2.5 Baltymų elektroforezė

Mėginių paruošimas. Siekiant nustatyti, ar vyksta baltymo raiška, surenkamuose bakterijų kultūros mėginiuose prieš ir po indukcijos ląstelių skaičius turi būti vienodas. Jis yra atvirkščiai proporcingas išmatuotam optiniam tankiui prieš indukciją, tad reikiamas ląstelių suspensijos kiekis apskaičiuojamas pagal 2.2 formulę. Tuomet mėginiai elektroforezei centrifuguojami 2 min 6000 apm, supernatantas atskiriamas, ant nuosėdų užpilama *6x sample* baltymų dažo, suspenduojama ir kaitinama 10 min, 98 °C temperatūroje.

$$y = \frac{x \times OT_1}{OT_2}, \quad (2.2)$$

čia y – ląstelių lizato kiekis po indukcijos, x – ląstelių lizato kiekis prieš indukciją (300 μl), OT_1 – optinis tankis prieš indukciją, OT_2 – po indukcijos.

Baltymo tirpumo įvertinimui skirti mėginiai ir mėginiai po chromatografijos ruošiami užpilant *6x sample* baltymų dažo ir kaitinant (10 min, 98 °C).

NDS-PAAG elektroforezė vykdoma „BioRad Mini Protean 3” elektroforezės aparatu, o elektroforezės gelis ruošiamas pagal 5 lentelę. Pirmiausia ruošiamas 15 % skiriamasis gelis. Paruošus stiklines elektroforezės plokšteles naudojimui, į gelį įpilama TEMED (polimerizacijos

reakcijos katalizatorius) ir APS (skatina polimerizacijos reakciją); gelį supylus, jo paviršius padengiamas dH₂O ir paliekama sustingti (apie 40 min). Geliui susipolimerizavus, nupilamas vanduo, gelio viršus nusausinamas filtriniu popieriumi, o ant viršaus polimerinamas 4 % koncentruojamasis poliakrilamido gelis. Taip pat į užpiltą koncentruojamąjį gelį įstatomos „šukos“ ir vėl leidžiama sustingti (apie 30 min). Po to plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą, užpilamas 1x elektroforezės buferinis tirpalas ir išimamos „šukos“; į gelio takelius įnešami paruošti mėginiai (po 7 µL), o elektroforezė vykdoma esant nekintamam elektros srovės stiprumui (30 mA) ir įtampai (200 V). Srovė išjungžiama, kai dažas pasiekia skiriamojo gelio apačią. Po elektroforezės gelis plaunamas vandeniu (~15 min) bei dažomas „Ez-Run“ elektroforezės gelių dažų purtyklėje per naktį (80 apm, 22 °C). Kitą dieną gelis blukinamas dH₂O.

5 lentelė. Elektroforezės skiriamojo ir koncentruojamojo gelio komponentai.

Eilės nr.	Apatinis skiriamasis gelis (15 %)		Viršutinis koncentruojamasis gelis (4 %)	
	<i>Komponentai</i>	<i>Tūris</i>	<i>Komponentai</i>	<i>Tūris</i>
1.	dH ₂ O	1,75 ml	dH ₂ O	1,27 ml
2.	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,25 ml	1 M Tris-HCl (pH 6,8)	500 µl
3.	40 % AA/BAA	1,88 ml	40 % AA/BAA	201 µl
4.	10 % NDS	50 µl	10 % NDS	20 µl
5.	10 % APS	25 µl	10 % APS	10 µl
6.	TEMED	2,5 µl	TEMED	2 µl

2.2.6 Renatūracija ir gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu

Intarpinių kūnelių atskyrimas. Biomasė sumaišoma su bakterijų ardymo buferiniu tirpalu A, pridedama PMSF (1 mM) ir maišoma ledų vonelėje ant magnetinės maišyklės (110 apm, 4 °C, 1 h). Po to biomasė ardoma ultragarsu (VS70T antgalis, ultragarsinimo/ramybės ciklas – 30 s/30 s, amplitudė – 70 %, 10 min), centrifuguojama (rotorius AF 8.50.2 (Herolab), 18000 apm, 4 °C, 20 min). Intarpiniai kūneliai nusėda kartu su ląstelių nuolaužomis.

Intarpinių kūnelių tirpinimas ir renatūracija. Intarpinių kūnelių tirpinimo metodika sudaryta remiantis McParland et al. (2000), Chiba et al. (2003) literatūros šaltiniais. Intarpinių kūnelių tirpinimui naudojamas didelę denatūranto koncentraciją turintis buferinis tirpalas B, kuris ardo antrinę baltymo struktūrą. Intarpinių kūnelių tirpinimą gali apsunkinti cisteino aminorūgštys (jų β_{2m} ir ΔN6 β_{2m} baltymuose yra dvi), nes jos gali sudaryti netaisyklingus

tarpmolekulinius disulfidinius tiltelius, todėl buvo nuspręsta naudoti DTT, kuris juos redukuoja. Taip pat buvo naudojamas proteazių inhibitorius PMSF (1 mM). Suspenduotos nuosėdos ultragarsinamos (VS70T antgalis, ultragarsinimo/ramybės ciklas – 30 s/30 s, amplitudė –70 %, 10 min). Netirpi frakcija pašalinama centrifuguojant (rotorius AF 8.50.2 (Herolab), 18000 apm, 4 °C, 25 min), o supernatantas, kuriame yra tirpus baltymas, oksiduojamas ore 72 val 4 °C temperatūroje. Baltymas renatūruojamas iš tirpalo pašalinant denatūrantą dializės būdu (dializuojama 2 l buferiniame tirpale D tris kartus). Prieš užnešant baltymo mišinį ant kolonėlės, pakrautos DEAE-sefarozės sorbentu, oksiduotas mėginys su tiksliniu baltymu filtruojamas per 0,45 µm porų dydžio švirkštinį filtrą, paimamas mėginys NDS-PAAG elektroforezei ir užšaldomas -80 °C.

Jonų mainų chromatografija atliekama naudojant „ÄKTA purifier“ gryninimo sistemą. Visi chromatografijos buferiniai tirpalai filtruojami naudojant vakuuminio filtravimo įrangą, o analizuojamas mėginys filtruojamas švirkštiniu filtru. Baltymo mėginys per 2 ml ar 50 ml tūrio kilpą užnešamas ant chromatografinės kolonėlės Tricorn 5/10 (arba, atitinkamai, XK26/20), kuri yra pakrauta DEAE-sefarozės sorbentu. Kolonėlė plaunama 20 mM TrisHCl (pH8) buferiniu tirpalu, o baltymas nuo sorbento eliuojamas linijiniu buferinio tirpalo E gradientu (kol atsiplauka baltymai). Frakcijos, kuriose yra sorbuoti baltymai, renkamos remiantis laidumo matuoklio ir UV detektoriaus rodmenimis *Unicorn* programoje. Ši programa padeda kontroliuoti chromatografijos eigą, bei iš dalies ją įvertinti. Surinktų frakcijų mėginiai po kiekvieno gryninimo tikrinami elektroforetiškai NDS-PAAG metodu. Galutinio produkto grynumas įvertinamas analizuojant gelio nuotrauką „*myImageAnalysis*“ programa. Frakcijos, kuriose tikslinis baltymas yra gryniausias (87 – 95 %), apjungiamos ir dializuojamos 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), koncentruojamos Amicon® Ultra-15 centrifuginiais koncentratoriais iki 3 mg/ml (iš pradžių naudojami koncentratoriai su 30 kDa pralaidumu (taip papildomai pašalinamos priemaišos, didesnės nei 30 kDa), o paskui – su 10 kDa pralaidumu; centrifugavimo sąlygos - 4000 g, 4 °C). Baltymų koncentracija nustatoma matuojant UV absorbciją UV-1800 spektrofotometru pagal 2.3 formulę. Baltymų ekstinkcijos koeficientas apskaičiuojamas pagal aminorūgščių seką „ExPASy ProtParam“ programa.

$$C = (A \times M) / (\epsilon \times l), \quad (2.3)$$

čia C – baltymo koncentracija (mg/ml), A – baltymo tirpalo optinis tankis, M – baltymo molekulinė masė (g/mol), ϵ – baltymo ekstinkcijos koeficientas (ϵ_{280} , 20065 M⁻¹cm⁻¹), l – optinio kelio ilgis (1 cm).

2.2.7 Fibrilių paruošimas ir jų susidarymo įrodymas

Sukoncentruoto (~3 mg/ml) baltymo tirpalas skiedžiamas glicino-acetatinio buferiniu tirpalu (pH 2,5) bei NaCl iki 1 ml taip, kad galutinės koncentracijos būtų tokios: baltymo – 0,5 mg/ml, glicino-acetato – 50 mM, NaCl – 100 mM. Taip paruošti mėginiai inkubuojami 72 val. maišant 1,5 ml mėgintuvėlius ~10 apm greičiu 37 °C temperatūroje. Ar susidaro fibrilės, nustatoma pasitelkus ThT spektroskopinę analizę bei atominės jėgos mikroskopiją.

