

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra

Biochemijos studijų programos IV kurso studentas

Mantas ŽIAUNYS

Bakalaurinis darbas

**Rekombinantinių avies prioninių baltymų ARQ ir VRQ  
gryninimas ir agregacijos tyrimai**

Darbo vadovas

Dr. Vytautas Smirnovas

Konsultantas

Tomas Šneideris

Vilnius, 2016

# **Rekombinantinių avies prioninių baltymų ARQ ir VRQ gryninimas ir agregacijos tyrimai**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Mantas ŽIAUNYS

\_\_\_\_\_

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

\_\_\_\_\_

Konsultantas:

Tomas ŠNEIDERIS

\_\_\_\_\_

Vilnius, 2016

# Turinys

|   |    |
|---|----|
| Santrumpos .....  | 5  |
| Įvadas .....  | 6  |
| 1. Literatūros apžvalga .....   | 7  |
| 1.1 Prionai ir jų struktūra.....                                      | 7  |
| 1.2 Prioninės ligos .....   | 8  |
| 1.3 Prionų agregacija.....  | 9  |
| 1.3.1 Šablono inicijuojami konformaciniai pokyčiai.....               | 9  |
| 1.3.2 Nukleacinė polimerizacija .....                                 | 10 |
| 1.4 Prioninės avių ligos .....  | 11 |
| 1.4.1 Scrapie .....   | 11 |
| 1.4.2 Klasikinė Scrapie .....   | 12 |
| 1.4.3 Netipinė Scrapie.....   | 13 |
| 1.5 Avių prioninių baltymų genotipų pasiskirstymas.....               | 15 |
| 1.6 Prionų agregacija <i>in vitro</i> .....                           | 15 |
| 2. Medžiagos ir metodai.....  | 17 |
| 2.1 Naudotos medžiagos, tirpalai, sorbentai ir įrenginiai .....       | 17 |
| 2.1.1 Laboratorinė įranga .....                                       | 17 |
| 2.1.2 Medžiagos.....  | 18 |
| 2.1.3 Buferiniai tirpalai .....                                       | 18 |
| 2.1.4 Sorbentas .....   | 19 |
| 2.1.5 Ląstelės.....   | 19 |
| 2.1.6 Plazmidės.....  | 19 |
| 2.1.7 Terpės.....   | 20 |
| 2.2 Metodai .....   | 21 |
| 2.2.1 Kompetentinių E.coli BL21(DE3) ląstelių transformacija.....     | 21 |
| 2.2.2 Transformuotų ląstelių auginimas auto-induktyvioje terpėje..... | 21 |
| 2.2.3 Baltymų raiškos nustatymas elektroforezės būdu.....             | 21 |
| 2.2.4 Baltymų gryninimas .....  | 23 |
| 2.2.5 Baltymų terminio stabilumo tyrimas.....                         | 25 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.6 Spontaninės baltymų agregacijos tyrimai.....                | 26 |
| 2.2.7 PrPARQ ir PrPVRQ fibrilių ilgėjimo tyrimai .....            | 27 |
| 3. Rezultatai.....  | 29 |
| 3.1 Avių PrPARQ ir VRQ gryninimas .....                           | 29 |
| 3.1.1 <i>E. coli</i> transformacija ir PrPARQ, PrPVRQ raiška..... | 29 |
| 3.1.2 Afininė chromatografija .....                               | 30 |
| 3.2 PrPARQ ir PrPVRQ spontaninės agregacijos tyrimai.....         | 32 |
| 3.3 PrPARQ ir PrPVRQ terminio stabilumo tyrimas.....              | 34 |
| 3.4 PrPARQ ir PrPVRQ fibrilių ilgėjimo tyrimai.....               | 37 |
| Išvados .....   | 46 |
| Santrauka.....  | 47 |
| SUMMARY .....   | 48 |
| Literatūros sąrašas .....   | 49 |

## **Santrumpos**

ALRQ/AFRQ/ALHQ – avių prioniniai baltymai turintys taškines mutacijas 136, 141, 154 ir 171 pozicijose;

ANS – 1,8-anilinonaftaleno sulfonatas;

APS – amonio persulfatas;

dH<sub>2</sub>O – dejonizuotas vanduo;

GPI – glikozilfosfatidilinozitolis;

GSS - Gerstmann-Sträussler-Schneiker sindromas;

GuHCl – guanidino hidrochloridas;

IDA – iminodiacto rūgštis;

IMAC – imobilizuotų metalo jonų afininė chromatografija;

NDS – natrio dodecilsulfatas;

NTA – nitrilodiacto rūgštis;

PrPARQ – avių prioninis baltymas turintis alaniną (A) 136 pozicijoje, argininą (R) 154 pozicijoje ir glutaminą (Q) 171 pozicijoje;

PrP<sup>C</sup> - natyvi (ląstelinė, angl. Cellular) prioninio baltymo forma;

PrP<sup>Sc</sup> - patogeniniai agregatai (angl. Scrapie);

PrPVRQ - avių prioninis baltymas turintis valiną (V) 136 pozicijoje, argininą (R) 154 pozicijoje ir glutaminą (Q) 171 pozicijoje;

S.O.C. – (angl. super optimal broth with catabolite repression) – optimali mitybinė terpė;

Scrapie – avių ir ožkų spongiforminė encefalopatija (kempinligė);

TEMED – tetrametiletildiaminas;

ThT – tioflavinas T.

## Įvadas

Prioniniai baltymai yra konservatyvūs žinduolių ląstelių paviršiaus glikoproteinai. Egzistuoja dvi šių baltymų formos - natyvi (ląstelinė, angl. Cellular) baltymo forma (PrP<sup>C</sup>) ir patogeniniai agregatai (PrP<sup>Sc</sup>, angl. Scrapie). PrP<sup>C</sup> turi daugiau alfa spiralių ir yra neatsparus proteazėms, o PrP<sup>Sc</sup> turi padidėjusį kiekį beta struktūrų ir yra dalinai atsparus proteazėms. Dėl šių pokyčių PrP<sup>Sc</sup> gali lengvai jungtis į amiloidinius agregatus ir sukelti įvairias spongiformines encefalopatijas (kempinliges). Viena iš labiausiai paplitusių prioninių ligų yra avių Scrapie liga.

Ši liga pirmą kartą buvo aprašyta 1732 m. ir iki šios dienos jos veikimo mechanizmas nėra galutinai aiškus. Po daugelio tyrimų ir stebėjimų buvo nustatyta, jog tos pačios rūšies avys gali turėti vieną ar kelias taškines mutacijas, prioninį baltymą koduojančiame gene, kurios nulemia susirgimo tikimybę, ligos eigą ir net jos tipą.

Kadangi Scrapie užkrečiamumas ir eiga stipriai priklauso nuo šių natūraliai gamtoje paplitusių taškinių mutacijų, egzistuoja tokie prioniniai baltymai, kurie skiriasi tik viena aminorūgštimi bet sukelia skirtingo pobūdžio susirgimus. Viena iš šių mutacijų yra 136 pozicijoje esančio alanino pakeitimas valinu.

Šio darbo tikslas yra pasigaminti būtent tokius mutantus (PrPARQ ir PrPVRQ) ir ištirti bei palyginti jų terminį stabilumą ir agregacijos kinetiką.

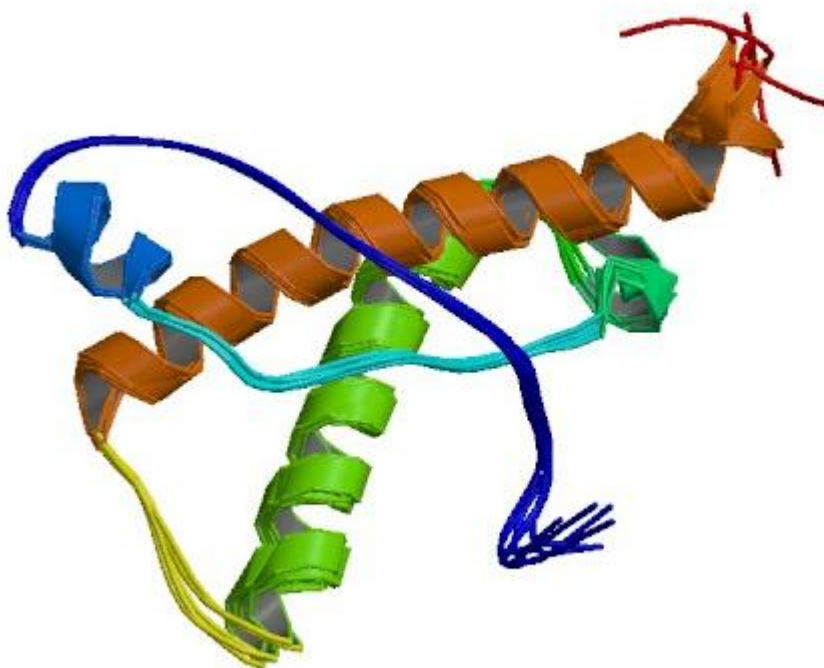
Darbo uždaviniai:

1. Rasti tinkamas sąlygas išgryninti rekombinantinius PrPARQ ir PrPVRQ baltymus.
2. Nustatyti abiejų baltymų terminį stabilumą.
3. Atlikti abiejų baltymų agregacijos kinetikos tyrimus.

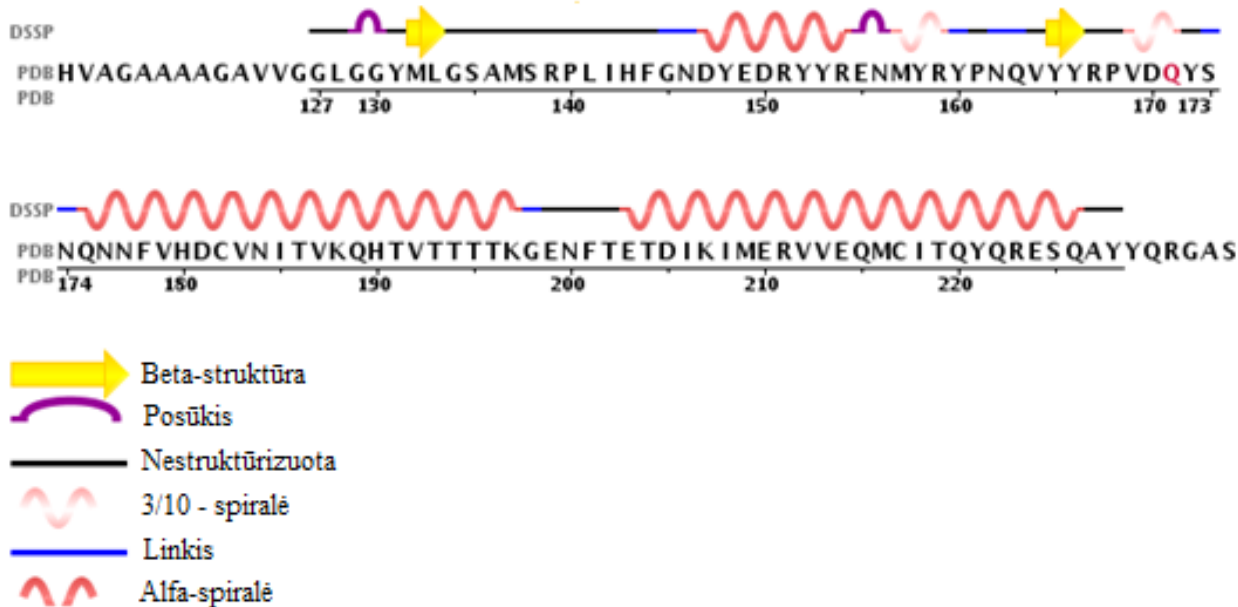
# 1. Literatūros apžvalga

## 1.1 Prionai ir jų struktūra

Prionai yra žinduolių ląstelių paviršiaus glikoproteinai prisijungę prie plazminės membranos per C-gale esantį glikozilfosfatidilinozitolio (GPI) inkarą. (Race et al., 2015) Jie sudaryti iš nestruktūrizuoto N-galo turinčio 4-5 tandeminius oktapeptidinius PHGGGWGQ pasikartojimus (Swayampakula et al., 2013) ir globulinio C-galo, turinčio tris alfa spirales ir vieną tarp jų esančią antiparalelinę beta struktūrą (1.1 ir 1.2 pav.). Globuliniame domene egzistuoja stipri asociacija tarp alfa spirales-1, C-galinio alfa spirales-2 regiono ir N-galinio alfa spirales-3 regiono. Šis centrinis branduolys yra surišamas disulfidinio ryšio tarp antros ir trečios alfa spirales. (Yang et al., 2014).



**1.1 pav.** Avies PrP<sup>C</sup> C-galo erdvinė struktūra (pagal RCSB Protein Data Bank: 1XYU).



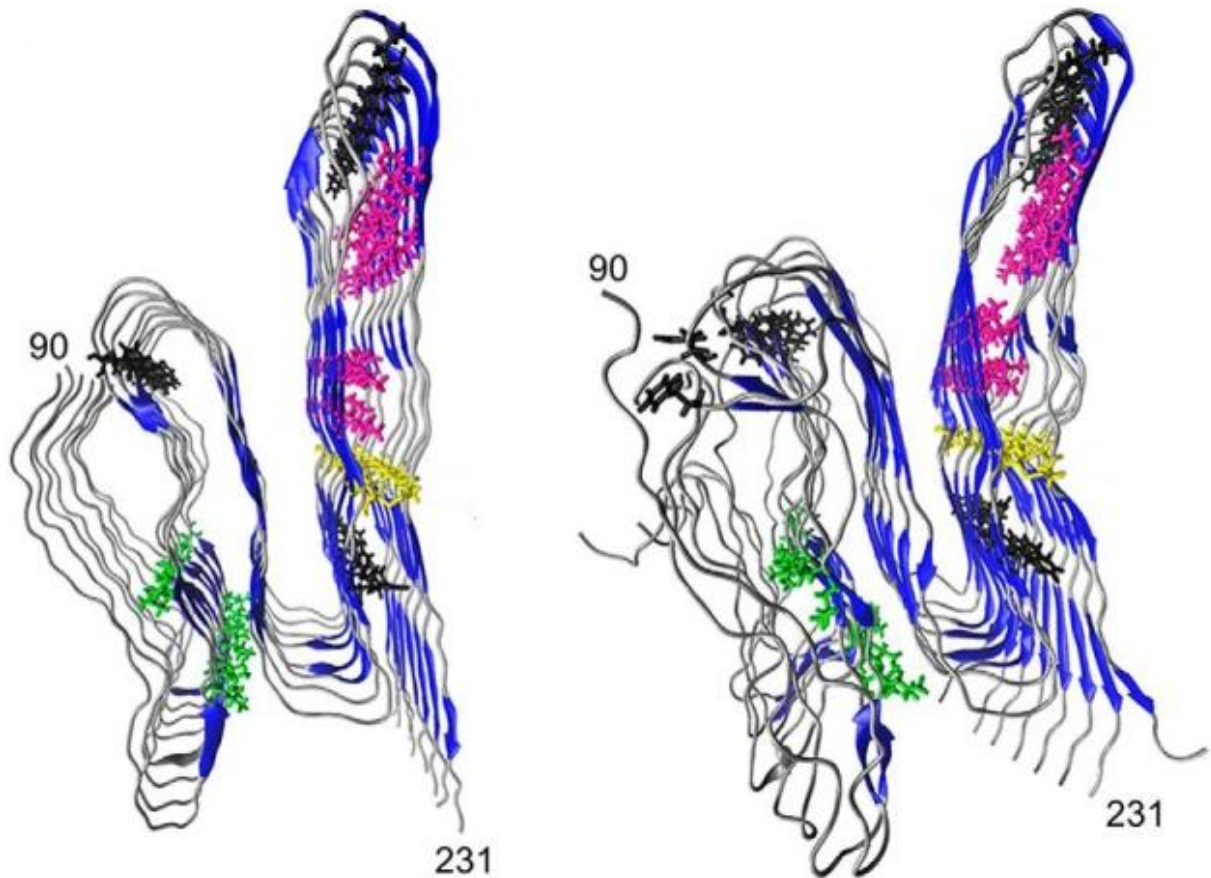
**1.2 pav.** Avies prioninio baltymo PrP<sup>Sc</sup> globulinio C-galo antrinė struktūra ir seka (pagal RCSB Protein Data Bank: 1TPX).