ThT spektroskopinė analizė. Į 100 µl 50 µM ThT perkeliama 10 µl fibrilių ir fluorescenciniu spektrometru matuojamas fluorescencijos intensyvumas. Jis yra tiesiogiai proporcingas susidarančių fibrilių kiekiui. Tačiau ThT spektroskopinė analizė nėra pakankama fibrilių susidarymui įvertinti (t.y., vietoj fibrilių gali susidaryti amorfiniai agregatai, kurie taip pat sąveikautų su ThT ir lemtų fluorescencijos padidėjimą), tad pasitelkiama atominės jėgos mikroskopija.

Atominės jėgos mikroskopija. Atominės jėgos mikroskopo nuotraukoms gauti susidariusios fibrilės skiedžiamos 1 M HCl rūgštinti tris kartus (galutinė koncentracija – ~0,17 mg/ml). Nuo žėručio disko nuimamas viršutinis sluoksnis. Ant jo užnešama 30 µl paruošto mišinio su fibrilėmis ir laikoma 1 min. Druskos nuo žėručio paviršiaus nuplaunamos lėtai lašinant dH₂O, džiovinama po silpna suspausto azoto srove. Taip mėginys paruošiamas analizei.

2.2.8 Fluorescencinė analizė

ThT fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas susidarančių fibrilių kiekiui ir nustatomas fluorescenciniu spektrometru „Cary Eclipse” arba realaus laiko PGR analizatoriumi „QIAGEN Rotor-Gene Q”.

Realaus laiko PGR analizatorius „QIAGEN Rotor-Gene Q” šiame darbe naudojamas ne pagal paskirtį, tačiau jo naudojimas matuojant nedidelių tūrių mėginių fluorescencijos intensyvumą aukštesiose temperatūrose leido jį adaptuoti baltymų agregacijos tyrimams. Paruoštas reakcijos mišinys išpilstomas po 20 µl į 36 200 µl talpos mėgintuvėlius, kurie patalpinami disko pavidalo rotoriuje, o šis patalpinamas kameroje, kurioje vyksta matavimas. Rotoriui sukantis 400 apm, dėl išcentrinės jėgos palaikomas pastovus mėginių tūris mėgintuvėlių apačioje. Visuose mėginiuose palaikoma ta pati temperatūra. Reakcijos mišinys apšviečiamas monochromatine šviesa (sužadinimo $\lambda = 470$ nm), sustiprinamas signalas ir

matuojama emisija ($\lambda = 510$ nm). Įrenginys gali detektuoti visus 36 mėgintuvėlius per 150 ms (Milto et al., 2014).

2.2.9 Rekombinantinių β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ agregacijos tyrimai

β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ amiloidinių fibrilių susidarymas buvo atliekamas naudojant nuo sėklos priklausomą fibrilių ilgėjimo metodą (Naiki et al., 1997), kuriame fragmentuotos fibrilės (sėkla) yra prailginamos monomeriniu baltymu, kai pH 2,5, 37 ir 60 °C temperatūroje. Reakcija detektuojama pasitelkus ThT fluorescencinę analizę. Ilginimo reakcijos vykdomos „QIAGEN Rotor-Gene Q” analizatoriuje. Mėginiai, išpilstomi po 20 μ l.

Sėklos paruošimas

Sėklos (fibrilių galų) koncentracijai padidinti, susidariusių fibrilių agregatai ardomi ultragarsu naudojant MS72 antgalį tokiomis sąlygomis: 10 min, amplitudė – 20 %, ultragarsinimo/ramybės ciklas – 30s/30s. Ardymo metu mėgintuvėlis su fibrilėmis laikomas šaltai (ledo vonelėje).

Fibrilių ilgėjimas

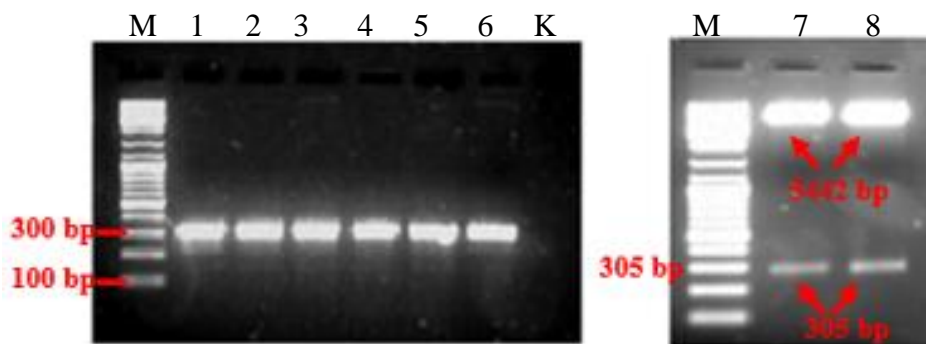
Po ultragarsinimo, fibrilės kuo greičiau sumaišomos su iš anksto paruoštu monomerinio β_2m tirpalu taip, kad galutinės koncentracijos būtų: 0,5 mg/ml, 50 mM glicino-acetatinis buferinis tirpalas su 100 mM NaCl, skirtinga sėklos dalis reakcijos mišinyje. Agregacija stebima 60 °C temperatūroje pasitelkus ThT fluorescencinę analizę realaus laiko „Qiagen Rotor-Gene Q” analizatoriuje. Matavimas trunka 15 valandų. Gautos kreivės eksportuojamos į *Microsoft Excel* programą, duomenys analizuojami.

3 Rezultatai ir jų aptarimas

3.1 Rekombinantinių β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ klonavimas ir raiška

Teoriniai raiškos konstruktai pET21b- β_2m ir pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ buvo sukurti remiantis turimomis žiniomis apie vektorių (*Novagen*) ir baltymus koduojančias genų sekas (PDB duomenų bazė: 1LDS ir 2XKU) bei naudojantis programomis „ApE“, „ProtParam“, „SnapGene Viewer“ (sukonstruotų plazmidžių genolapiai pateikiami priede (19 pav.)). Konstruojant oligonukleotidinius pradmenis buvo įvestas geno transliacijos pradžios kodonas ATG, tad, lyginant su iš *in vivo* išskirtais baltymais, rekombinantiniai baltymai β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ turi papildomą metionino aminorūgštį N gale (oligonukleotidinių pradmenų sekos pateiktos 2.1.5.).

Kuriant pET21b- β_2m ir pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ raiškos konstruktus, klonavimo etapai buvo atlikti pagal standartinius protokolus. Parsisiūsta β_2m baltymą koduojanti DNR buvo padauginta PGR metodu naudojant sukonstruotą pradmenų porą (7 lentelė priede). $\Delta N6\beta_2m$ koduojanti DNR buvo padauginta pakeitus tik tiesioginį oligonukleotidinį pradmenį. Siekiant gauti PGR produktą, buvo išbandytos trys DNR polimerazės – *DreamTaq*, *Phusion* ir *Pfu*. Naudojant pirmąsias dvi nepavyko gauti genetinio konstrukto pET21b- β_2m (po transformacijos ant Petri lėkštelės neužaugo nė viena transformuotų *E. coli* XL1-Blue kamieno ląstelių kolonija, nors PGR produktai buvo gerai frakcionuojami 1,5 % agaroziniame gelyje). Naudojant *Pfu* polimerazę, DNR buvo padauginta sukonstruotus pradmenis prilydant 66 °C temperatūroje. PGR produktai buvo analizuojami elektroforezės metodu 1,5 % agaroziniame gelyje (10 pav. 1 – 6 takeliai), po to kerpami *NdeI* ir *XhoI* restrikcijos endonukleazėmis bei klonuojami į tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptą pET21b vektorių. Gautas konstruktas pET21b- β_2m buvo padauginamas transformuojant *E. coli* XL1-Blue kompetentines ląsteles. Iš jų, naudojant „Thermo Scientific GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį, buvo išgryninta plazmidinė DNR (gaunama 35-49 ng/μl).