## 1.2 Prioninės ligos

Prioninės ligos - tai grupė mirtinų neurodegeneratyvinių ligų, kurios gali atsirasti spontaniškai, per užkratą arba dėl genetinių pokyčių. Žmonės gali susirgti Creutzfeldt-Jakob liga, Gerstmann-Sträussler-Schneiker (GSS) sindromu ar Kuru liga; galvijai- galvijų spongiformine encefalopatija (kempinlige); avys ir ožkos – Scrapie liga; briedžiai, elniai - lėtine išsekimo liga. (Benetti ir Legname, 2015).

Manoma, kad prioninės ligos susidaro dėl normalaus alfa spiralėmis turtingo PrP<sup>C</sup> baltymo restruktūrizacijos į daugiau beta struktūrų turinčią PrP<sup>Sc</sup> formą (1.3 pav.) (amiloidinius agregatus). (Yang et al., 2014). 45% PrP<sup>C</sup> struktūros sudaro alfa-spiralės ir tik 3% - beta struktūros, o tuo tarpu PrP<sup>Sc</sup> sudaro daugiausiai beta-struktūras turinti forma. (Aguzzi ir Calella, 2009) Ši forma yra netirpi ir dalinai atspari proteolizei. (Benetti ir Legname, 2015; Jacobs et al., 2011)





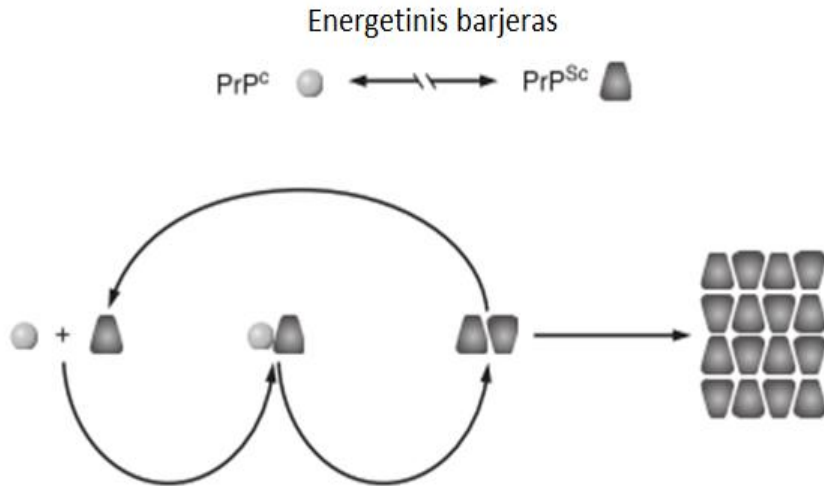
**1.3 pav.** Galimos PrP<sup>Sc</sup> 90-231 erdvinės struktūros modelis pagal (Grovetman et al., 2014).

### 1.3 Prionų agregacija

Remiantis hipoteze, jog prionų replikacija priklauso tik nuo pačių prioninių baltymų, buvo pasiūlyti du galimi replikacijos būdai: šablono inicijuojami konformaciniai pokyčiai ir nukleacinė polimerizacija.

#### 1.3.1 Šablono inicijuojami konformaciniai pokyčiai

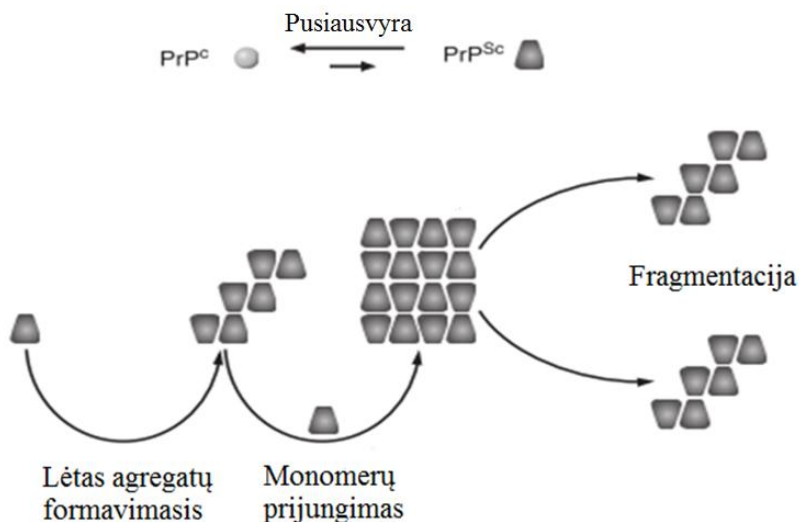
Ši hipotezė teigia, kad gali egzistuoti monomerinė PrP<sup>Sc</sup> forma. Nors dėl energetinio barjero negali įvykti spontaninis virsmas iš PrP<sup>C</sup> į PrP<sup>Sc</sup>, tačiau PrP<sup>Sc</sup> gali veikti kaip šablono paversdamas normalią priono molekulę į save (1.4 pav.). (Aguzzi ir Calella, 2009).



**1.4 pav.** Šablono inicijuojami konformaciniai pokyčiai (pagal Aguzzi ir Calella, 2009)

### 1.3.2 Nukleacinė polimerizacija

Ši hipotezė teigia, jog PrP<sup>C</sup> ir PrP<sup>Sc</sup> yra pusiausvyroje kur didžiąją dalį sudaro PrP<sup>C</sup>. Šiuo atveju PrP<sup>Sc</sup> monomerai negali būti replikacijos iniciatoriais, nes net ir maži kiekiai darytų įtaką eksponentiškai greitėjančiai prionų replikacijai, tačiau iš PrP<sup>Sc</sup> gali susiformuoti agregatai, kurie skatintų PrP<sup>C</sup> virsmą į PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>Sc</sup> agregatų (branduolių) spontaninis susidarymas yra labai lėtas procesas (1.5 pav.). (Aguzzi ir Calella, 2009).



**1.5 pav.** Nukleacinės polimerizacijos mechanizmas (pagal Aguzzi ir Calella, 2009)

Nukleacinės polimerizacijos proceso metu yra svarbus susiformavusio amiloido skilimas į mažesnes infektyvias daleles. Vykdamas *in vitro* prionų agregaciją pastebėta, kad esant maišymui žymiai greičiau vyksta prionų replikacija. (Aguzzi ir Calella, 2009).

## 1.4 Prioninės avių ligos

### 1.4.1 Scrapie

Avių Scrapie liga yra viena iš seniausiai žinomų ir plačiausiai paplitusių užkrečiamųjų spongiforminių encefalopatijų, kuri gali būti perduodama per maistą (skrandžio limfinius audinius), žaizdas arba inokuliacijos būdu, bei atsirasti spontaniškai. (Yang et al., 2014; Garza, Monzo, ir Jose, 2014; Le Dur et al., 2005).

Scrapie liga buvo pirmą kartą aprašyta Anglijoje 1732 metais ir Vokietijoje 1750 metais. Ji buvo paplitusi daugelyje šalių ir turėjo 42 skirtingus pavadinimus. Kol nebuvo nustatyta ligos priežastis, buvo manoma, kad ji gali atsirasti spontaniškai, būti paveldima, perduodama tarp gyvūnų kontakto metu. (Millhauser, 2013; Salami et al., 2011).

Vėliau šią ligą buvo bandoma nustatyti stebint sveikas avis, kontaktuojančias su sergančiomis ir inokuliuojant sveikas avis įvairiais sergančiųjų kūno skysčiais. Tačiau dėl ilgo ligos inkubacinio periodo, visi bandymai buvo nutraukti prieš pasireiškiant pirmiesiems ligos požymiams.

1930-aisiais, dėl nuolatos didėjančių avių industrijos nuostolių, pradėti intensyvūs Scrapie ligos tyrimai. 1936 metais Scrapie užkrečiamumas buvo patvirtintas sveikoms avims sušėrus sergančių avių smegenų ir stuburo smegenų homogenato bei stebint avis ilgesnį laiką nei prieš tai atliktuose tyrimuose. Tačiau vis dar nebuvo žinoma, kas sukelia šią ligą. Iš pradžių iškelta teorija, kad tai gali būti parazitai, vėliau – bakterijos, o galiausiai, kad tai virusai. 1954 m. pasiūlytas terminas „lėta virusinė infekcija“. 1966 m. pasiūlyta alternatyva virusams buvo polisacharidai arba lipidai. Galiausiai 1967 m. Griffith iškėlė hipotezę, jog Scrapie ligą sukelia ne virusai ar bakterijos, o baltymai. Šią hipotezę 1982 m. patvirtino Stanley Prusiner bei pasiūlė šią ligą sukeliančius patogenus vadinti „baltyminėmis infektyviomis dalelėmis“ (angl. *proteinaceous infection particle* – akronimas „prion“). Ir netrukus 1985 m. Oesch iškėlė hipotezę, kad ligos mechanizmas paremtas normalaus ląstelinio baltymo PrP<sup>C</sup> virsimu patogenišku PrP<sup>Sc</sup>. (Millhauser, 2013).

Scrapie charakterizuojama ilgu inkubaciniu periodu ir laipsnišku centrinės nervų sistemos degeneravimu. Egzistuoja du Scrapie tipai (klasikinė ir netipinė). Liga, priklausomai nuo jos tipo, pasireiškia vienu ar keliais iš šių požymių: niežuliu, svorio mažėjimu, seilėjimusi, pakitusiu elgesiu, ataksija, orientacijos erdvėje praradimu ir įvairaus laipsnio regos sutrikimais. (Hautaniemi et al., 2012).

#### **1.4.2 Klasikinė Scrapie**

Klasikinė Scrapie yra natūraliai užkrečiama forma, kuri charakterizuojama PrP<sup>Sc</sup> agregatų susikaupimu centrinėje bei periferinėje nervų sistemoje ir limfiniuose audiniuose. (Dassanayake et al., 2016; Chianini et al., 2015). Ligos sąvybės priklauso nuo priono 136, 154 ir 171 pozicijose esančių aminorūgščių. (Yang et al., 2014). Pagal atliktus genotipų tyrimus, nustatytos dažniausiai šiose pozicijose esančios aminorūgštys ir jų įtaka ligai. 136 pozicijoje esantis alaninas (A) įtakoja atsparumą, valinas (V) – jautrumą. 154 pozicijoje argininas (R) – silpną jautrumą, histidinas (H) – atsparumą. 171 pozicijoje argininas (R) ir histidinas (H) – atsparumą, glutaminas (Q) – jautrumą. (Millhauser, 2013).

Šių polimorfizmų rezultatas yra penki dažniausiai pasitaikantys aleliai (ARQ, VRQ, AHQ, ARR ir ARH) (Gielbert, Thorne, ir Hope, 2014), kurie sukuria 5 homozigotinius ir 10 heterozigotinių genotipų. Šie genotipai yra skirstomi į 5 rizikos grupes (1.1 Lentelė), pagal jų tikimybę užsikrėsti klasikine Scrapie. Į šias rizikos grupes atsižvelgiama vykdant Europos Sąjungos nustatytą Scrapie naikinimo programą. (Millhauser, 2013).

**1.1 Lentelė.** Avies genotipų klasikinės Scrapie rizikos grupės. Pirma grupė turi didžiausią atsparumą ligai, penka – mažiausią (pagal Millhauser, 2013).

| Rizikos grupė | Genotipas | Jautrumas                      |
|---------------|-----------|--------------------------------|
| 1             | ARR/ARR   | Didelis genetinis atsparumas   |
| 2             | ARR/AHQ   | Vidutinis genetinis atsparumas |
|               | ARR/ARH   |                                |
|               | ARR/ARQ   |                                |
| 3             | AHQ/AHQ   | Mažas genetinis atsparumas     |
|               | AHQ/ARH   |                                |
|               | AHQ/ARQ   |                                |
|               | ARH/ARH   |                                |
|               | ARH/ARQ   |                                |
| 4             | ARR/VRQ   | Vidutinis genetinis jautrumas  |
| 5             | AHQ/VRQ   | Didelis genetinis jautrumas    |
|               | ARH/VRQ   |                                |
|               | ARQ/VRQ   |                                |
|               | VRQ/VRQ   |                                |

Manoma, kad ARR/ARR genotipas negali natūraliai užsikrėsti klasikine Scrapie. Atlikti tyrimai bandant įvairiais metodais sukelti ligą šios rūšies avyse, tačiau klasikinės Scrapie požymiai pasirodė tik inokuliuvus PrP<sup>Sc</sup> tiesiai į avies smegenis (Jeffrey et al., 2014).

Atliekant plataus masto avių tyrimus Europoje buvo nustatyti tik du atvejai Vokietijoje ir Prancūzijoje, kai ARR/ARR genotipo avys sirgo klasikine Scrapie. Tačiau kol kas visi tyrimai bandant natūraliai užkrėsti ARR/ARR genotipo avis buvo nesėkmingi (Groschup et al., 2007). Dėl šių atradimų skatinamas selektyvus avių veisimas regionuose, kuriuose vyrauja klasikinė Scrapie. Siekiama, kad dauguma avių turėtų bent vieną ARR ar AHQ alelį ir kuo mažiau turėtų VRQ alelį (Fediaevsky et al., 2010; Cameron et al., 2014).

### 1.4.3 Netipinė Scrapie

Atradus tikslesnius ir greitesnius metodus nustatyti prionines ligas buvo pradėti tikrinti žymiai didesni kiekiai avių. 2002 m. surastos kelios avys, kurių simptomai neatitiko visų klasikinės formos kriterijų. Ši nauja forma pavadinta netipine Scrapie (angl. *Atypical Scrapie*) (Fediaevsky et al., 2010; Wadsworth et al., 2013).

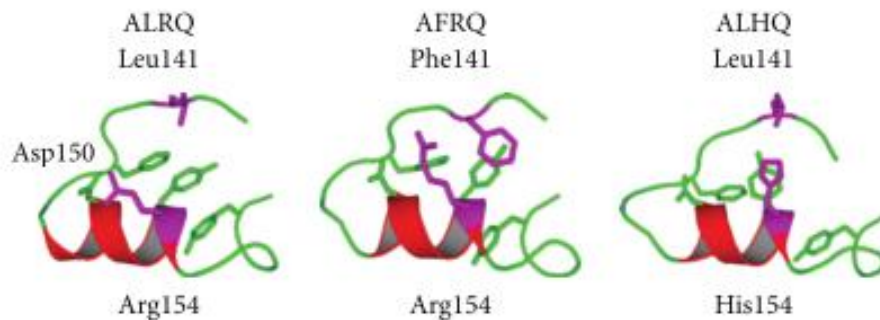
Netipinė Scrapie dažniausiai pasireiškia senose avyse ir manoma, kad ji nėra natūraliai užkrečiama. Siūloma teorija, kad netipinę Scrapie gali sukelti spontaniškas baltymo PrP<sup>C</sup>

virtimas PrP<sup>Sc</sup>, priešingai nei klasikinės Scrapie atveju, kada yra būtinas patogeniškos baltymo formos patekimas į organizmą (Yang et al., 2014). Ši Scrapie taip pat skiriasi nuo klasikinės tuo, kad prionai neplinta į limfinius audinius (Richt et al., 2014). Šis požymis toks pat ir natūraliai susiformavusiai ligos formai ir dirbtinai sukėlus netipinę Scrapie inokuliuojant užkratą į avies organizmą. (Fediaevsky et al., 2010).

Šis atradimas sukėlė abejonių dėl šiuo metu vykdomų selektyvių auginimo programų, nes netipinė Scrapie žymiai dažniau pasireiškia avyse, kurios turi genetinį atsparumą klasikinei formai (ARR/ARR genotipas) ir beveik nerandama VRQ/VRQ genotipo avyse. Tačiau vis dar nepatvirtinta ar nėra galimybės netipinei formai virsti klasikine ir taip užmaskuoti jos pasireiškimą VRQ/VRQ genotipo avyse. (Fediaevsky et al., 2010; Simmons et al., 2015; Cancedda et al., 2014).

Kompiuterinio modeliavimo metu buvo nustatyta, kad netipinės Scrapie atsiradimui daro įtaką aminorūgštys esančios 141 ir 154 pozicijose. Epidemiologiniai tyrimai parodė, kad avys, turinčios A136L141R154R171, A136F141R154Q171 ir A136L141H154Q171 alelius, gali susirgti šia liga. Didžiausias sergamumas nustatytas AFRQ ir ALHQ variantuose. (Yang et al., 2014; Fitzmaurice et al., 2008).

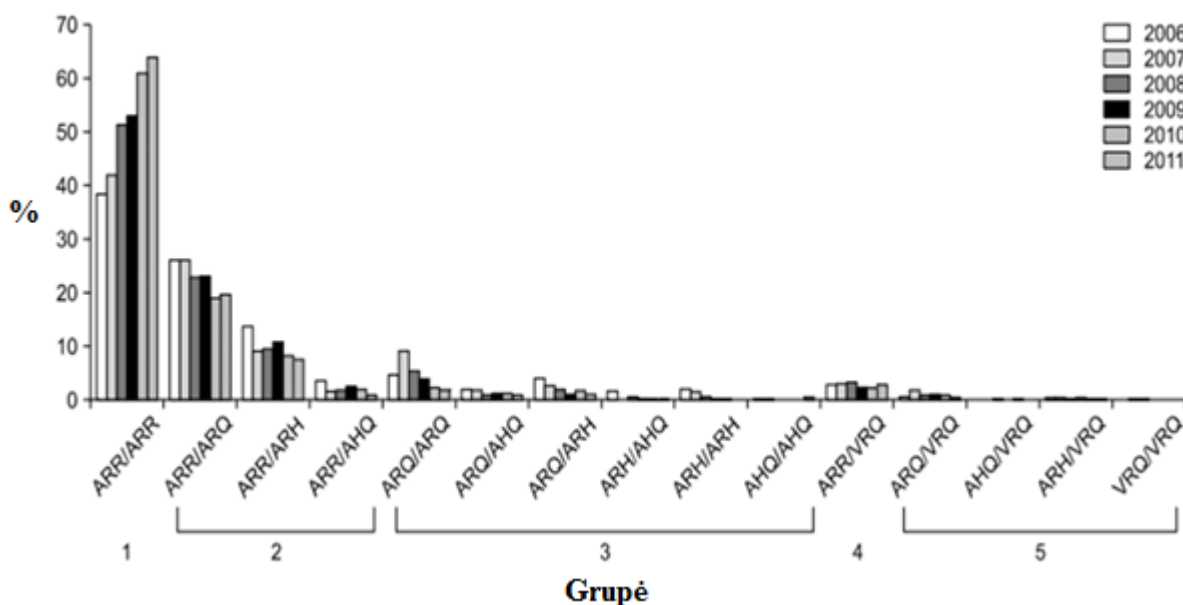
Regionas aplink Met157 alfa spiraleje-1 yra stipriai veikiamas 141 ir 154 aminorūgščių. Krūvį turinčios aminorūgščių liekanos alfa spiraleje-1 formuoja daug šoninių grandinių ryšių, kurie stabilizuoja spiralės struktūrą ir orientaciją (1.6 pav.). (Yang et al., 2014).



**1.6 pav.** ALRQ, AFRQ ir ALHQ 141 ir 154 pozicijų sąveikų kompiuterinis modelis (pagal Yang et al., 2014)

### 1.5 Avių prioninių baltymų genotipų pasiskirstymas

2004 metais Europos sąjunga įvedė avių veisimo programą, kuria buvo siekiama padidinti ARR ir sumažinti VRQ haplotipų dažnius. Nuo 2006 iki 2011 metų Belgijoje ARR/ARR homozigotinio genotipo dažnis padidėjo nuo 38,3% iki 63,8%, ARQ haplotipas sumažėjo nuo 21,1% iki 12,9%, o VRQ haplotipas sumažėjo nuo 2,0% iki 1,7% iš 6437 ištirtų avių (1.7 pav.) (Dobly, Heyden ir Roels, 2013).



1.7 pav. Genotipų dažnio pokyčiai Belgijoje nuo 2006 iki 2011 metų, suskirstyta į 5 grupes pagal genotipų tikimybę užsikrėsti klasikine Scrapie (pagal Dobly, Heyden ir Roels, 2013)

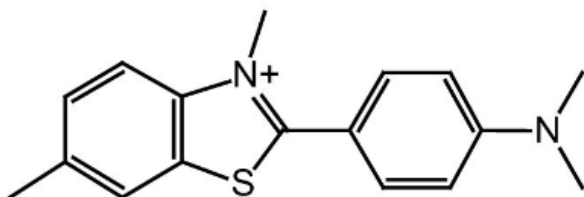
2002-2008 metais Suomijoje buvo vykdomas avių genotipų ir prioninių ligų susirgimų tyrimas, kurio metu buvo patikrinta daugiau nei 15 000 avių. Tyrimo metu nustatyta, kad labiausiai paplitęs haplotipas buvo ARQ (nuo 64,1% iki 91,7% priklausomai nuo avių rūšies). Visi kiti haplotipai, ARR, VRQ, AHQ, ARH ir AFRQ sudarė likusius 8,3% - 35,9%). Iš visų tirtų avių tik penkioms buvo nustatyta netipinė Scrapie liga. Klasikinės Scrapie susirgimų nenustatyta. (Hautaniemi et al., 2012).

### 1.6 Prionų agregacija *in vitro*

Tyrinėjant prionų agregaciją *in vitro* buvo nustatyta, kad PrP<sup>C</sup> gali agreguoti sudarydamas fibriles panašias į randamas *in vivo*, tačiau šie agregatai turi mažesnes proteazėms atsparias

sritis ir jų infektyvumas žymiai silpnesnis. Smegenyse randami PrP<sup>Sc</sup> sudaro beta struktūras 90-230 aminorūgščių srityje, o *in vitro* agregatai tik 160-220 srityje. (Mito, Michailova ir Smirnovas, 2014).

Prioninių baltymų agregaciją *in vitro* galima stebėti naudojant dažą tioflaviną T (ThT) (1.8 pav.). Agregacijos metu susiformavusios amiloidinės fibrilės turi statmenai jų ilgiui išsidėsčiusius beta struktūrų griovelius, į kuriuos gali patekti ThT. Patekus į šiuos griovelius, ThT molekulės benzilamino žiedas nebegali suklotis likusios struktūros atžvilgiu per bendrą jungtį. Tai sustabdo ThT molekulės vienoje konformacijoje ir žymiai padidina jų fluorescencijos intensyvumą. (Biancalana ir Koide, 2011).



**1.8 pav.** Tioflavino T molekulinė struktūra (pagal Biancalana ir Koide, 2011)

Dėl tiesioginės priklausomybės tarp fluorescencijos intensyvumo ir agregatų koncentracijos, galima tirti prioninių baltymų agregacijos kinetiką esant skirtingoms temperatūroms, guanidino hidroklorido koncentracijoms ir druskų koncentracijoms. (Levine, 1993).



## **2. Medžiagos ir metodai**

### **2.1 Naudotos medžiagos, tirpalai, sorbentai ir įrenginiai**

#### **2.1.1 Laboratorinė įranga**

Autoklavas: „Raypa AHS-75N“.

Centrifugos: „Eppendorf 5424“ (F-45-18-11-Kit rotorius); HeroLab HiCen SR (AF 6.500, AF 8.50.2 rotoriai) ;

Chromatografijos sistema „ÄKTApurifier“ (GE Healthcare);

Chromatografinė kolonėlė „XK26/20“ (GE Healthcare)

Dializės žarna: 28.7 mm diametro „Fisher Scientific BioDesignDialysis Tubing“, kurios pralaidumas 6-8 kDa.

Elektroforezės aparatai: „Biometra Minigel-Twin“ su „Biometra PS300T“ srovės šaltiniu.

Filtrai: 0,22 µm porų skersmens, 47 mm diametro „Fisher Scientific“.

Filtravimo indai: „Millipore Durapore™“ 0,22 µm porų dydžio, 73 mm diametro ir 150 ml tūrio.

Koncentratoriai: „Amicon® Ultra – 15“, kurių pralaidumas 10 kDa.

Magnetinės maišyklės: „VARIOMAG Maxi Direct“, „VELP Scientifica® ARE“;

Mikroplokštelių sandarinimo juosta „Nunc“

Mikroplokštelių skaitytuvas „Synergy H4 Hybrid Multi-Mode“

pH metras: „Thermo Scientific Orion DUAL STAR meter“.

Purtyklė „KS 4000i“ (IKA);

Rankinis homogenizatorius „Potter-Elvehjem“ (Sigma-Aldrich);

Realaus laiko PGR analizatorius „Rotor-Gene Q real-time analyzer“ (QIAGEN);

Refraktometras „RL3“ (PZO);

Spektrofotometrai: „Shimadzu Scientific Instruments UV-1800“ ir „Varian Cary Eclipse“.

Svarstyklės: „Kern PCB 1000-2“, „Denver Instruments TP-214“

Termostatai: „Fisher Scientific IB-15G“, „Eppendorf Thermostat plus“

Termostatuojamos purtyklės: „DITABIS MHR 23“.

Ultragarsinis homogenizatorius: „Bandelin Sonopuls“.

Vakuminė filtravimo sistema: „Sigma-Aldrich“.

Švirkštinis filtras (diametras – 30 mm, porų dydis - 0,22 U/μl);

96 šulinėlių mikroplokštelės: „Corning“.

### **2.1.2 Medžiagos**

Acros Organics: natrio sulfatas 99%, amonio chloridas 99,6 %, glicerolis 99%, natrio hidroksidas 98,5 %, guanidino hydrochloridas 98%, natrio fosfatas (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), HCl 37%, NaOH 50%, amonio persulfatas (APS) 99,5%.

Oxoid: mielių ekstraktas,

Carl Roth: kalio dihidrofosfatas 99%, kazeino hidrolizatas, TRIS, ampicilinas, glutationas 98%.

Fisher Scientific: magnio sulfatas, laktozė, imidazolas, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dekstrozė, TEMED, NDS, AA/BAA, molekulinės masės žymuo „Unstained protein marker“, elektroforezės gelių dažas „ThermoFisher Ez-Run Protein Gel Staining Solution“, 4X baltymų dažas.

Sigma-Aldrich: Tioflavinas T (ThT).

### **2.1.3 Buferiniai tirpalai**

**A1.** 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8). pH koreguojamas HCl tirpalu ir filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

**A3.** 700 mM imidazolo, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, (pH 5,8). pH koreguojamas HCl tirpalu ir filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

**B1.** 6 M guanidino hydrochlorido, 10 mM glutationo, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, (pH 8). Guanidino hydrochloridas, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ir Tris-HCl ištirpinami dejonizuotame vandenyje. Tirpinama šildant iki 50 °C ir atvėsęs tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą. Refraktometru išmatuojamas guanidino hydrochlorido tirpalo lūžio rodiklis ir apskaičiuojama tiksli GuHCl koncentracija. Prieš pat naudojant į buferinį tirpalą pridedama

glutationo ir NaOH tirpalu pH koreguojamas iki 8. Praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 6M guanidino hidroklorido koncentracijos.

C. 10 mM acetatinis buferinis tirpalas, (pH 4). Santykiu 3:1 sumaišomi 1 M CH<sub>3</sub>COOH ir 1 M CH<sub>3</sub>COONa. pH koreguojamas NaOH arba HCl tirpalais, tada tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu.

D. 6 M GuHCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buferinis tirpalas. Sumaišius GuHCl ir NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą, GuHCl koncentracija nustatoma refraktometru, tirpalo pH koreguojama iki reikiamos vertės su NaOH arba HCl. Tada tirpalas skiedžiamas iki tikslios 6 M GuHCl koncentracijos dejonizuotu vandeniu.

E. 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buferinis tirpalas. Pagamintas tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą. pH koreguojamas iki reikiamos vertės su NaOH arba HCl.

#### 2.1.4 Sorbentas

GE Healthcare: „Ni Sepharose™ 6 Fast Flow“

#### 2.1.5 Ląstelės

Kompetentinės *E. coli* BL21(DE3) ląstelės

#### 2.1.6 Plazmidės

pOPINE-Sheep-PrPARQ23-234 ir pOPINE-Sheep-PrPVRQ23-234 (gautos iš prof. Joaquin Castilla)

PrPARQ23-234 aminorūgščių seka:

MKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGW  
GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQGGSHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGGLG  
GYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPPVDQYSNQNNFVHDCVN  
ITVKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGAS

PrPVRQ23-234 aminorūgščių seka:

MKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGW  
GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQGGSHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGGLG  
GYMLGSVMSRPLIHFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYYRPPVDQYSNQNNFVHDCVN  
ITVKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGAS

### 2.1.7 Terpės

**S.O.C. mitybinė terpė.** Vienam litrai terpės reikia: 20 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, 10 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>, 10 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 20 mM gliukozės ir dejonizuoto vandens, kad galutinis tūris būtų 1 l. Paruošta terpė autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje. Atšaldžius pridedama 20 ml 1 M gliukozės, kuri prieš tai filtruojama per 0,2 μm polivinilidino difluorido filtrą; išpilstoma nedideliu tūriu ir laikoma -20 °C temperatūroje.