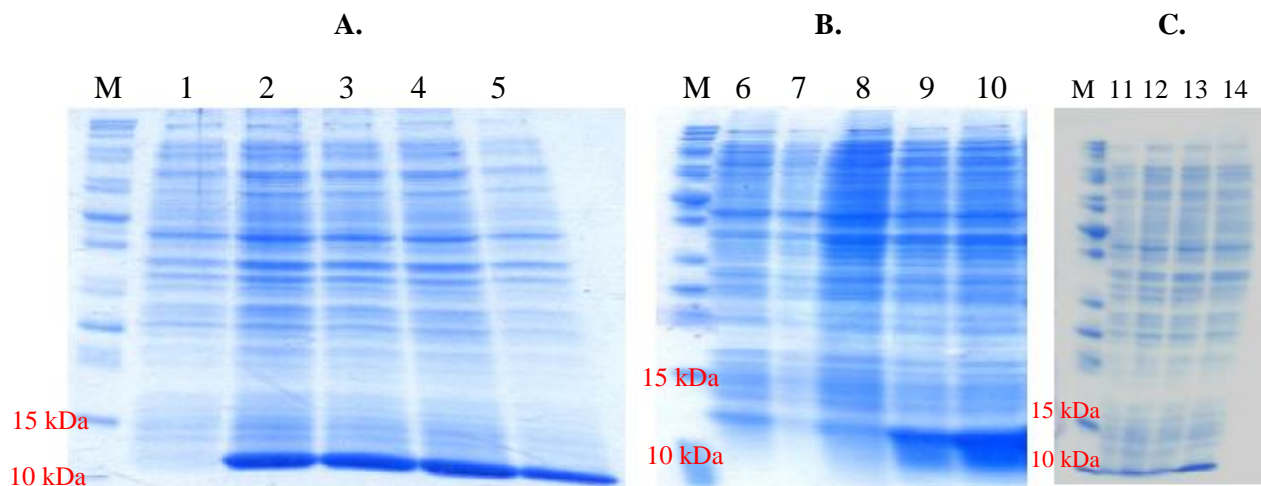
10 pav. PGR produktų ir pET21b- β_2m fragmentų po restrikcijos frakcionavimas 1,5 % agaroziniame gelyje. Čia M – molekulinės masės žymuo, 1 - 6 takeliai – β_2m baltymą koduojanti DNR, padauginta PGR metodu, K – kontrolė be matricinės DNR; PGR reakcijos vykdomos 63 °C (1-3 takeliai) ir 66 °C temperatūroje (4-6 takeliai). pET21b- β_2m konstrukto, karpymo *XhoI* ir *NdeI* restrikcijos endonukleazėmis, fragmentų analizė 1,5 % agaroziniame gelyje (7 ir 8 takeliai). Išfrakcionuoti pET21b (5442 bp) ir įterpiamos DNR (305 bp) fragmentai. Padaugintos $\Delta N6\beta_2m$ baltymą koduojančios DNR (278 bp) ir konstrukto pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ fragmentai po restrikcijos elektroforeogramoje atrodo taip pat, todėl nepateikiami.

Siekiant įsitikinti, kad buvo gautas tikslinį baltymą koduojantis konstruktas, po transformacijos pET21b- β_2m ir pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ genetiniais konstruktais gautos teigiamų klonų plazmidės buvo išgrynintos ir kerpamos *XhoI* ir *NdeI* restrikcijos endonukleazėmis, o gauti fragmentai analizuojami 1,5 % agaroziniame gelyje (10 pav. 7 ir 8 takeliai). Remiantis šia elektroforetine analize galima manyti, kad pavyko gauti tikslinį baltymą koduojantį konstruktą, tačiau tokia analizė nėra pakankama tai įrodyti, todėl plazmidinė DNR sekvenuojama VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre. Sekvenavimo rezultatai patvirtino, jog tikslinių baltymų DNR sekos yra identiškos teoriškai sukurtiems pET21b- β_2m ir pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ konstruktais, tad jie toliau naudojami rekombinantinių žmogaus β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ baltymų ekspresijai *E. coli* ląstelėse.

β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ baltymus koduojantys konstruktai pET21b- β_2m ir pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ sėkmingai transformuoti į kompetentines *E. coli* BL21 Star™ (DE3) ląsteles. Baltymo raiška indukuota auginant bakterijas skystoje LB mitybinėje terpėje, kurioje baltymo raiška indukuojama naudojant IPTG, bei autoindukcinėje mitybinėje terpėje ZYM-5052, kurioje baltymų raiška indukuojama laktoze, kai bakterijos suvartoja gliukozę.

Rekombinantinių baltymų raiška transformantuose patikrinama paėmus mėginius iš auginamos kultūros ir atlikus jų analizę elektroforezės metodu. Remiantis „ExPASy ProtParam“ programa, teorinės β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ masės yra atitinkamai 11862,3 Da ir 11138,4 Da.

Elektroforeogramoje (11 pav. A) matyti, jog po indukcijos IPTG vyksta tikslinio β_2m baltymo raiška (11 pav. 2 – 5 takeliai) (matomos baltymo juostelės ties ~12 kDa molekulinės masės žymeniu). β_2m raiška transformantuose autoindukcinėje terpėje prasideda 2-3 val. po dienos kultūros užsėjimo (11 pav. B, 8 – 10 takeliai). Transformantai auginami 5 val. po dienos kultūros užsėjimo. Elektroforeogramoje (11 pav. C, 11 – 14 takeliai) matyti, jog vyksta $\Delta N6\beta_2m$ baltymo raiška transformantuose autoindukcinėje terpėje.

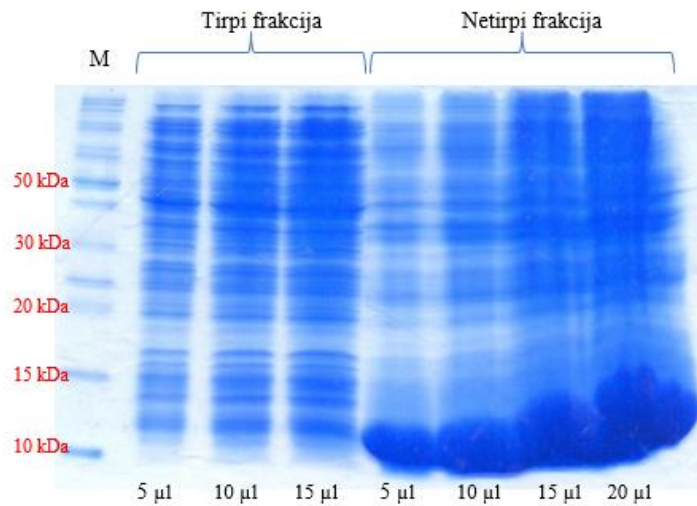


11 pav. *E. coli* bakterijų BL21 Star™ (DE3) kamiene ekspresuotų baltymų elektroforeogramos NDS-PAAG. Čia M – molekulinės masės žymuo BP3602. A. 1 takelis – ląstelių lizatas prieš β_2m geno raiškos indukciją IPTG, 2, 3, 4, 5 takeliai – ląstelių lizatai po β_2m geno raiškos indukcijos praėjus atitinkamai 1, 2, 3, 4 val. (12 % NDS-PAAG); B. 6 – 10 takeliai – β_2m geno raiška autoindukcinėje mitybinėje terpėje (mėginiai imami kas valandą po dienos kultūros užsėjimo) (15 % NDS-PAAG). C. 11 – 14 takeliai – $\Delta N6\beta_2m$ geno raiška autoindukcinėje terpėje (mėginiai imami kas valandą po dienos kultūros užsėjimo) (15 % NDS-PAAG).

Šio darbo metu iš viso užauginta 10,4 l ląstelių kultūros. Iš 7,2 l gauta $27,62 \pm 0,01$ g biomasės, iš kurios gryninamas β_2m baltymas, iš 3,2 l gauta $23,22 \pm 0,01$ g biomasės, skirtos $\Delta N6\beta_2m$ baltymui gauti. Palyginimui: auginant ląsteles LB terpėje iš 1 litro ląstelių kultūros galima gauti $3,08 \pm 0,01$ g biomasės, o iš tokio pat tūrio ląstelių kultūros, tik augintos autoindukcinėje mitybinėje terpėje, galima gauti $6,42 \pm 0,01$ g biomasės, t. y., virš 2 kartų daugiau biomasės. Bakterijų kultūros su pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ konstruktu augintos tik autoindukcinėje mitybinėje terpėje.

3.2 Rekombinantinių β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ gryninimas

Baltymų gryninimo metodika priklauso nuo to, ar baltymas bakterijų citoplazmoje yra ekspresuojamas tirpus, ar intarpiniuose kūneliuose. β_2m baltymo tirpumas įvertinamas pagal 2.2.4 sk. pateiktą metodiką. 12 pav. pateiktoje elektroforeogramoje matyti, kad tik nedidelė dalis β_2m baltymo po ląstelių suardymo ir centrifugavimo yra ląstelių lizato supernatante (pažymėta kaip tirpi frakcija), didžiausia dalis – ląstelių lizato nuosėdose (netirpi frakcija). Vadinasi, β_2m baltymas sintetinamas intarpinių kūnelių pavidalu. Literatūros šaltiniuose (Esposito et al., 2000; McParland et al., 2000; Chiba et al., 2003; Piao et al., 2003) taip pat pateikiama, jog rekombinantinis β_2m buvo ekspresuojamas intarpiniuose kūneliuose. Neieškojome būdų baltymo tirpumui didinti ir renatūravome bei gryninome jį iš intarpinių kūnelių. Tiriant $\Delta N6\beta_2m$ baltymo tirpumą buvo gautas panašus baltymų elektroforezės vaizdas.