**Skysta LB (Luria-Bertani) mitybinė terpė.** 25 g terpės (miltelių pavidalu) ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens;

**Auto-induktyvi mitybinė terpė ZYM-5052.** Terpė ruošiama pagal 2.1 lentelę;

**2.1 lentelė.** ZYM-5052 auto-induktyvios terpės komponentai.

| Komponentai                            | Kiekis reikalingas 1,6 L terpės |
|--|---------------------------------|
| Kazeino hidrolizatas (1 %)             | 16 g                            |
| Mielių ekstraktas (0,5 %)              | 8 g                             |
| 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 5,68 g                          |
| 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 5,44 g                          |
| 50 mM NH <sub>4</sub> Cl               | 4,28 g                          |
| 5 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 1,12 g                          |
| 2 mM MgSO <sub>4</sub>                 | 0,784 g                         |
| 0,5 % glicerolis                       | 8 g                             |
| 0,05 % gliukozė                        | 0,8 g                           |
| 0,2 % laktozė                          | 3,2 g                           |
| 100 mg/l ampicilinas                   | 1,6 ml                          |

## **2.2 Metodai**

### **2.2.1 Kompetentinių E.coli BL21(DE3) ląstelių transformacija**

Paruošiamos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, kurioje yra 100 µg/ml ampicilino. Į 100 µl kompetentinių E. coli BL21(DE3) ląstelių įpilama 1 µl tirpalo su pOPINE-Sheep-PrPARQ23-234 plazmidėmis ir atsargiai sumaišoma. Pagamintas mišinys inkubuojamas lede 30 min. Vykdomas karščio šokas. Mišinys termostate laikomas 42 °C temperatūroje 90s ir vėliau perkeliamas į ledo vonelę, kur jis inkubuojamas 2 min. Įpilama 400 µl S.O.C. terpės ir transformuotos bakterijos auginamos termostatinėje purtyklėje 45 min, 37 °C, 220 apm. Ląstelės išsėjamos paruoštose Petri lėkštelėse ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu. Procesas kartojamas su pOPINE-Sheep-PrPVRQ23-234 plazmide.

### **2.2.2 Transformuotų ląstelių auginimas auto-induktyvioje terpėje**

Paruošiama 200 ml LB terpės su ampicilinu ir į ją užsėjama viena transformuotų ląstelių kolonija. Auginama per naktį 37°C 220 apm.

Paimama po 10 µl iš naktinės kultūros ir užsėjama į kelias kolbas turinčias 400 ml auto-induktyvios terpės, paruoštos pagal 2.1 lentelę. Kolbos patalpinamos termostatinėje purtyklėje ir ląstelės auginamos 37 °C, 220 apm.

Po užsėjimo, kelis kartus, kas valandą paimami mėginiai nustatyti baltymo raiškos padidėjimui. Po 15 valandų auginimo, terpė su ląstelėmis centrifuguojama 30 min. 5000 x g. Nupilamas centrifugatas, o biomasė surenkama ir užšaldoma -80 °C.

### **2.2.3 Baltymų raiškos nustatymas elektroforezės būdu**

#### **Mėginių paruošimas**

Nustatomas visų auginimo metu paimtų mėginių optinis tankis. Kad būtų galima palyginti baltymų raiškos skirtumus, ląstelių kiekis visuose mėginiuose turi būti vienodas. Žinant visų mėginių optinius tankius pagal lygybę:

$$V_1 \times OT_1 = V_x \times OT_x$$

čia  $V_1$  – mažiausio optinio tankio ląstelių mėginio tūris,  $OT_1$  – mažiausio optinio tankio ląstelių mėginio optinis tankis,  $V_x$  ir  $OT_x$  – kitų mėginių tūriai ir optiniai tankiai, galima apskaičiuoti reikiamus mėginių tūrius, kad ląstelių kiekiai būtų vienodi. Apskaičiuoti tūriai supilami į atskirus mėgintuvėlius ir centrifuguojami 5 min, 6000 apm; nupilamas centrifugatas ir ant nuosėdų pilama 30  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O ir 10  $\mu$ l 4X baltymų dažo. Mišinys 10 min inkubuojamas 98 °C temperatūroje.

### **Elektroforezės gelių paruošimas**

Pagal 2.3 lentelę sumaišomos skiriamąjo gelio medžiagos (APS ir TEMED supilami paskutiniai, nes jie sukelia polimerizacijos reakciją ir gelio stingimą). Pagamintas tirpalas pilamas tarp elektroforezės plokštelių ir ant jo užpilama dH<sub>2</sub>O. 45 min laukiama kol gelis sustings. Pavertus plokšteles nupilamas vanduo.

Pagal 2.3 lentelę sumaišomos koncentruojamojo gelio medžiagos (APS ir TEMED supilami paskutiniai). Mišinys pilamas tarp elektroforezės plokštelių ant skiriamąjo gelio. Tarp plokštelių į koncentruojamąjį gelį įstatomos „šukos“ ir 30 min laukiama kol gelis sustings.

Sustingus koncentruojamajam geliui, elektroforezės plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą ir aparatas pripildomas elektroforezės buferiu iki atžymų. Atsargiai išimamos „šukos“ ir į susidariusius „šulinėlius“ pripilama po 10  $\mu$ l paruoštų mėginių ir į vieną gretimą šulinėlį įpilama Unstained protein marker. Įjungus prietaisą nustatoma 30 mA srovė ir 150 mV įtampa. Elektroforezė vykdoma kol dažas pasiekia skiriamąjo gelio apačią. Išjungus prietaisą išimamos elektroforezės plokštelės ir tarp jų esantis gelis. Gelis dažomas su „ThermoFisher Ez-Run Protein Gel Staining Solution“ dažais purtyklėje 1h kambario temperatūroje ir blukinamas vandeniui.

**2.2 lentelė.** Elektroforezės skiriamąjo ir koncentruojamojo gelio komponentai ir jų kiekiai.

| Skiriamasis gelis (12%) |         | Koncentruojamasis gelis (4%) |         |
|-------------------------|---------|------------------------------|---------|
| dH <sub>2</sub> O       | 2,55 ml | dH <sub>2</sub> O            | 1,27 ml |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) | 1,53 ml | 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)      | 500 µl  |
| 40 % AA/BAA             | 1,83 ml | 40 % AA/BAA                  | 201 µl  |
| 10 % NDS                | 61 µl   | 10 % NDS                     | 20 µl   |
| 10 % APS                | 30,5 µl | 10 % APS                     | 10 µl   |
| TEMED                   | 3,65 µl | TEMED                        | 2 µl    |

### 2.2.4 Baltymų gryninimas

#### Biomosės homogenizavimas

Transformuotose *E. coli* ląstelėse ekspresuojami prioniniai baltymai susikaupia tarpiniuose kūneliuose ir būna netirpūs. Todėl prieš vykdant gryninimą, baltymas turi būti denatūruojamas guanidino hidroklorido tirpalu, o gryninimo metu - renatūruojamas. (Völkel, Blankenfeldt, ir Schomburg, 1998).

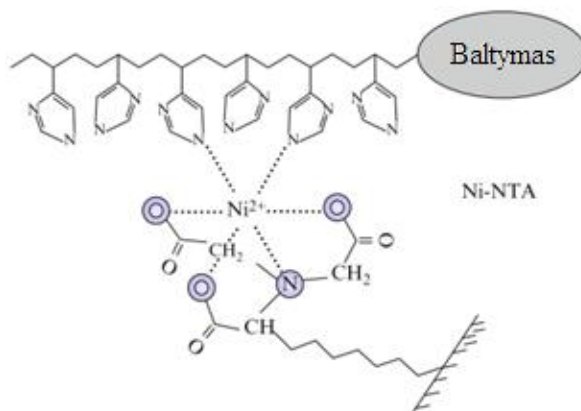
Atšildyta ląstelių biomasė suspenduojama 100 ml B1 buferinio tirpalo. Homogenizuojama ir ardoma ultragarsu ledų vonelėje (20 min, 70 % amplitudė, 60 s veikimo/ 60 s poilsio režimas). Homogenatas centrifuguojamas 4 °C 30 min 17000 aps/min. Supernatantas nupilamas nuo nuosėdų ir atskiedžiamas 50 ml A1 buferinio tirpalo. Atskiestas tirpalas pilamas į B1/A1 (2:1) buferiniu tirpalu nupusiausvyrintą sorbentą ir gautas mišinys lėtai maišomas 4 °C, 45 min.

#### Imobilizuoto metalo jonų afininė chromatografija (IMAC)

Imobilizuoto metalo jonų afininė chromatografija yra baltymų gryninimo metodas paremtas afiniškumu tarp metalo jonų ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) ir histidino šoninės grupės. Metalo jonai būna pritvirtinti prie agarozės naudojant chelatinčius ligandus: iminodiacto rūgštį (IDA) arba nitrilotriacto rūgštį (NTA). IMAC ligandai gali jungtis prie kelių nuosekliai grandinėje esančių

histidino liekanų arba liekanų esančių tandeminiuose sekos pasikartojimuose. (Block et al., 2009).

NTA ligandas sudaro keturis koordinacinius ryšius su  $Ni^{2+}$ , tai palieka dar du ryšius sąveikai su histidinių šoninėmis grupėmis (2.1 pav.).



**2.1 pav.** Ni-NTA sąveika su dviem histidinių šoninėmis grupėmis. (Block et al., 2009)

IMAC afiniškumas yra pats didžiausias baltymams turintiems 6 arba 7 nuosekliai einančias histidino liekanas (His-Tag), tačiau yra galimybė prisijungti ir His-Tag neturinčius baltymus, kurie turi keletą histidino liekanų gebančių tirpale priartėti prie  $Ni^{2+}$  jonų. (Block et al., 2009).

Chromatografinė kolonėlė užkraunama sorbentu ir prijungiama prie chromatografinės sistemos. Kolonėlė praplaunama B1/A1 (2:1) tirpalu kol nebefiksuojamasis optinio tankio pokytis. Baltymas renatūruojamas keičiant GuHCl koncentraciją nuo 4 M iki 0 M per 132 min 1 ml/min greičiu. Baltymas nuo sorbento atskiriamas per kolonėlę leidžiant A3 buferinį tirpalą 3ml/min greičiu. Tirpalas frakcionuojamas po 10ml. Pagal programos rodmenis, frakcijos turinčios baltymą sujungiamos.

### Dializė

Tirpalas su baltymu supilamas į dializės žarnelę, kuri patalpinama 4 L C buferinio tirpalo ir lėtai maišant laikoma 4 °C. Buferinis tirpalas pakeičiamas kas 4 val. du kartus Po dializės baltymo tirpalas filtruojamas švirkštiniu filtru (diametras – 30 mm, porų dydis - 0,22 U/μl).



## Koncentracijos nustatymas

Spektrofotometru nustatomas baltymo tirpalo optinis tankis ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) ir apskaičiuojama baltymo koncentracija (mg/ml) pagal formulę:

$$C = \frac{A \times M}{\epsilon \times l}$$

čia  $A$  – tirpalo optinis tankis ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ),  $M$  – baltymo molinė masė,  $\epsilon$  - baltymo ekstinkcijos koeficientas,  $l$  – kiuvetės storis.

### 2.2.5 Baltymų terminio stabilumo tyrimas

Pagal lenteles 2.3 ir 2.4 paruošiami mėginiai terminio stabilumo tyrimui. Naudojamas realaus laiko PGR analizatorius „Rotor-Gene Q real-time analyzer“. Stebimas ANS fluorescencijos emisijos intensyvumo pokytis kintant temperatūrai. ANS fluorescencijos emisijos intensyvumas padidėja jam prisijungus prie hidrofobinių baltymo sričių.

**2.3 lentelė.** PrPARQ terminio stabilumo tyrimo komponentai ir jų kiekiai.

|  |       |       |
|--|-------|-------|
| GuHCl konc., M                             | 0     | 0,5   |
| D buferinis tirpalas (pH 6), $\mu\text{l}$ | 0     | 5,83  |
| ANS, $\mu\text{l}$                         | 0,7   | 0,7   |
| Baltymas PrPARQ (2,7 mg/ml), $\mu\text{l}$ | 41,22 | 41,22 |
| E buferinis tirpalas (pH 6), $\mu\text{l}$ | 28,08 | 22,25 |

**2.4 lentelė.** PrPVRQ terminio stabilumo tyrimo komponentai ir jų kiekiai.

|   |       |       |
|---|-------|-------|
| GuHCl konc., M                              | 0     | 0,5   |
| D buferinis tirpalas (pH 6), $\mu\text{l}$  | 0     | 5,83  |
| ANS, $\mu\text{l}$                          | 0,7   | 0,7   |
| Baltymas PrPVRQ (3,58 mg/ml), $\mu\text{l}$ | 31,09 | 31,09 |
| E buferinis tirpalas (pH 6), $\mu\text{l}$  | 38,21 | 32,38 |

### 2.2.6 Spontininės baltymų agregacijos tyrimai

Pagal lenteles 2.5 ir 2.6 paruošiami mėginiai su skirtingomis pH vertėmis (nuo 2 iki 9) ir su skirtingomis guanidino hidroklorido koncentracijomis (nuo 0 M iki 4,5 M). Mėginiai supilstomi į 96 šulinėlių plokštelę, į kiekvieną šulinėlį įdedamas stiklinis rutuliukas ir plokštelė patalpinama į plokštelių skaitytuvą. Stebima prioninių baltymų agregacijos kinetika matuojant ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo pokytį įvairiomis sąlygomis esant maišymui. Per ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybės nuo laiko taškus brėžiama sigmoidinė kreivė pagal formulę:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x-x_0)}{dx}}} + A_2$$

čia  $y$  – fluorescencijos intensyvumas,  $x_0$  – laikas, per kurį suagreguoja pusė baltymo (min),  $A_1$  – kreivės minimumo vertė,  $A_2$  – kreivės maksimumo vertė,  $dx$  – kreivės nuolinkis,  $x$  – laikas (min).