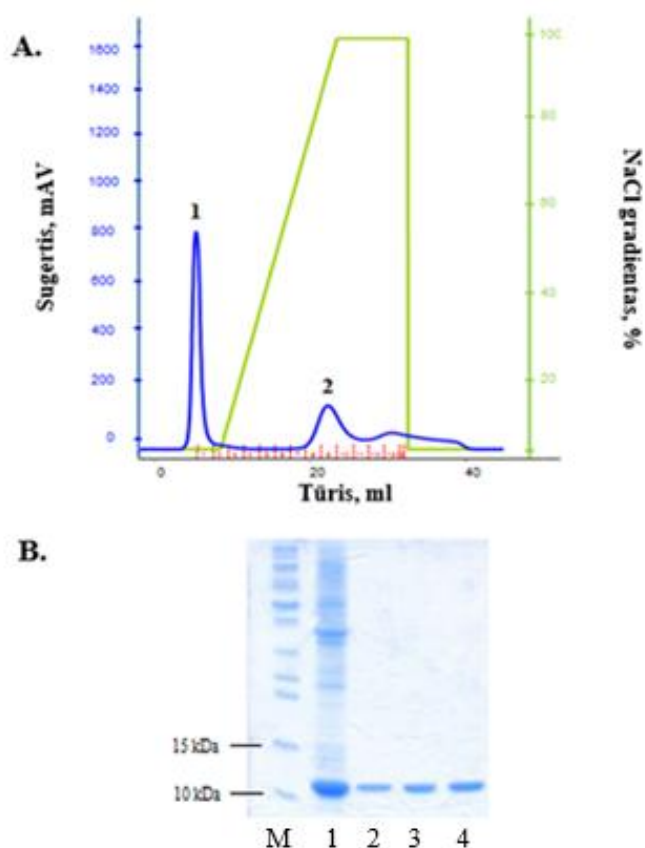
12 pav. *E. coli* bakterijų BL21 Star™ (DE3) kamiene ekspresuotų baltymų elektroforezės vaizdas 15 % NDS-PAAG. Čia M – molekulinės masės žymuo BP3602. Ant gelio užneštų frakcijų tūriai pateikti paveikslėlio apačioje.

3.2.1 Renatūracija ir jonų mainų chromatografija

Abu baltymai buvo renatūruojami iš intarpinių kūnelių pagal tą pačią metodiką (2.2.6 sk).

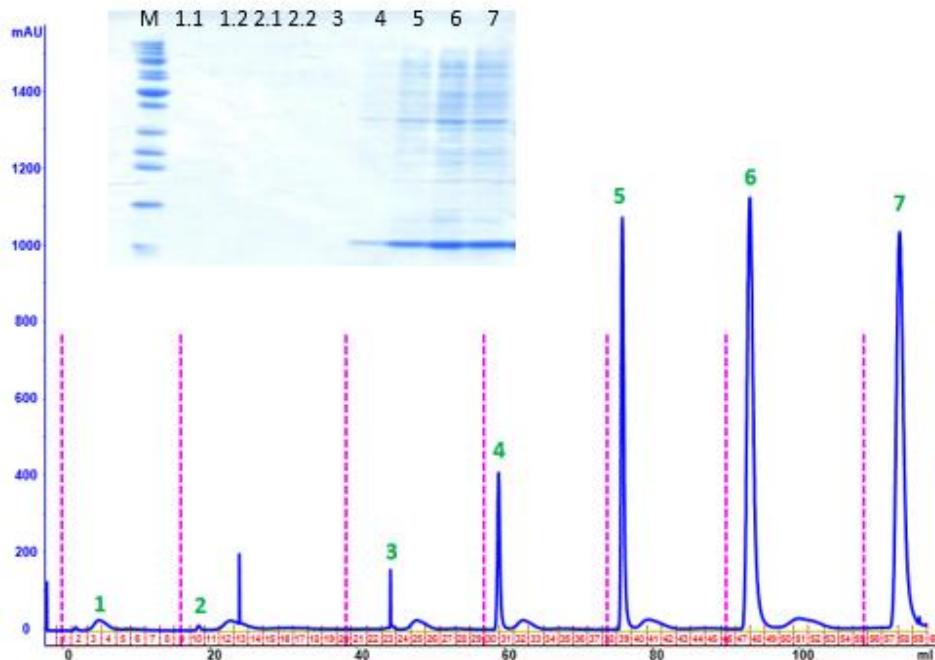
Gryninimo optimizavimas pradėtas naudojant nedidelius sorbento ir mėginio po oksidacijos kiekius. Tam naudojama Tricorn 5/10 kolonėlė, pakrauta DEAE-sefarozės sorbentu (~5 ml). 2 ml mėginys po oksidacijos per užnešimo kilpą užnešamas ant sorbento. β_2m baltymo eliucijos linijiniu NaCl gradientu (0–200 mM) chromatogramoje (13 pav. A) matoma, kad sorbuotas baltymas išeina vienu piku (pažymėta numeriu 2) ir gerai atsiskiria nuo priemaišinių baltymų smailės (pažymėta numeriu 1). Elektroforetiškai analizuojama kiekviena piko frakcija.

Nustatyta, kad pagal molekulinę masę sorbuotas baltymas yra β_2m . Elektroforezei panaudotas mėginių užnešimo dažas be DTT, todėl galima daryti prielaidą, kad β_2m baltymo oligomerų nesusidaro. Vizualiai matoma, kad baltymas yra labai švarus. Remiantis programos “myImageAnalysis” analize, jo grynumas yra daugiau nei 95 %. Tokiu būdu iš 2 ml baltymo mišinio galima gauti ~ 0,8 mg β_2m baltymo. Tačiau nemaža jo dalis yra nuplaunama kartu su priemaisomis (13 pav. A – 1 pikas, B – 1 takelis). Taip gali būti dėl to, kad baltymas nespėja prisikabinti prie sorbento ir yra per greitai eliuojamas arba sorbento yra per mažai.



13 pav. A - *E. coli* BL21 Star™ (DE3) kamiene ekspresuoto β_2m gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu, naudojant Tricorn 5/10 kolonėlę. Eliucijos sąlygos: 20 mM Tris-HCl pH 8, linijinis 0-200 mM NaCl gradientas, 3 ml/min, 5 min. Žalia kreivė – 200 mM NaCl linijinis gradientas, %; mėlyna – baltymų absorbcijos profilis, kai $\lambda = 280$ nm; raudona – surenkamos tirpalo frakcijos po eliuacijos, 1 smailė – nesisorbavę baltymai; 2 smailė – β_2m baltymas. **B** – po jonų mainų chromatografijos surinktų mėginių elektrofrezė poliakrilamidiniame gelyje. Čia *M* – molekulinės masės žymuo, 1 takelis – nesisorbavę baltymai, 2 – 4 takeliai – eliuojamų baltymų frakcijos su tiksliniu baltymu β_2m (trys frakcijos iš antros smailės šio paveikslėlio A dalyje).

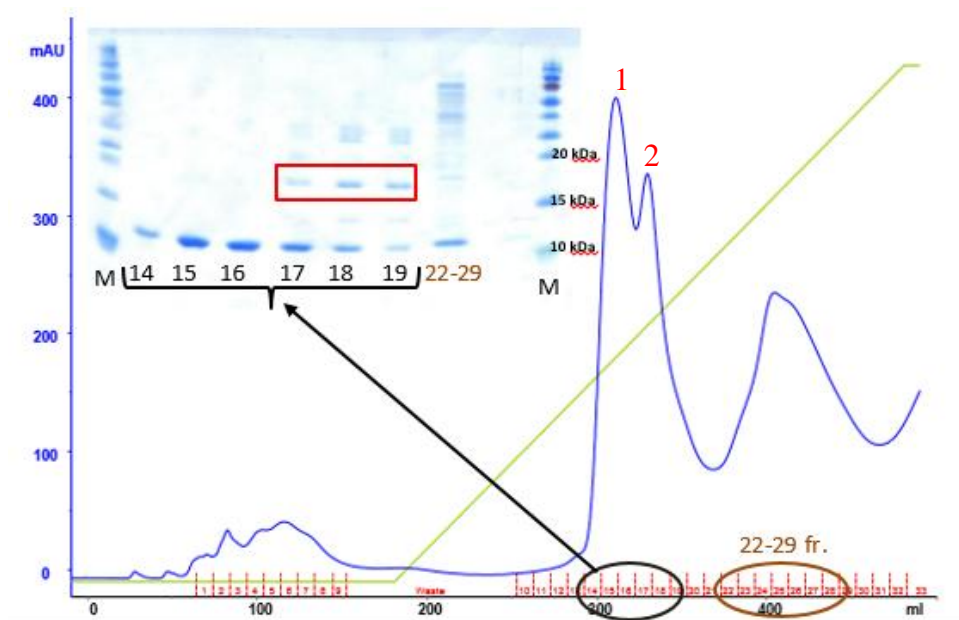
Geram atskyrimui jonų mainų chromatografijos metodu labai svarbus parametras yra užnešamo mėginio kiekis: kai jis per didelis, visa kolona užpildoma baltymu, o prie sorbento neprisikabinęs tikslinis baltymas yra nuplaunamas ir tokiu būdu prarandamas. Kad to išvengti, tačiau tuo pačiu išnaudoti visą sorbento gebėjimą prikabinti tikslinį baltymą, buvo nuspręsta atlikti „chromatografinį titravimą“: ant sorbento (~5 ml) užnešama po 0,3 ml mėginio po oksidacijos (14 pav.), o neprisikabinę baltymai po kiekvieno užnešimo eliuojami 20 mM Tris-HCl pH 8 buferiniu tirpalu bei renkamos frakcijos NDS-PAAG analizei. 14 pav. elektroforeogramoje matyti, kad penktąjį kartą užnešus 0,3 ml nufiltruoto mėginio po oksidacijos ant kolonėlės (iš viso 1,5 ml), eliuojama nemaža dalis tiksulinio baltymo. Nuplovus baltymą nuo sorbento linijiniu NaCl gradientu ir surinkus frakcijas, spektrofotometriškai nustatyta baltymo absorbcija ir paskaičiuota baltymo koncentracija (pagal 2.3 formulę). Nustatyta, kad pakanka 1,5 ml mėginio po oksidacijos tam pačiam baltymo kiekiui (~0,8 mg iš gryninimo, aprašyto 13 pav.) gauti. Ant DEAE-sefarozės sorbento (~5 ml) užneštas ~1,2 ml baltymo mišinio kiekis yra optimalus ir tokios proporcijos laikomasi naudojant didesnę sorbento kiekį.