**2.6 lentelė.** PrPARQ spontaninės agregacijos tyrimo komponentai ir jų kiekiai.

|  |        |        |        |        |       |
|--|--------|--------|--------|--------|-------|
| GuHCl koncentracija, M                 | 0      | 0,5    | 1      | 1,5    | 2     |
| D buferinis tirpalas (pH 2-9), $\mu$ l | 0      | 16,67  | 33,33  | 50     | 66,67 |
| E buferinis tirpalas (pH 2-9), $\mu$ l | 159,74 | 143,07 | 126,41 | 109,74 | 93,07 |
| Baltymas, PrPARQ (2,7 mg/ml), $\mu$ l  | 39,26  | 39,26  | 39,26  | 39,26  | 39,26 |
| Tioflavinas T (10mM), $\mu$ l          | 1      | 1      | 1      | 1      | 1     |

|                                       |       |       |        |        |       |
|---------------------------------------|-------|-------|--------|--------|-------|
| GuHCl koncentracija, M                | 2,5   | 3     | 3,5    | 4      | 4,5   |
| D buferinis tirpalas, $\mu$ l         | 83,33 | 100   | 116,67 | 133,33 | 150   |
| E buferinis tirpalas, $\mu$ l         | 76,41 | 59,74 | 43,07  | 26,41  | 9,74  |
| Baltymas, PrPARQ (2,7 mg/ml), $\mu$ l | 39,26 | 39,26 | 39,26  | 39,26  | 39,26 |
| Tioflavinas T (10mM), $\mu$ l         | 1     | 1     | 1      | 1      | 1     |

**2.7 lentelė.** PrPVRQ spontaninės agregacijos tyrimo komponentai ir jų kiekiai.

|                                   |        |       |        |        |       |
|-----------------------------------|--------|-------|--------|--------|-------|
| GuHCl koncentracija, M            | 0      | 0,5   | 1      | 1,5    | 2     |
| D buferinis tirpalas (pH 2-9), µl | 0      | 16,67 | 33,33  | 50     | 66,67 |
| E buferinis tirpalas (pH 2-9), µl | 171,07 | 154,4 | 137,74 | 121,07 | 104,4 |
| Baltymas, PrPVRQ (3,58 mg/ml), µl | 27,93  | 27,93 | 27,93  | 27,93  | 27,93 |
| Tioflavinas T (10mM), µl          | 1      | 1     | 1      | 1      | 1     |

|                                   |       |       |        |        |       |
|-----------------------------------|-------|-------|--------|--------|-------|
| GuHCl koncentracija, M            | 2,5   | 3     | 3,5    | 4      | 4,5   |
| D buferinis tirpalas (pH 2-9), µl | 83,33 | 100   | 116,67 | 133,33 | 150   |
| E buferinis tirpalas (pH 2-9), µl | 87,74 | 71,07 | 54,4   | 37,74  | 21,07 |
| Baltymas, PrPVRQ (3,58mg/ml), µl  | 27,93 | 27,93 | 27,93  | 27,93  | 27,93 |
| Tioflavinas T (10mM), µl          | 1     | 1     | 1      | 1      | 1     |

**2.2.7 PrPARQ ir PrPVRQ fibrilių ilgėjimo tyrimai**

**Agregatų paruošimas**

Paruošiami 0,5 mg/mL baltymo mėginiai 2 M GuHCl; 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6 fosfatiniame buferyje ir lėtai vartant inkubuojami 3 dienas 37 °C temperatūroje. Kasdien tikrinamas agregatų susidarymas matuojant ThT fluorescencijos intensyvumą (sužadinimas 450 nm, emisijos matavimas 460-530 nm bangų ilgio srityje). Prieš tyrimą agregatai ardomi ultragarsu ledų vonelėje (10 min, 20 % amplitudė, 30 s veikimo/ 30 s poilsio režimas), kad dideli agregatai būtų suskaidyti į mažesnius, taip sukuriant daugiau prisijungimo vietų monomerams.

**Fibrilių ilgėjimo tyrimai**

Pagal 2.8 lentelę paruošiami mėginiai (ultragarsu ardyti agregatai įpilami paskutiniai). Kiekvienas mėginys išpilstomas į 4 mėgintuvėlius po 20 µl, kurie patalpinami į Rotor Gene-Q prietaisą. Tyrimai vykdomi temperatūrų intervale nuo 65 °C iki 90 °C. Stebima tioflavino T fluorescencijos emisijos intensyvumo nuo laiko priklausomybė. Duomenys gluodinami eksponentine kreive pagal modifikuotą Arenijaus lygtį:

$$y=1-Ae^{(-kx)}$$

čia  $y$  – santykinis ThT fluorescencijos emisijos intensyvumas ( $\frac{I}{I_{max}}$ ),  $A$  – monomerų dalis mišinyje,  $k$  – pradinio fibrilių ilgėjimo greičio konstanta,  $x$  – laikas (min).

Apskaičiavus  $k$  vertes brėžiami  $k$  verčių priklausomybės nuo temperatūros grafikai Arenijaus koordinatėse. Per šių grafikų taškus nubrėžus tieses ir apskaičiavus tiesių krypties koeficientus, galima apskaičiuoti fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energijas pagal lygtį:

$$E_a = m \times R$$

čia  $E_a$  – fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energija,  $m$  – tiesės krypties koeficientas,  $R$  – idealiųjų dujų konstanta.

**2.8 lentelė.** PrPARQ ir PrPVRQ fibrilių ilgėjimo tyrimų mėginių komponentai ir kiekiai.

| Baltymas              | PrPARQ        | PrPVRQ        |
|-----------------------|---------------|---------------|
| Baltymo koncentracija | 2,51 mg/ml    | 3,58 mg/ml    |
| GuaHCl koncentracija  | 0,5 M         | 0,5 M         |
| E buferinis tirpalas  | 31,58 $\mu$ l | 36,93 $\mu$ l |
| Baltymas              | 17,92 $\mu$ l | 12,57 $\mu$ l |
| Agregatai (0,5 mg/ml) | 50 $\mu$ l    | 50 $\mu$ l    |
| Tioflavinas T (10 mM) | 0,5 $\mu$ l   | 0,5 $\mu$ l   |

### 3. Rezultatai

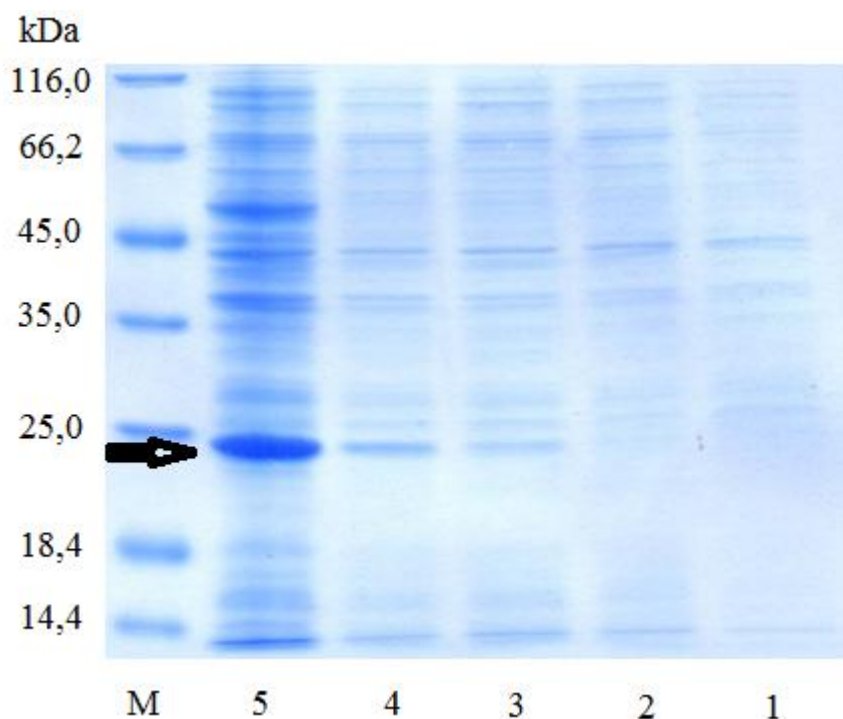
#### 3.1 Avių PrPARQ ir VRQ gryninimas

##### 3.1.1 *E. coli* transformacija ir PrPARQ, PrPVRQ raiška

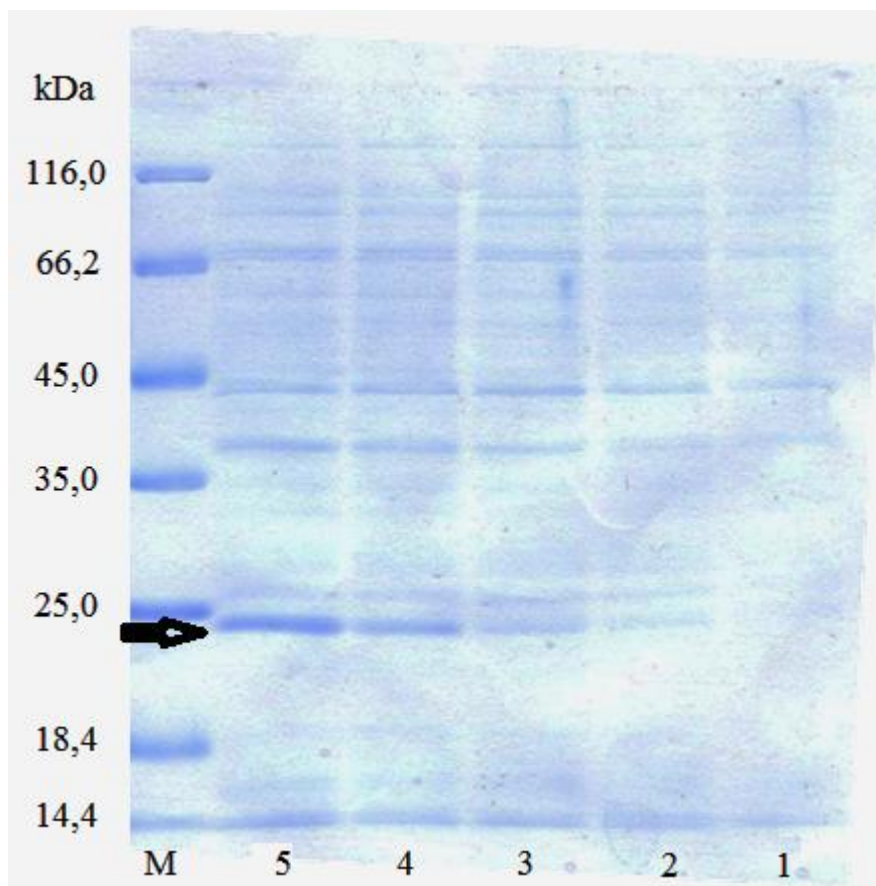
Transformacijai naudoti du *E. coli* BL21(DE3) ląstelių mėginiai, vienas transformuotas su pOPINE-Sheep-PrPARQ, kitas su pOPINE-Sheep-PrPVRQ plazmidėmis. Bakterijos išsėtos ant agarizuotos mitybinės terpės ir inkubuotos 37 °C temperatūroje. Pasirinkus po vieną užaugusią koloniją užsėtos naktinės kultūros.

Iš naktinės kultūros užsėtos 4 kolbos su 400 ml auto-induktyvios mitybinės terpės. Auginta 15 val., kas kelias valandas paimti kultūros mėginiai raiškos analizei.

Baltymų raiška nustatoma elektroforezės būdu po mėginių ląstelių kiekio sulyginimo (3.1 pav.).



**3.1 pav.** PrPARQ raiškos tyrimo elektroforeograma. PrPARQ masė yra apie 22,9 kDa. M – molekulinės masės žymuo, 1 – ląstelių mėginys po 3 val. auginimo, 2 – ląstelių mėginys po 4 val., 3 – ląstelių mėginys po 5 val. 4 – ląstelių mėginys po 6 val. 5 – ląstelių mėginys po 8 val.



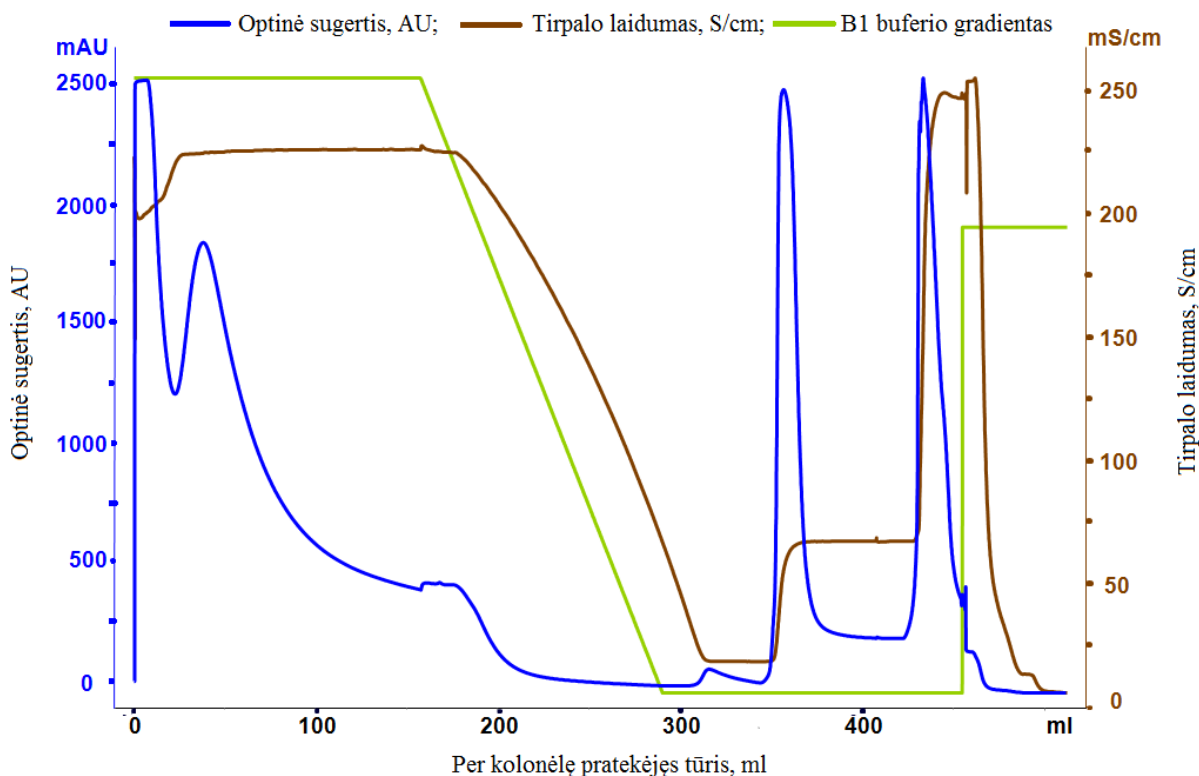
**3.2 pav.** pav. PrPVRQ raiškos tyrimo elektroforeograma. PrPVRQ masė yra apie 22,9 kDa. M – molekulinės masės žymuo, 1 – ląstelių mėginys po 3 val. auginimo, 2 – ląstelių mėginys po 4 val., 3 – ląstelių mėginys po 5 val. 4 – ląstelių mėginys po 6 val. 5 – ląstelių mėginys po 8 val.

Abiejų transformantų baltymo raiškos indukcija buvo sėkminga.

### 3.1.2 Afininė chromatografija

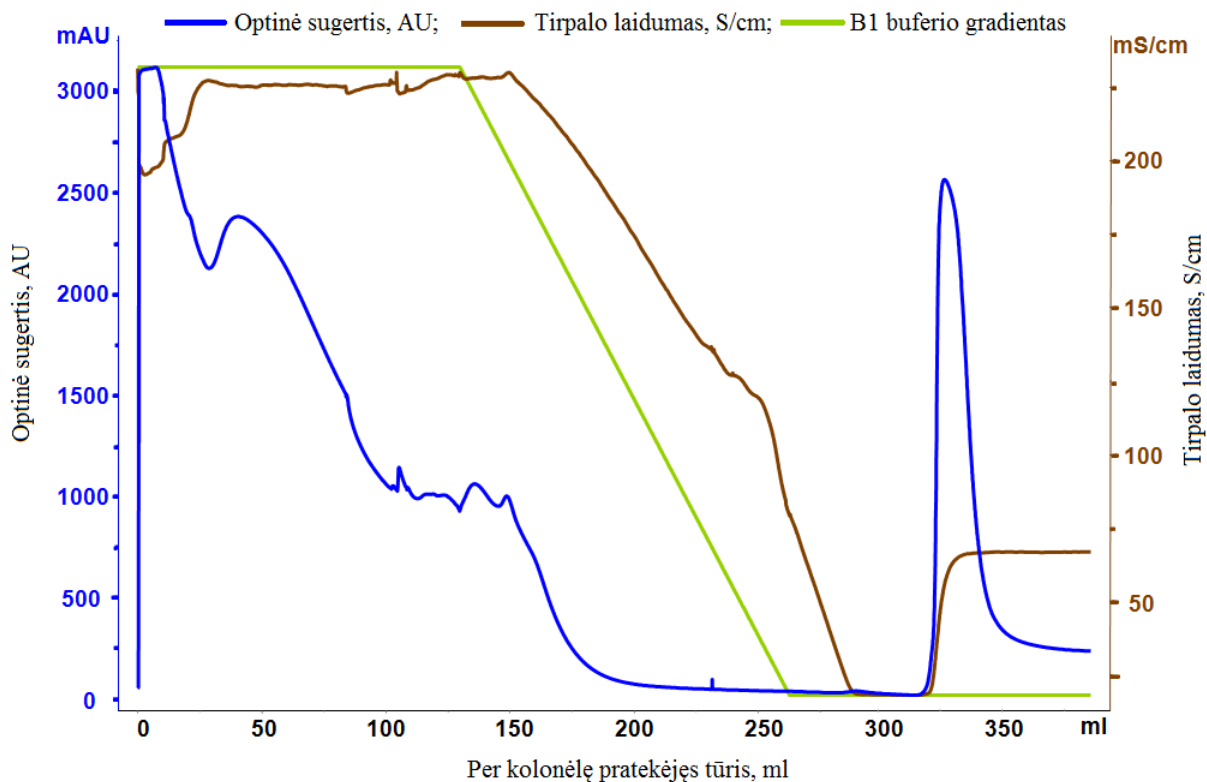
Kadangi mūsų laboratorijoje anksčiau buvo gryninti prioniniai baltymai su His-Tag, standartinė procedūra buvo renatūracija ant  $\text{Ni}^{2+}$  kolonėlės. Nors mūsų konstrukto atveju His-Tag nėra, tačiau baltymo nestruktūrizuotame N-gale yra septyni histidiniai, iš kurių keturi yra oktapeptidiniuose pasikartojimuose, kurie geba prisijungti prie  $\text{Ni}^{2+}$ . Baltymas renatūruotas keičiant  $\text{GuHCl}$  koncentraciją nuo 6 M iki 0 M per 200 min tačiau pastebėta labai maža baltymo išeiga. Dėl didelės  $\text{GuHCl}$  koncentracijos prioniniai baltymai neprisijungė prie sorbento.

Bandant padidinti išeią buvo atliktas kitas gryninimas kurio metu, prieš maišant su sorbentu, ląstelių homogenatas buvo atskiestas A1 buferiu iki 4 M GuHCl koncentracijos, per sorbentą leistas B1/A1 4 M GuHCl mišinys, o renatūracija vykdyta keičiant GuHCl koncentraciją nuo 4 M iki 0 M per 132 min.



**3.3 pav.** PrPARQ gryninimo proceso chromatograma. Chromatogramoje pavaizduotas sugerties kitimas matuojamas ties 280 nm bangos ilgiu, B1 buferinio tirpalo gradientas ir tirpalo laidumas. 300-400 ml tūrio ribose matoma sėkmingai išgryninto baltymo optinės sugerties smailė, 400-500 ml tūrio ribose matoma atskirto nuo sorbento suagregavusio baltymo smailė.

Norint patikrinti gryninimo efektyvumą buvo panaudotas B1 buferinis tirpalas su 700 mM imidazolo. Šiuo tirpalu eliuotas ant sorbento suagregavęs baltymas. Pagal PrPARQ gryninimo chromatogramą 3.3 pav matome, kad sėkmingai išgryninto ir suagregavusio baltymo kiekiai yra panašūs. Nors gryninimo išeią yra tik apie 50 %, tačiau tai žymiai daugiau nei standartinės His-Tag gryninimo procedūros metu, kai naudotas GuHCl gradientas nuo 6 M.



**3.4 pav.** PrPVRQ afininės chromatografijos chromatograma. Chromatogramoje pavaizduotas sugerties kitimas matuojamas ties 280 nm bangos ilgiu, B1 buferio gradientas ir tirpalo laidumas.

Abiejų baltymų gryninimas buvo sėkmingas (3.3 pav., 3.4 pav.) ir šis metodas buvo taikomas visuose tolimesniuose gryninimuose.

Po gryninimo frakcijos, turinčios baltymą, buvo sujungtos ir vykdyta dializė su C buferiniu tirpalu pagal 2.2.4 dializės metodą. Po dializės baltymo tirpalas filtruotas ir koncentruotas.

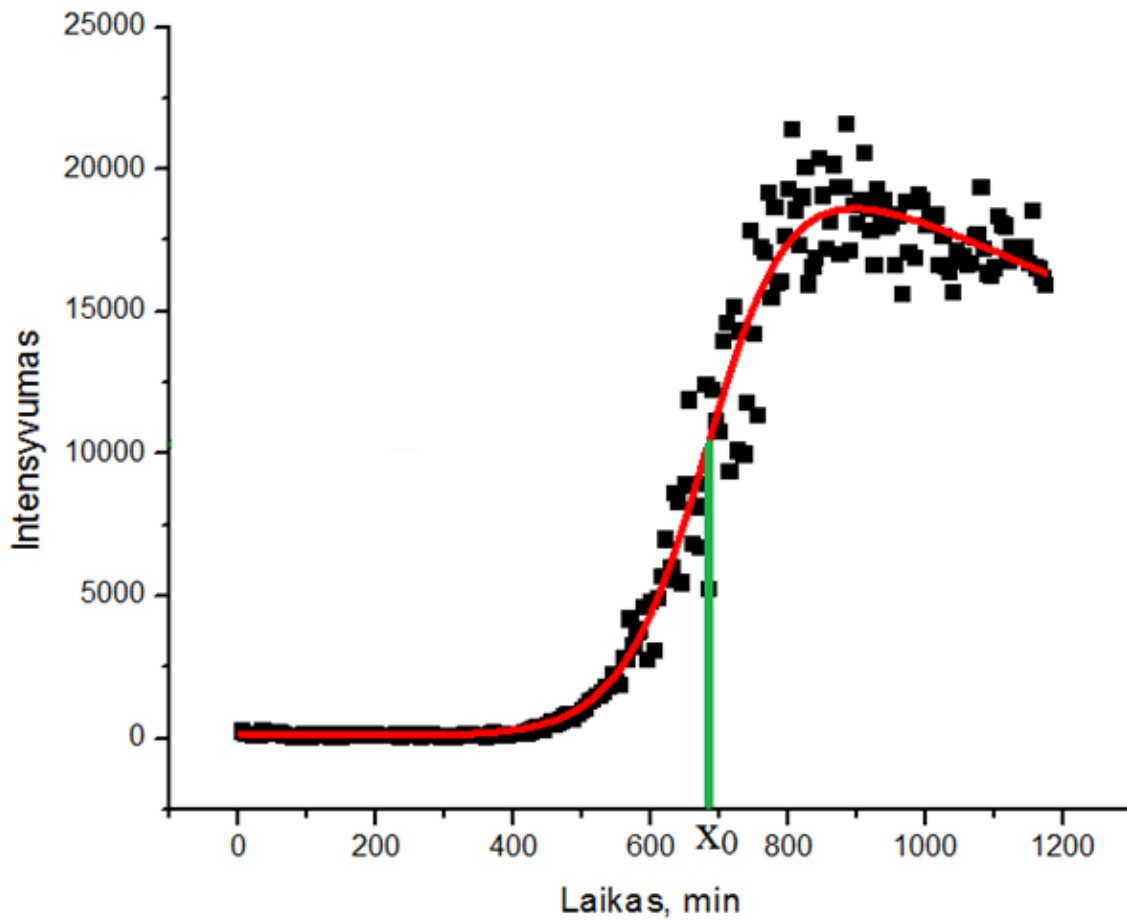
### 3.2 PrPARQ ir PrPVRQ spontaninės agregacijos tyrimai

Pagal 2.2.6 atlikti spontaninės agregacijos tyrimai. Tyrimų metu nustatytos sąlygos, kuriose baltymai efektyviai agreguoja bei nustatyti jų agregacijos greičiai.

Lentelėse 3.1 ir 3.2 yra pateikti baltymų spontaninės agregacijos puslaikiai ( $x_0$ , min), kiek užtrunka spontaniškai suagreguoti pusei baltymų nuo tyrimo pradžios. Šios vertės pateikiamos tik toms sąlygoms, kuriose agregacijos metu nustatyta fluorescencijos intensyvumo priklausomybei nuo laiko buvo galima pritaikyti sigmoidinę kreivę (3.5 pav.). Kitose sąlygose



agregacija vyko labai lėtai arba proceso metu buvo staigių fluorescencijos pokyčių neleidžiančių teisingai nubrėžti sigmoidinę kreivę.



**3.5 pav.** PrPARQ spontaninės agregacijos ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko esant 1,5 M GuHCl koncentracijai ir pH 6.

Pagal šiuos rezultatus parinktos sąlygos, kuriose buvo gaminami agregatai ir atliekami tolimesni agregacijos tyrimai.

**3.1 lentelė.** PrPARQ spontaninės agregacijos rezultatai.

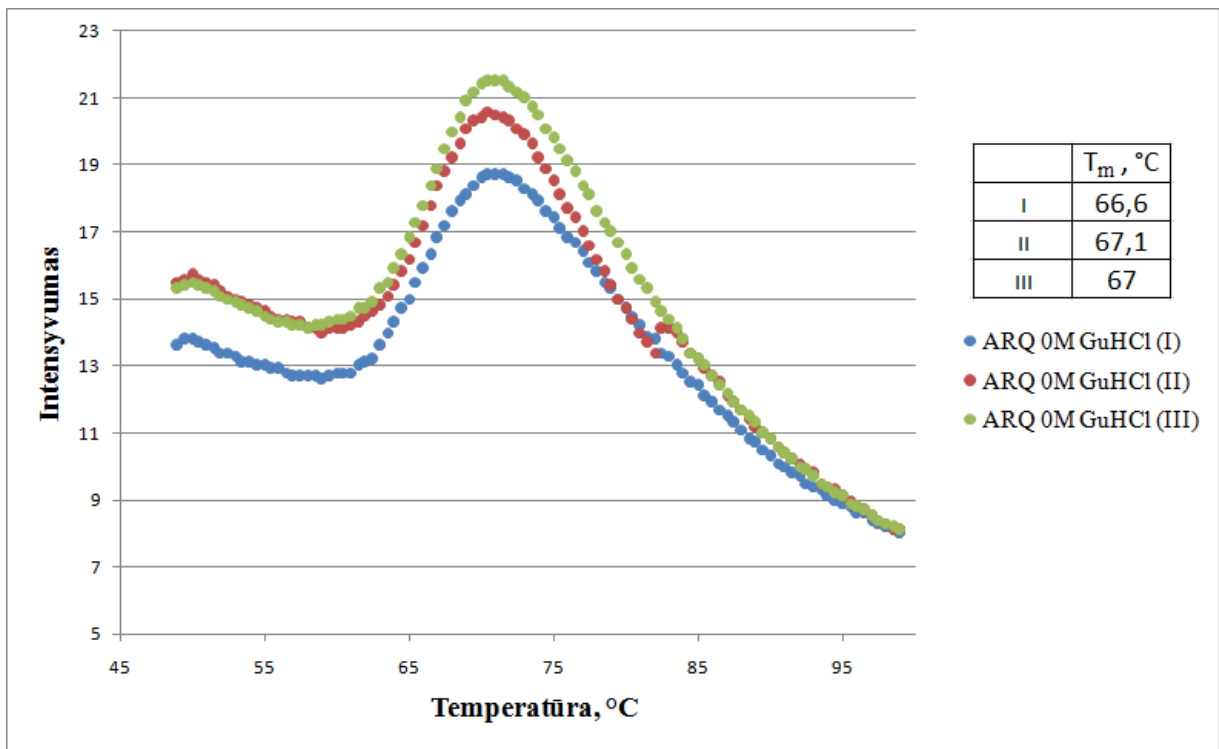
| pH\M(GuHCl) | 0 | 0,5 | 1   | 1,5 | 2   | 2,5 | 3    | 3,5  | 4 | 4,5 |
|-------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|---|-----|
| 2           | - | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | - | -   |
| 3           | - | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -    | - | -   |
| 4           | - | -   | -   | -   | -   | -   | -    | 1114 | - | -   |
| 5           | - | -   | 981 | 501 | 503 | 980 | 1128 | 1231 | - | -   |
| 6           | - | 772 | 832 | 688 | 328 | -   | -    | -    | - | -   |
| 7           | - | 494 | 525 | 243 | 303 | 472 | 545  | -    | - | -   |
| 8           | - | -   | 295 | -   | 219 | 241 | -    | -    | - | -   |
| 9           | - | 686 | 232 | 145 | 290 | 578 | -    | -    | - | -   |