14 pav. „Chromatografinis titravimas“ jonų mainų chromatografijos metodu. Rožinės spalvos punktyrais pavaizduojamas 0,3 ml mėginio užnešimas ant sorbento; viršuje – surinktų frakcijų elektroforetinė analizė 15 % NDS-PAAG. Numeracija gelio nuotraukoje atitinka chromatogramoje žaliai pažymėtą numeraciją (čia žymėjimas 1.1, 1.2 bei 2.1 ir 2.2 reiškia, kad buvo tikrinama po dvi frakcijas iš kiekvienos smailės).

Siekiant gauti didesnį baltymo kiekį, nuspręsta gryninimą atlikti su didesne kolonėle (XK 26/20), tuo pačiu didinant sorbento (~ 50 ml) bei ant jo užnešamo mėginio po oksidacijos (~ 12 ml) tūrį, kuris buvo užnešamas naudojantis 50 ml superkilpa. Buferinio tirpalo tekėjimo greitis, atsižvelgiant į kolonos apribojimus, buvo parinktas kiek galima didesnis (3 ml/min), o baltymas atplaunamas nuo sorbento per 120 min. Palyginus 13 ir 15 pav. pateiktas chromatogramas, matyti, kad jų profiliai truputį skiriasi. 15 pav. vietoj vieno piko matomi du persidengiantys pikai. Panaudojus mėginių užnešimo dažą be DTT ir išanalizavus surinktas pikų frakcijas elektroforetiškai (15 pav. elektroforezės nuotrauka) paaiškėjo, kad pirmame pike atskiriami monomerai, o antrame - monomerų ir galimai dimerų mišinys. Frakcijos, kuriose monomerinis β_2m yra švariausias, apjungiamos, dializuojamos 10 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 8). Nustatyta, kad iš vieno tokio gryninimo galima gauti apie 4,8 mg baltymo.

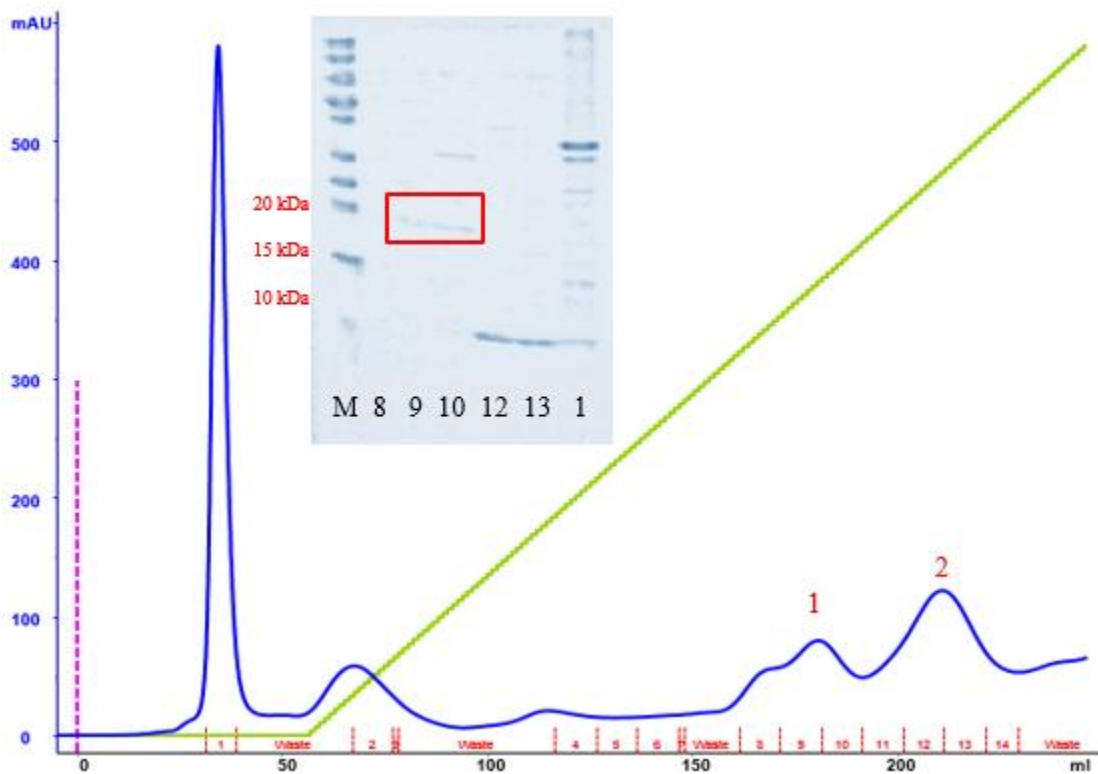
Literatūros šaltiniuose pateikiama, kad tolesnis gryninimo etapas yra gelfiltracija, kurios metu papildomai pašalinamos druskos, priemaišos ir oligomerai. Tačiau vietoj gelfiltracijos buvo pasirinkta „Amicon Ultra®-15” koncentratoriai; jais pašalintos priemaišos, kurių dydis daugiau nei 30 kDa. Apibendrinant šią gryninimo dalį, galima teigti, kad norint gauti pakankamai švarų β_2m monomerą, pakanka jį gryninti jonų mainų chromatografijos metodu.



15 pav. Rekombinantinio β_2m gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu bei surinktų frakcijų analizė 15 % NDS-PAAG. Chromatografijos sąlygos: 20 mM TrisHCl (pH8), 0-250 mM NaCl linijinis gradientas, 75 min, 4 ml/min, sorbento ~ 50 ml, >10 ml užnešamo mėginio po oksidacijos. Surinktos frakcijos po gryninimo sumaišomos su 5x mėginių užnešimo dažų be DTT ir analizuojamos 15 % NDS-

PAAG. Raudonu stačiakampiu apibraukti susidarę β_2m baltymo dimerai.

$\Delta N6\beta_2m$ baltymo gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu sudėtingesnis. Pabandyta $\Delta N6\beta_2m$ baltymą gryninti tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir β_2m . Remiantis 16 pav. pateikta chromatograma ir surinktų frakcijų elektroforezės nuotrauka, $\Delta N6\beta_2m$ baltymas atplaunamas nuo sorbento ne pirmu pikų, kaip kad β_2m baltymo atveju, bet antru. Pirmuoju pagal molekulinę masę gali būti atplaunami $\Delta N6\beta_2m$ baltymo dimerai, arba tai nežinomas *E. coli* baltymas. Be to, pikai 1 ir 2 (pažymėta raudonai) yra geriau atskiriami tarpusavyje. Lyginant su 15 pav. pateikta β_2m gryninimo jonų mainų metodu chromatograma, vizualiai matoma, jog $\Delta N6\beta_2m$ baltymo išgryninama daug mažiau (4 kartus mažesnė baltymo absorbcija). Išmatavus baltymo absorbciją po chromatografijos nustatyta, kad iš vieno tokio gryninimo galima gauti apie 1 mg $\Delta N6\beta_2m$ baltymo.



16 pav. Rekombinantinio $\Delta N6\beta_2m$ gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu bei surinktų frakcijų analizė 15 % NDS-PAAG. Chromatografijos sąlygos: ~50 ml DEAE-sefarozės sorbento, ~12 ml užnešamo oksiduoto mėginio, 20 mM TrisHCl, 0 - 400 mM linijinis NaCl gradientas, 3 ml/min, 75 min. Surinktos frakcijos po gryninimo sumaišomos su 5x mėginių užnešimo dažu be DTT ir analizuojamos 15 % NDS-PAAG. Elektroforeogramoje skaičiais pažymėti takeliai atitinka chromatografijos metu surinktų frakcijų mėginius. Raudonu stačiakampiu apibraukti galimai susidarę $\Delta N6\beta_2m$ baltymo dimerai.

Aukščiau pateiktose elektroforeogramose (13-16 pav.) matyti, kad baltymų juostelė, kuri atitinka baltymus β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$, pagal dydį pakankamai tiksliai užima sritį tarp 10 ir 15 kDa molekulinės masės žymenų. Tačiau elektroforezė nėra pakankama patvirtinti, kad buvo išgryninti reikiami baltymai, todėl buvo atlikta baltymų mėginių masių spektrometrinė analizė (atliko dr. Vytautas Smirnovas). Ji patvirtino, kad mėginiuose esančių baltymų molekulinė masė sutampa su teoriškai nustatytais (6 lentelė). Tuo remiantis buvo padaryta išvada, kad buvo gauti tiksliniai baltymai.

6 lentelė. Teoriniai duomenys, gauti pasinaudojus „ProtParam“ programa bei masių spektrometrinės analizės duomenys.

	Teorinė molekulinė masė, Da	Praktiškai išmatuota molekulinė masė, Da
β_2m	11862	11861 ± 1
$\Delta N6\beta_2m$	11138	11137 ± 1

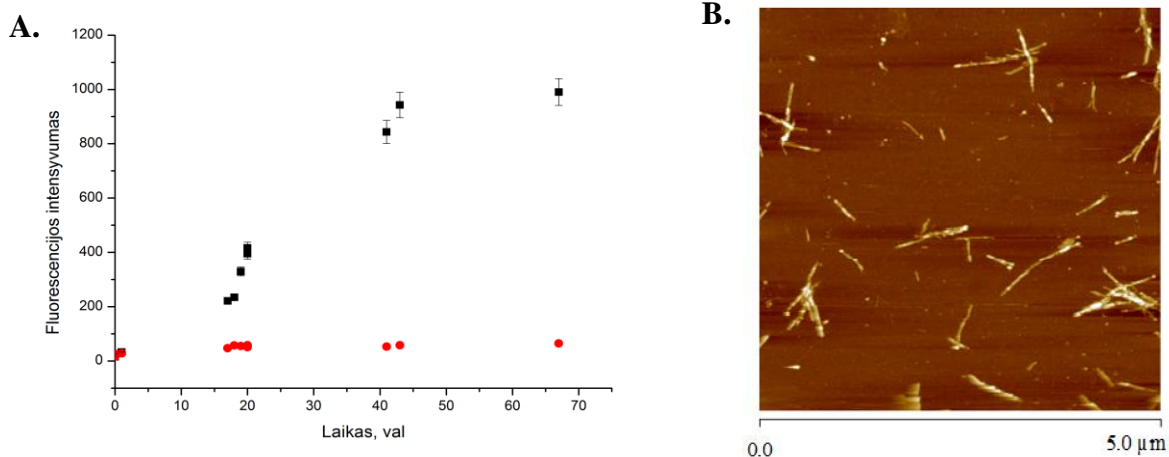
Iš viso šio darbo metu buvo atlikti 23 gryninimai jonų mainų chromatografijos metodu, po kurių buvo gauta $27,62 \pm 0,01$ mg β_2m baltymo ir $4,39 \pm 0,01$ mg $\Delta N6\beta_2m$ baltymo (grynumas 87-95 %). Sunku įvertinti, ar gaunamos didelės baltymų išėigos, ar mažos, nes analizuotuose literatūros šaltiniuose niekas nepateikia, koks kiekis baltymų buvo gautas, dažniausiai nurodomos tik sukonzentruoto baltymo koncentracijos ir grynumas (Esposito et al., 2000; McParland et al., 2000; Chiba et al., 2003; Piao et al., 2003).

3.3 Rekombinantinių β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ agregacijos tyrimai

β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ baltymų spontinės ir nuo sėklos priklausomos agregacijos procesas stebimas naudojant amiloidams specifinį dažą ThT ir matuojant jo fluorescencijos pokytį laike.

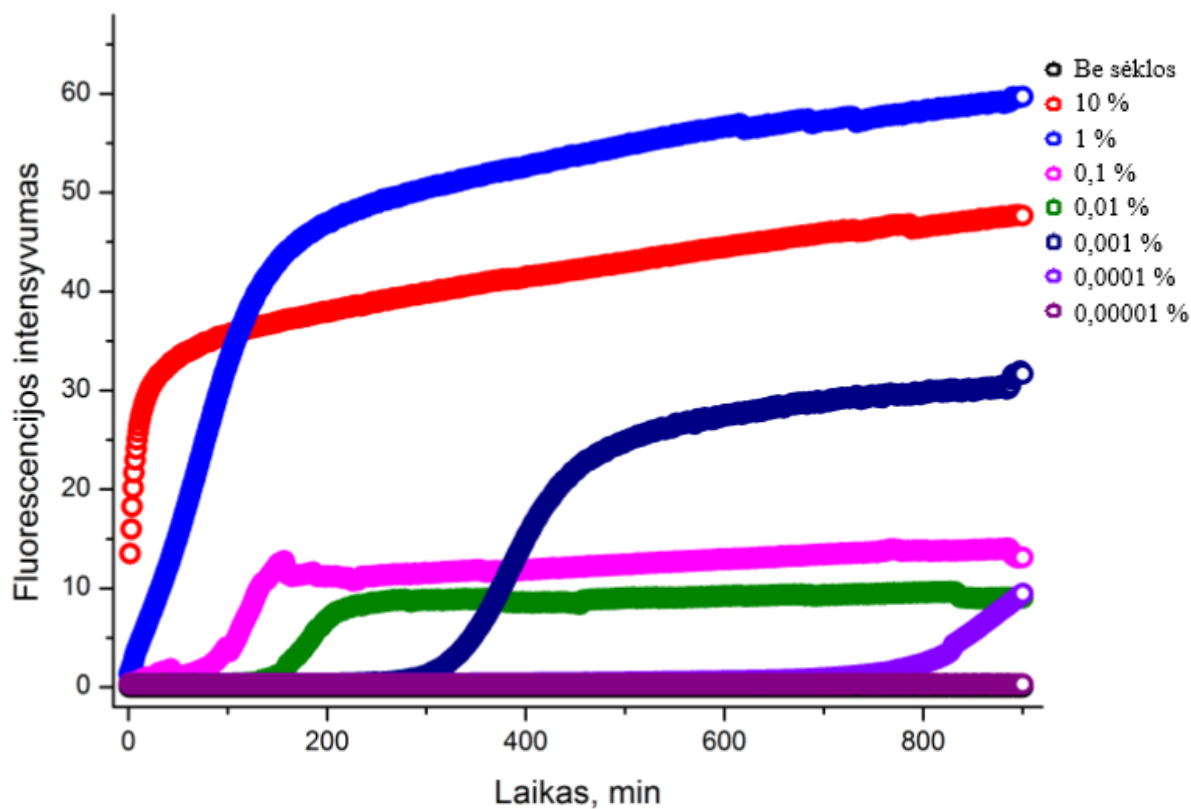
β_2m amiloidinės fibrilės ruošiamos 50 mM glicino-acetatiname buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, inkubuojama 37 °C temperatūroje 72 valandas. Remiantis literatūros šaltiniais (McParland et al., 2000; Chiba et al., 2003), buvo nuspręsta fibriles ruošti buferiniame tirpale, kurio pH 2,5, o reakcijos mišiniai 1,5 ml talpos mėgintuvėliuose inkubuojami skirtingai: laikomi stacionariai arba maišomi aplink horizontalią ašį besisukančioje maišyklėje. Laikui bėgant buvo imami mėginiai, kurie buvo analizuoti ThT fluorescencinės analizės metodu. Gautos kreivės (17 pav. A) parodo, kad maišymas labai paspartina fibrilogenę, t.y., gaunami žymiai didesni (net 10-11 kartų) ThT dažo fluorescencijos intensyvumai.

Atlikus spontaninę agregaciją nuspręsta įsitikinti, ar tikrai susidaro amiloidinės fibrilės aukščiau aprašytomis sąlygomis. Tam buvo pasitelkta atominės jėgos mikroskopija. Analizuoto mėginio su fibrilėmis nuotrauka pateikta 17 pav. B. Joje galima matyti, kad susidaro daug β_2m amiloidinių fibrilių, kurių ilgis nuo 100 nm iki 1,5 μm .



17 pav. A. β_2m amiloidinių fibrilių susidarymas *in vitro*, reakcijos mišinio nemišant (raudoni apskritimai) ir maišant (~10 apm) 37 °C temperatūroje (juodi kvadratėliai). Amiloidinės β_2m fibrilės ruošiamos tokiomis sąlygomis: 50 mM glicino-acetatiname buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, pH 2,5, 72 val. Paklaidos apskaičiuotos iš trijų pakartojimų. **B.** β_2m fibrilių nuotrauka, gauta atominės jėgos mikroskopu. Fibrilės paruoštos taip, kaip aprašyta 17 pav. A dalyje. Skenavimo dydis – 5 μm . Nuotraukas gavo T. Šneideris ir D. Šulskis.

Yra žinoma, kad amiloidinę agregaciją galima pagreitinti į mėginį pridedant nedidelį kiekį to baltymo fibrilių (sėklos). Dažniausiai tokiems eksperimentams naudojama sėklos koncentracija – keli procentai nuo visos mėginyje esančio baltymo koncentracijos. Buvo pabandyta išsiaiškinti β_2m sėklos efektyvumo žemutinę ribą. Atlikus seriją eksperimentų, nustatyta, kad per 15 val. nuo eksperimento pradžios galima stebėti amiloidinių fibrilių susidarymą, kai yra 0,0001 % sėklos ir daugiau (18 pav.). Vadinasi, norint pagreitinti β_2m amiloidinių fibrilių susidarymą, pakanka pridėti vieną molekulę amiloidinės β_2m formos milijonui natyvaus β_2m molekulių.



18 pav. Skirtingos β_2m sėklos koncentracijos reakcijos mišinyje įtaka monomerinio β_2m gebėjimui agreguoti, nustatyta matuojant ThT fluorescencijos intensyvumą. Sėkla suformuota 50 mM glicino-acetatiname buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, maišant ~10 apm, 37 °C temperatūroje 72 valandas (pH 2,5). Suformuotos β_2m fibrilės skaldomos ultragarsu (fibrilių galų padauginimui) (MS72 antgalis, 10 min, 20 % amplitudė, 30 s veikimo / 30 s poilsio režimas), nedelsiant sumaišomos su monomerinio baltymo mišiniu ir išpilstoma po 20 μ l (po 3 pakartojimus). Fibrilių ilgėjimo kinetika stebima matuojant ThT fluorescenciją 60 °C temperatūroje 15 val. besisukančiame rotoriuje („QIAGEN Rotor-Gene Q” analizatoriuje).