**3.2 lentelė.** PrPVRQ spontaninės agregacijos rezultatai.

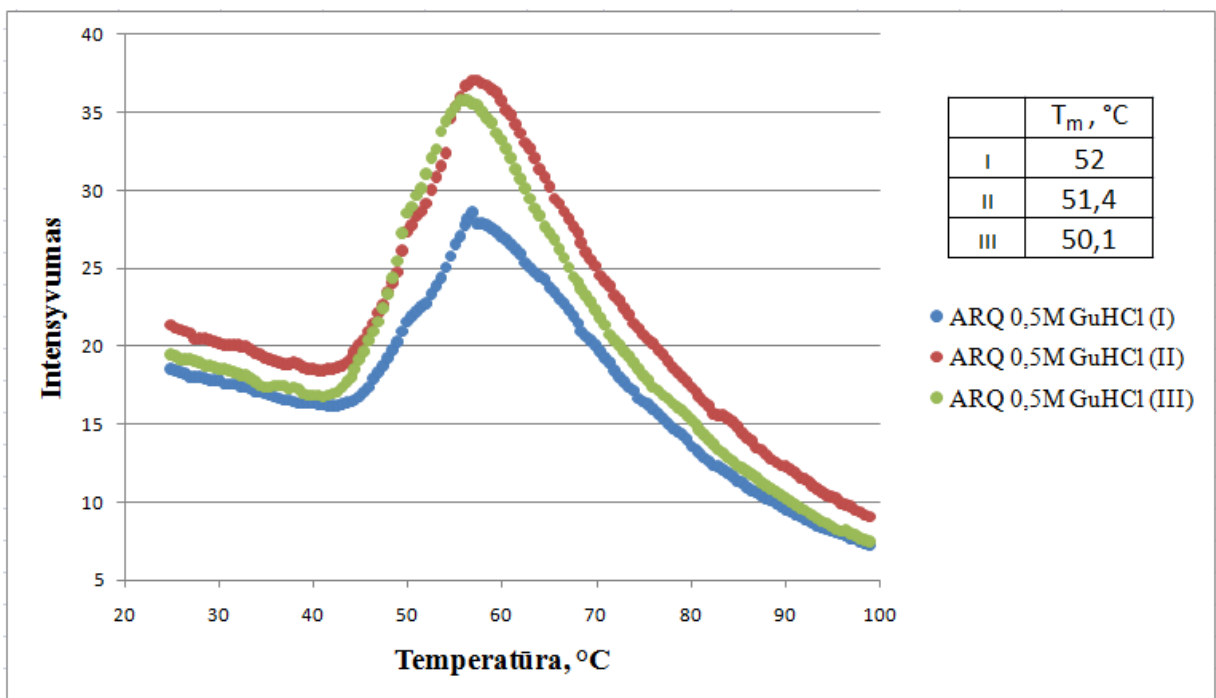
| pH\M(GuHCl) | 0 | 0,5 | 1   | 1,5 | 2   | 2,5 | 3   | 3,5 | 4 | 4,5 |
|-------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|
| 2           | - | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - | -   |
| 3           | - | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - | -   |
| 4           | - | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - | -   |
| 5           | - | -   | -   | 664 | 587 | 947 | -   | -   | - | -   |
| 6           | - | 504 | 737 | 416 | 401 | 568 | 547 | -   | - | -   |
| 7           | - | 536 | 325 | 313 | 344 | 304 | 636 | -   | - | -   |
| 8           | - | 502 | 243 | 156 | 181 | 265 | -   | -   | - | -   |
| 9           | - | -   | 427 | -   | 258 | -   | -   | -   | - | -   |

### 3.3 PrPARQ ir PrPVRQ terminio stabilumo tyrimas

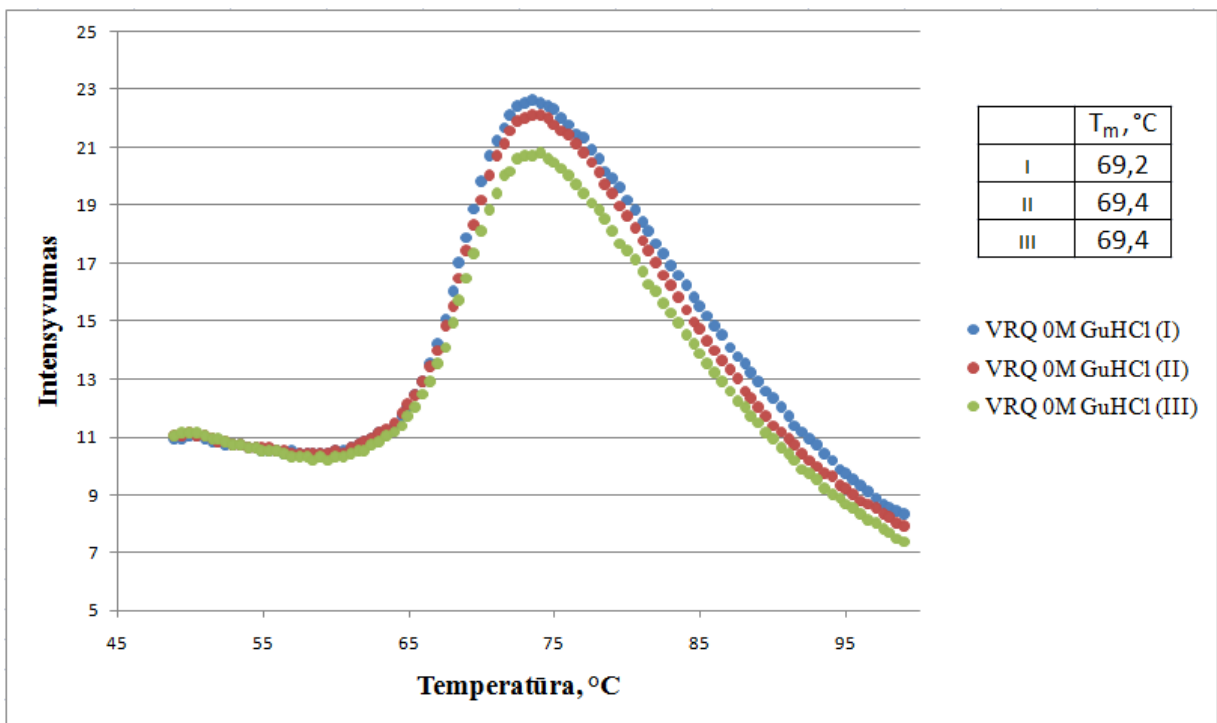
Pagal 2.2.5 atliktas abiejų baltymų terminio stabilumo tyrimas. Jo metu nustatytos abiejų baltymų lydymosi temperatūros  $T_m$  esant 0 ir 0,5 M GuHCl koncentracijoms (3.6 pav., 3.7 pav., 3.8 pav., 3.9 pav. ir 3.3 lentelė).



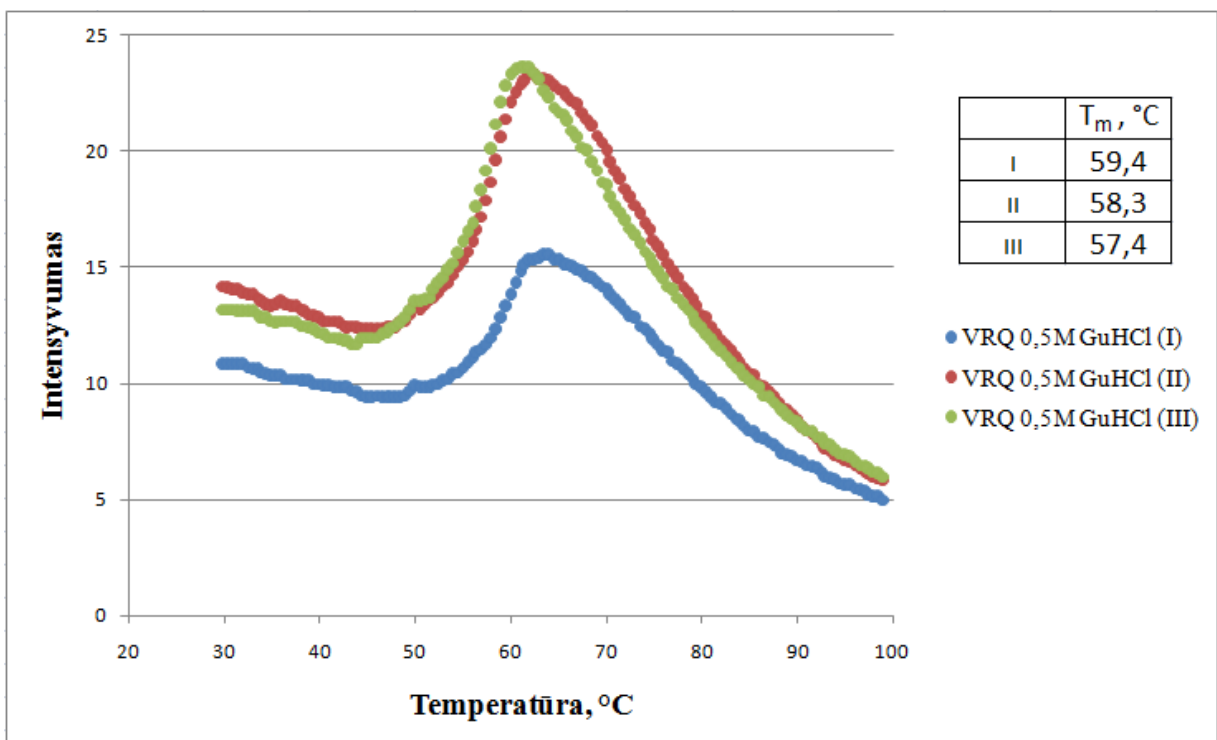
3.6 pav. PrPARQ terminio stabilumo grafikas esant 0 M GuHCl koncentracijai.  $T_m$  – temperatūra, kurioje pusė baltymų yra išsivyniojusių.



3.7 pav. PrPARQ terminio stabilumo grafikas esant 0,5 M GuHCl koncentracijai.



3.8 pav. PrPVRQ terminio stabilumo grafikas esant 0 M GuHCl koncentracijai.



3.9 pav. PrPVRQ terminio stabilumo grafikas esant 0,5 M GuHCl koncentracijai.

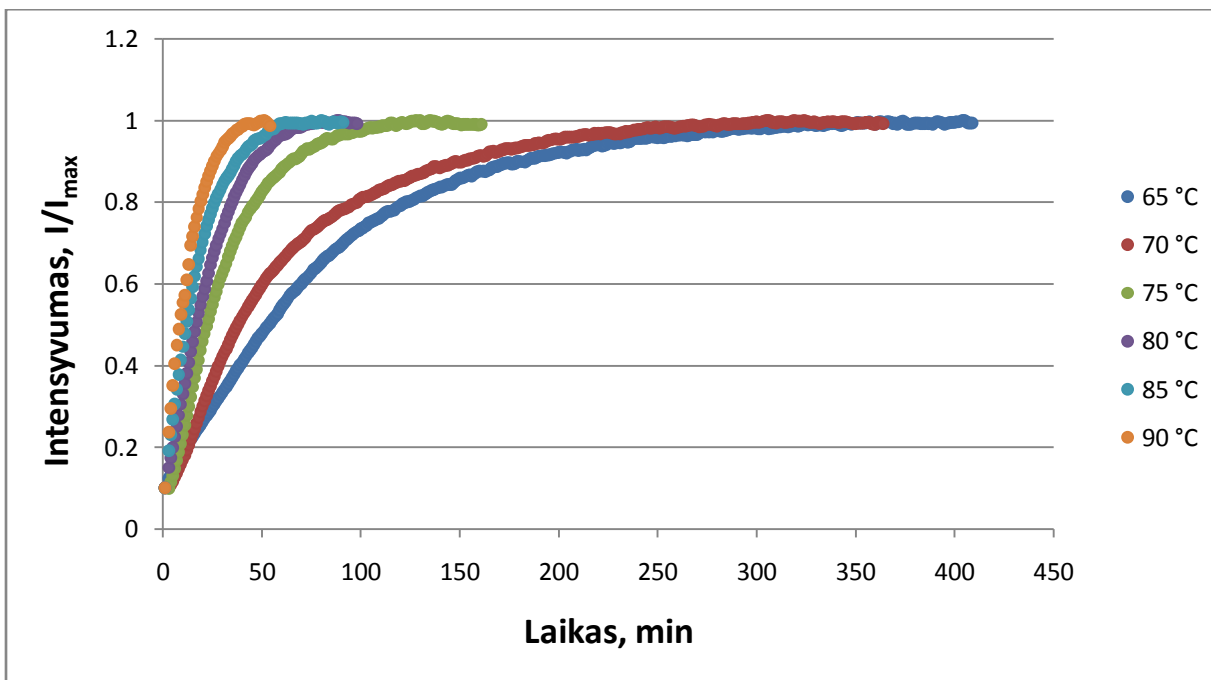
### 3.3 lentelė. PrPARQ ir PrPVRQ lydymosi temperatūros.

| Baltymas | GuHCl konc. | $T_m$ , °C     |
|----------|-------------|----------------|
| PrPARQ   | 0 M         | $66,9 \pm 0,3$ |
| PrPARQ   | 0,5 M       | $51,2 \pm 1,0$ |
| PrPVRQ   | 0 M         | $69,3 \pm 0,1$ |
| PrPVRQ   | 0,5 M       | $58,4 \pm 1,0$ |

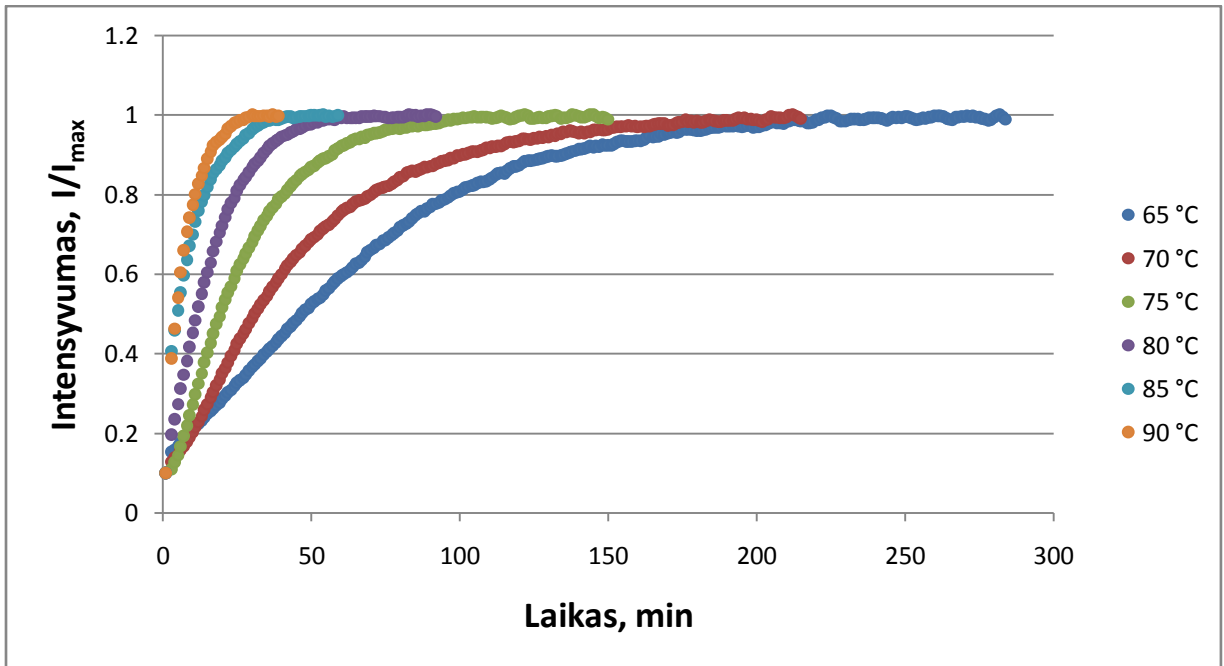
Padidinus GuHCl koncentraciją nuo 0 M iki 0,5 M abiejų baltymų terminis stabilumas sumažėja. Atsižvelgus į abiejų abiejų baltymų lydymosi temperatūras, tolimesni agregacijos tyrimai buvo atliekami 65 – 90 °C temperatūrų intervale, kad monomerai būtų išsilankstę.