Išvados

1. Gauti raiškos konstruktai pET21b- β_2m ir pET21b- $\Delta N6\beta_2m$.
2. Tiksliniai baltymai ekspresuojami intarpinių kūnelių pavidalu.
3. Renatūruojant ir gryninant β_2m baltymą jonų mainų chromatografijos metodu galima gauti pakankamai švarų baltymą (87 – 95 % grynumo), tad gryninimas gelfiltracijos būdu nėra būtinas.
4. Išgryninta $27,62 \pm 0,01$ mg β_2m ir $4,39 \pm 0,01$ mg $\Delta N6\beta_2m$.
5. Nustatyta, kad norint pagreitinti β_2m amiloidinių fibrilių susidarymą pakanka pridėti vieną molekulę amiloidinės β_2m formos milijonui natyvaus β_2m molekulių.

β_2 -mikroglobulino ir $\Delta N6\beta_2$ -mikroglobulino genų konstravimas ir raiška, rekombinantinių baltymų gryninimas bei jų agregacijos tyrimai

Magistro darbas

Gerda Blantaitytė

SANTRAUKA

Amiloidozėmis apibūdinamos ligos, kurių metu normaliomis sąlygomis tirpus baltymas ar peptidas virsta netirpiomis fibrilinėmis struktūromis ir sudaro nuosėdas. Su dialize susijusios amiloidozės patogenezėje pagrindinį vaidmenį atlieka baltymas β_2 -mikroglobulinas (β_2m) ir šešiomis aminorūgštimis N gale trumpesnė baltymo forma $\Delta N6\beta_2$ -mikroglobulinas. β_2m yra MHC I komplekso lengvoji grandinė ir normaliomis sąlygomis yra lengvai pašalinamas per inkstus. Tačiau inkstų nepakankamumo atveju pacientams ilgą laiką vykdoma dializė – dirbtinis kraujo valymo būdas per pusiau pralaidžią membraną, pro kurią β_2m nedifunduoja ir pradeda kauptis organizme. Ilgainiui susidaro amiloidinių fibrilių sankaupos griaučių sistemoje, dėl kurių išsivysto riešo kanalo sindromas, destruktivi artropatija, lūžta kaulai.

Šio baigiamojo darbo metu sukonstruoti β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$ baltymus koduojantys raiškos konstruktai pET21b- β_2m ir pET21b- $\Delta N6\beta_2m$ buvo sėkmingai transformuoti į kompetentines *E. coli* BL21 Star™ (DE3) ląsteles. Baltymai buvo ekspresuoti intarpinių kūnelių pavidalu, renatūruoti ir išgryninti jonų mainų chromatografijos metodu. Iš viso gauta $27,62 \pm 0,01$ mg β_2m ir $4,39 \pm 0,01$ mg $\Delta N6\beta_2m$ baltymo. Parodyta, kad galima gauti pakankamai švarius baltymus (85 – 97 %) naudojant vien tik jonų mainų chromatografiją. Pasitelkus ThT fluorescencijos analizę ir atominės jėgos mikroskopiją parodyta, kad galima gauti šių baltymų amiloidines fibriles *in vitro*. Taip pat parodyta, kad tam tikromis sąlygomis galima stebėti amiloidinių fibrilių susidarymą, kai yra 0,0001 % sėklos ir daugiau.

Cloning, expression, purification and aggregation studies of recombinant β_2 -microglobulin and $\Delta N6\beta_2$ -microglobulin

Master thesis

Gerda Blantaitytė

SUMMARY

Amyloidosis is an insoluble protein fibril that is deposited in the extracellular spaces of organs and tissues as a result of changes in protein folding. β_2 -microglobulin (β_2m), a typical domain of immunoglobulin, and its truncated variant $\Delta N6\beta_2m$ are major components of amyloid fibrils formed in dialysis-related amyloidosis. Long-term dialysis treatment for kidney diseases can induce the β_2m amyloid deposition in osteoarticular tissues that causes various disorders, such as destructive cystic bone lesions or carpal tunnel syndrome.

In this study, recombinant human β_2 -microglobulin and its truncated variant $\Delta N6\beta_2$ -microglobulin genes were amplified and cloned into pET21b vector and expressed in *E. coli* BL (21) Star™ (DE3) cell strain. Later it was purified by ion exchange chromatography. $27,62 \pm 0,01$ mg of β_2m and $4,39 \pm 0,01$ mg of $\Delta N6\beta_2m$ was produced and it was shown that ion exchange chromatography alone is sufficient to obtain β_2m of 87 – 95 % purity, which is suitable for aggregation studies. Using ThT fluorescence assay and atomic force microscopy the formation of amyloid-like fibrils was confirmed. In addition, it was demonstrated that as few as 0,0001 % of β_2m seeds can induce fibrillogenesis of native β_2m at conditions stated in this work.

Priedai

7 lentelė. Oligonukleotidinių pradmenų sekos ir būdingos savybės. Sekose juodai paryškintos restrikcijos endonukleazių *NdeI* ir *XhoI* atpažįstamos sekos, ATG – translacijos pradžios kodonas, TAA – translacijos pabaigos kodono atvirkštinis komplementarus kodonas.

Pradmuo	Nukleotidų skaičius	T _m , °C	GC, %	Pradmens seka (5'→3' kryptimi)
Tiesioginis (β_2m)	26	68	58	GGCCTGCATATGATCCAGCGTACTCC
Tiesioginis ($\Delta N6\beta_2m$)	27	68	37	CGTACTCATATGATTCAGGTTTACTCA
Atvirkštinis (tinka β_2m ir $\Delta N6\beta_2m$)	28	68	50	CATGACTCGAGTTACATGTCTCGATCCC



19 pav. Plazmidžių pET21b-β₂m ir pET21b-ΔN6β₂m genolapiai. Sumodeliuota pasitelkus „SnapGene Viewer“ programą“.

Literatūra

1. Amdursky N, Erez Y, Huppert D. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. *Accounts of chemical research*. 2012;45(9):1548-1557.
2. Ban T, Yamaguchi K, Goto Y. Direct observation of amyloid fibril growth, propagation, and adaptation. *Accounts of chemical research*. 2006;39(9):663-670.
3. Becker JW, Reeke GN. "Three-dimensional structure of β 2-microglobulin" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(12):4225-4229.
4. Bellotti V, Stoppini M, Mangione P, Sunde M, Robinson C, Asti L, Brancaccio D, Ferri G. β 2-microglobulin can be refolded into a native state from ex vivo amyloid fibrils. *European Journal of Biochemistry*. 1998;258(1):61-67.
5. Bimboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*. 1979;7(6):1513-1523.
6. Borysik AJ, Morten IJ, Radford SE, Hewitt EW. Specific glycosaminoglycans promote unseeded amyloid formation from β 2-microglobulin under physiological conditions. *Kidney international*. 2007;72(2):174-181.
7. Chatani E, Goto Y. Structural stability of amyloid fibrils of β 2-microglobulin in comparison with its native fold. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2005;1753(1):64-75.
8. Chiba T, Hagihara Y, Higurashi T, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. Amyloid Fibril Formation in the Context of Full-length Protein EFFECTS OF PROLINE MUTATIONS ON THE AMYLOID FIBRIL FORMATION OF β 2-MICROGLOBULIN. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(47):47016-47024.
9. Chiti F, De Lorenzi E, Grossi S, Mangione P, Giorgetti S, Caccialanza G, Bellotti, V. A partially structured species of β 2-microglobulin is significantly populated under physiological conditions and involved in fibrillogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(50):46714-46721.
10. Connors LH, Shirahama T, Skinner M, Fenves A, Cohen AS. In vitro formation of amyloid fibrils from intact β 2-microglobulin. *Biochemical and biophysical research communications*. 1985;131(3):1063-1068.

11. Coppolino G, Bolignano D, Rivoli L, Mazza G, Presta P, Fuiano G. Tumour markers and kidney function: a systematic review. *BioMed research international*. 2014.
12. Cummings NA, Nordb GL. (1966). Measurement of synovial fluid pH in normal and arthritic knees. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;9(1):47-56.
13. Cunningham BA. Structure and significance of beta₂-microglobulin. *Fed. Proc.* 1976; 35:1171-1176.
14. Esposito G, Ricagno S, Corazza A, Rennella E, Gümral D, Mimmi MC, Betto E, Pucillo CEM, Fogolari F, Viglino P, Raimondi S, Giorgetti S, Bolognesi B, Merlini G, Stoppini M, Bolognesi M, Bellotti V. The controlling roles of Trp60 and Trp95 in β 2-microglobulin function, folding and amyloid aggregation properties. *Journal of molecular biology*. 2008;378(4):887-897.
15. Floege J, Ketteler M. β 2-Microglobulin-derived amyloidosis: An update. *Kidney International*. 2001;59:S164-S171.
16. Giorgetti S, Rossi A, Mangione P, Raimondi S, Marini S, Stoppini M, Corazza A, Viglino P, Esposito G, Cetta G, Merlini G, Bellotti V. β 2-Microglobulin isoforms display an heterogeneous affinity for type I collagen. *Protein science*. 2005;14(3):696-702.
17. Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ookoshi T, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N. Growth of beta(2)-microglobulin-related amyloid fibrils by non-esterified fatty acids at a neutral pH. *Biochem J*. 2008;416(2):307-15.
18. Hill DM, Kasliwal T, Schwarz E, Hebert AM, Chen T, Gubina E, Zhang L, Kozlowski S. A dominant negative mutant beta 2-microglobulin blocks the extracellular folding of a major histocompatibility complex class I heavy chain. *J Biol Chem*. 2003;278(8):5630-5638.
19. Internetinė skaičiuoklė <http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>.
20. Kozhukh GV, Hagihara Y, Kawakami T, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. Investigation of a Peptide Responsible for Amyloid Fibril Formation of β 2-Microglobulin by Achromobacter Protease I. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(2):1310-1315.
21. Kwon HK, Pyun SB, Cho WY, Boo CS. Carpal tunnel syndrome and peripheral polyneuropathy in patients with end stage kidney disease. *Journal of Korean medical science*. 2011;26(9):1227-1230.

22. Linke RP, Schaeffer J, Gielow P, Lindner P, Lottspeich F, Plückthun A, Weiss EH. Production of recombinant human β 2-microglobulin for scintigraphic diagnosis of amyloidosis in uremia and hemodialysis. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267(3): 627-633.
23. Mangione PP, Esposito G, Relini A, Raimondi S, Porcari R, Giorgetti S, Vorazza A, Fogolari F, Penco A, Goto Y, Lee YH, Yagi H, Cecconi C, Gilmore JD, Chiti F, Rolandi R, Taylor GW, Pepys MB, Stoppni M, Bellotti, V. Structure, Folding Dynamics, and Amyloidogenesis of D76N β 2-Microglobulin ROLES OF SHEAR FLOW, HYDROPHOBIC SURFACES, AND α -CRYSTALLIN. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(43):30917-30930.
24. McParland VJ, Kad NM, Kalverda AP, Brown A, Kirwin-Jones P, Hunter MG, Sunde M, Radford SE. Partially unfolded states of β 2-microglobulin and amyloid formation in vitro. *Biochemistry*. 2000;39(30):8735-8746.
25. Mink SR, Hodge A, Agus DB, Jain A, Gross ME. Beta-2-microglobulin expression correlates with high-grade prostate cancer and specific defects in androgen signaling. *The Prostate*. 2010;70(11):1201-1210.
26. Myers SL, Jones S, Jahn TR, Morten IJ, Tennent GA, Hewitt EW, Radford SE. A systematic study of the effect of physiological factors on β 2-microglobulin amyloid formation at neutral pH. *Biochemistry*. 2006;45(7):2311-2321.
27. Naiki H, Hashimoto N, Suzuki S, Kimura H, Nakakuki K, Gejyo F. Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid Int J Exp Clin Invest*. 1997;4:223–232.
28. Nolen BM, Orlichenko LS, Marrangoni A, Velikokhatnaya L, Prosser D, Grizzle WE, Ho K, Jenkins FJ, Bovbjerg DH, Lokshin AE. “An extensive targeted proteomic analysis of disease-related protein biomarkers in urine from healthy donors”. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63368, 2013.
29. Ohhashi Y, Hagihara Y, Kozhukh G, Hoshino M, Hasegawa K, Yamaguchi I, Goto Y. The intrachain disulfide bond of β 2-microglobulin is not essential for the immunoglobulin fold at neutral pH, but is essential for amyloid fibril formation at acidic pH. *Journal of biochemistry*. 2002;131(1):45-52.

30. Ohhashi Y, Kihara M, Naiki H, Goto Y. Ultrasonication-induced amyloid fibril formation of β 2-microglobulin. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;80(38):32843-32848.
31. Ono K, Uchino F. Formation of amyloid-like substance from beta-2-microglobulin in vitro. *Nephron*. 1994;66(4):404-407.
32. Ookoshi T, Hasegawa K, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H. Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(10):3247-55.
33. Orlando RA, Rader K, Authier F, Yamazaki H, Posner BI, Bergeron JJ. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(10):1759-66.
34. Parker KC, Wiley DC. *Gene*. 1989;83:117-124.
35. PDB [duomenų bazė internete]. Protein Data Bank. Sukurta 1999-12-15 [cituota 2016-01-07]. Adresas: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1LDS>
36. Piao WH, Song XG, Liu MC, He Y, Zhang HH, Xu WX, Wang, GQ. Cloning, expression, and purification of HLA-A2-BSP and β -2m in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 2004;35(2):210-217.
37. Piazza R, Pierno M, Iacopini S, Mangione P, Esposito G, Bellotti V. Micro-heterogeneity and aggregation in β 2-microglobulin solutions: effects of temperature, pH, and conformational variant addition. *European Biophysics Journal*. 2006;35(5):439-445.
38. Platt GW, Radford SE. Glimpses of the molecular mechanisms of β 2-microglobulin fibril formation in vitro: aggregation on a complex energy landscape. *FEBS letters*. 2009;583(16):2623-2629.
39. Radford SE, Gosal WS, Platt GW. Towards an understanding of the structural molecular mechanism of β 2-microglobulin amyloid formation in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2005;1753(1):51-63.
40. Relini A, Canale C, De Stefano S, Rolandi R, Giorgetti S, Stoppini M, Rossi A, Fogolari F, Corazza A, Esposito G, gliozzi A, Bellotti V. Collagen plays an active role in the aggregation of β 2-microglobulin under physiopathological conditions of dialysis-related amyloidosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(24):16521-16529.
41. Relini A, De Stefano S, Torrassa S, Cavalleri O, Rolandi R, Gliozzi A, Giorgetti S, Raimondi S, Marchese L, Verga L, Rossi A, Stoppini M, Bellotti V. Heparin strongly

- enhances the formation of β 2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(8):4912-4920.
42. Shrouf J, Yousefzadeh M, Dodd A, Kirven K, Blum C, Graham A, Mitas M. β 2microglobulin mRNA expression levels are prognostic for lymph node metastasis in colorectal cancer patients. *British journal of cancer*. 2008;98(12):1999-2005.
 43. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda SI, Merlini G, Saraiva MJ, Westermark P. Nomenclature 2014: amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*. 2014;21(4):221-224.
 44. Sipe JD, editor. *Amyloid proteins. The Beta Sheet Conformation and Disease*. WILEY-VCH. 2005.
 45. Smith DP, Radford SE. Role of the single disulphide bond of β 2-microglobulin in amyloidosis in vitro. *Protein Science*. 2001;10(9):1775-1784.
 46. Studier F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification*. 2005;41:207–234.
 47. Su Y, Sarell CJ, Eddy MT, Debelouchina GT, Andreas LB, Pashley CL, Radford SE, Griffin RG. Secondary structure in the core of amyloid fibrils formed from human β 2m and its truncated variant Δ N6. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(17):6313-6325.
 48. Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, and Blake C F. *J. Mol. Biol.* 1997; 273:729-739.
 49. Svatoňová J, Bořecká K, Adam P, Lánská V. Beta2-microglobulin as a diagnostic marker in cerebrospinal fluid: a follow-up study. *Disease markers*. 2014:495402
 50. Valleix S, Gillmore JD, Bridoux F, Mangione PP, Dogan A, Nedelec B, Boimard M, Touchard G, Goujon JM, Lacombe C, Lozeron P, Adams D, Lacroix C, Maisonobe T, Plante-Bordeneuve V, Vrana JA, Theis JD, Giorgetti S, Porcari R, Ricagno S, Bolognesi M, Stoppini M, Delpech M, Pepys MB, Hawkins PN, Bellotti V. Hereditary systemic amyloidosis due to Asp76Asn variant 2-microglobulin. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(24):2276-2283.

51. Yamaguchi I, Suda H, Tsuzuike N, Seto K, Seki M, Yamaguchi Y, Naiki H. Glycosaminoglycan and proteoglycan inhibit the depolymerization of β 2-microglobulin amyloid fibrils in vitro. *Kidney international*. 2003;64(3):1080-1088.
52. Yamamoto S, Hasegawa K, Yamaguchi I, Tsutsumi S, Kardos J, Goto Y. Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry*. 2004;43(34):11075-82.
53. Yokoyama T, Watanabe H, & Ymawaki N. The research of a high affinity macromolecular ligands for beta 2-microglobulin. *Jpn. J. Artif. Organs*. 1989;18:1155-1158.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju savo baigiamojo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui už galimybę atlikti magistro darbą VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje, už perduotas žinias, patarimus ir visokeriopą pagalbą. Taip pat noriu padėkoti dr. Vaidai Juozapaitienei ir dr. Jelenai Jachno už kantrybę ir suteiktas žinias genų inžinerijos srityje, Tomui Šneideriui ir Dariui Šulskiui už patarimus ir atominės jėgos mikroskopo nuotraukas. Ačiū visam kolektyvui už draugišką aplinką.