### 3.4 PrPARQ ir PrPVRQ fibrilių ilgėjimo tyrimai

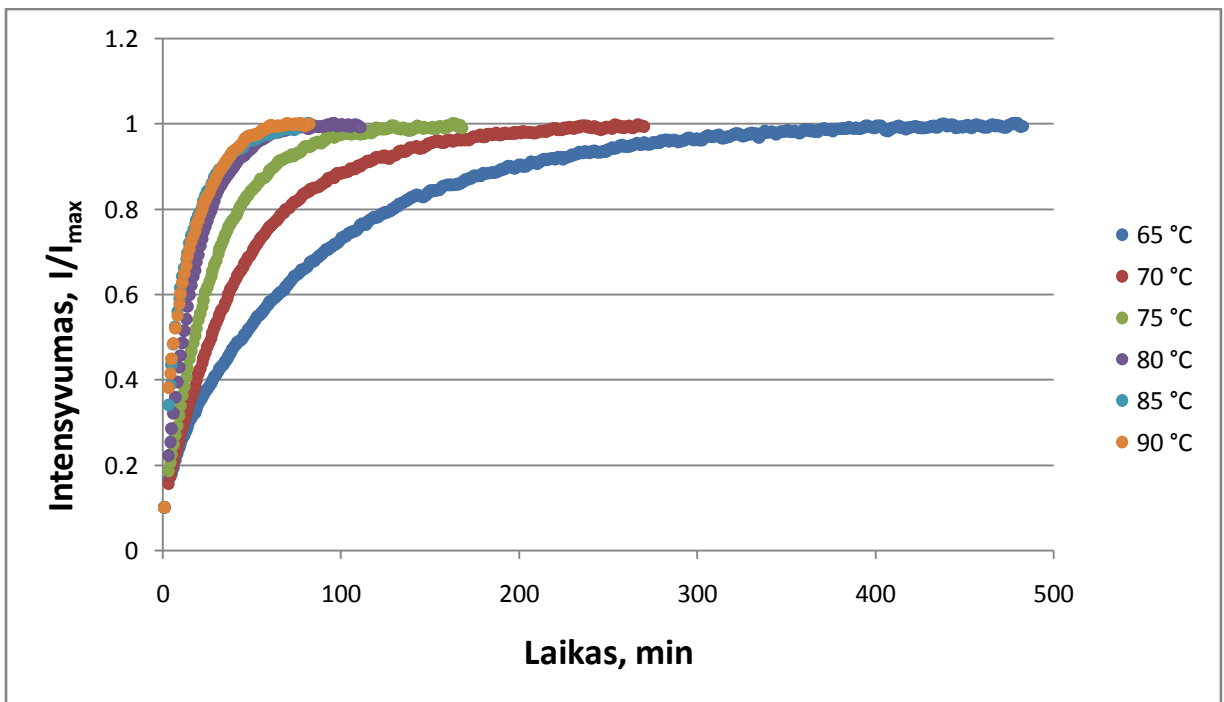
Pagal 2.2.7 skyriuje pateiktą metodą atliktas agregacijos tyrimas kurio duomenys pateikiami 3.10 pav., 3.11 pav., 3.12 pav. ir 3.13 pav. Duomenys gluodinami eksponentine kreive pagal modifikuotą Arenijaus lygtį (2.2.7 skyrius).



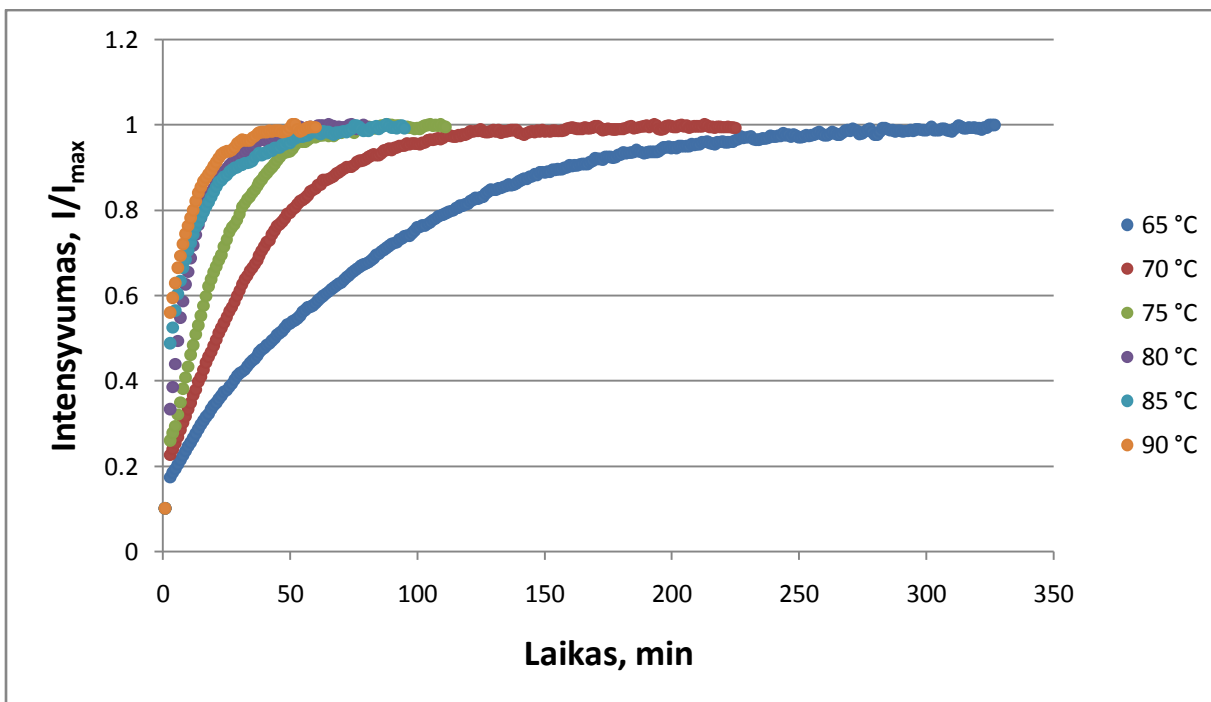
3.10 pav. PrPARQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPARQ monomerams ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko skirtingose temperatūrose.



**3.11 pav.** PrPARQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPVRQ monomerams ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko skirtingose temperatūrose.



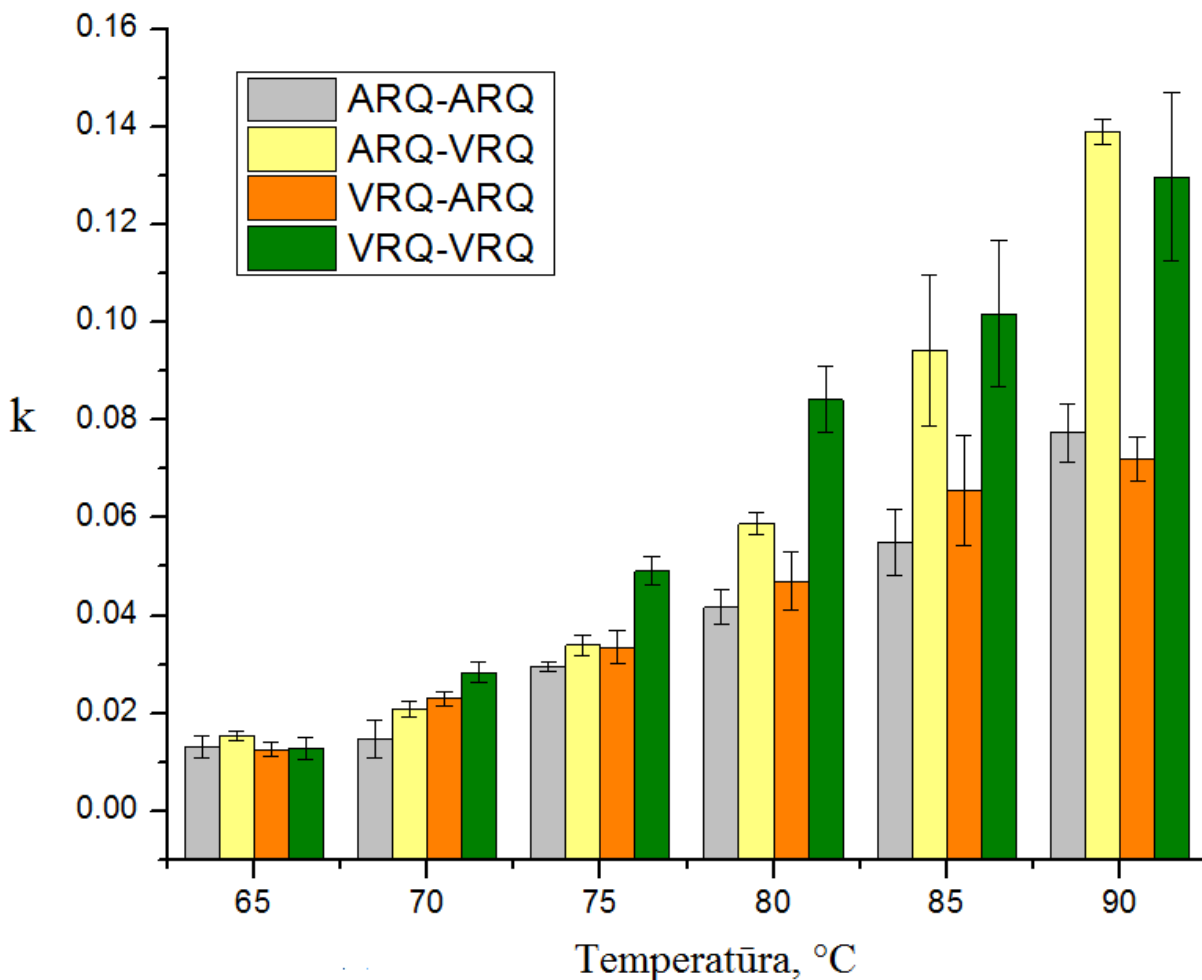
**3.12 pav.** PrPVRQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPARQ monomerams ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko skirtingose temperatūrose.



**3.13 pav.** PrPVRQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPVRQ monomerams ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko skirtingose temperatūrose.

Kiekvienomis sąlygomis apskaičiuota  $k$  vertė. Šios vertės atspindi pradinį fibrilių ilgėjimo greitį, t.y. kuo greičiau fibrilės ilgėja, tuo ši vertė didesnė.

Palygintos PrPARQ ir PrPVRQ fibrilių ilgėjimų  $k$  vertės esant PrPARQ arba PrPVRQ monomerams temperatūrų intervale nuo 65 °C iki 90 °C (3.14 pav.).

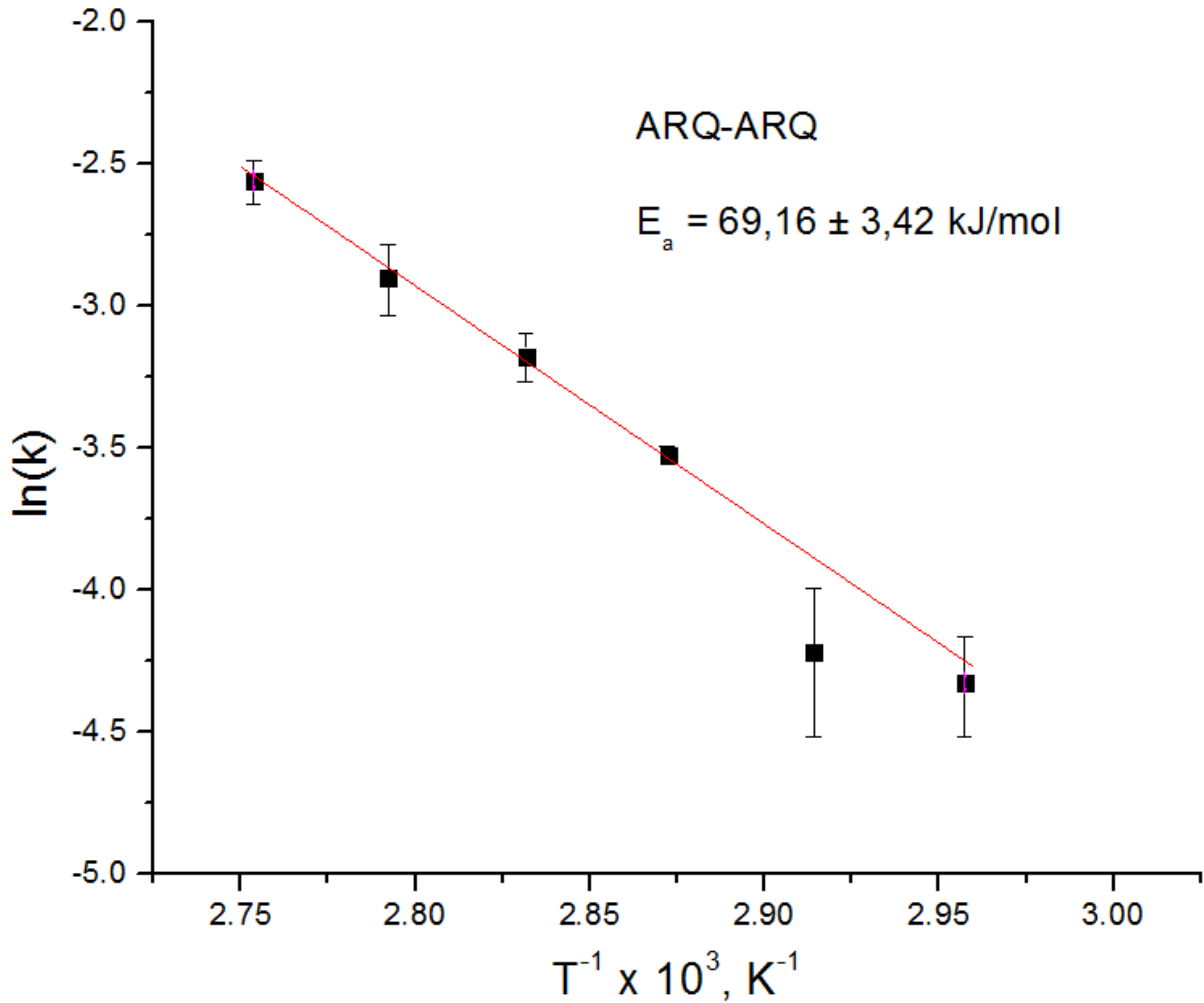


**3.14 pav.** PrPARQ ir PrPVRQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPARQ ar PrPVRQ monomerams  $k$  vertės 65 – 90 °C temperatūrų intervale.

Esant mažesnėms temperatūroms, šios vertės beveik nesiskiria, tačiau esant aukštesnėms temperatūroms, mišinių turinčių PrPVRQ monomerus  $k$  vertės tampa žymiai didesnės nei mišinių su PrPARQ monomerais. Tai reiškia, kad PrPVRQ monomerai greičiau jungiasi prie fibrilių nei PrPARQ monomerai.

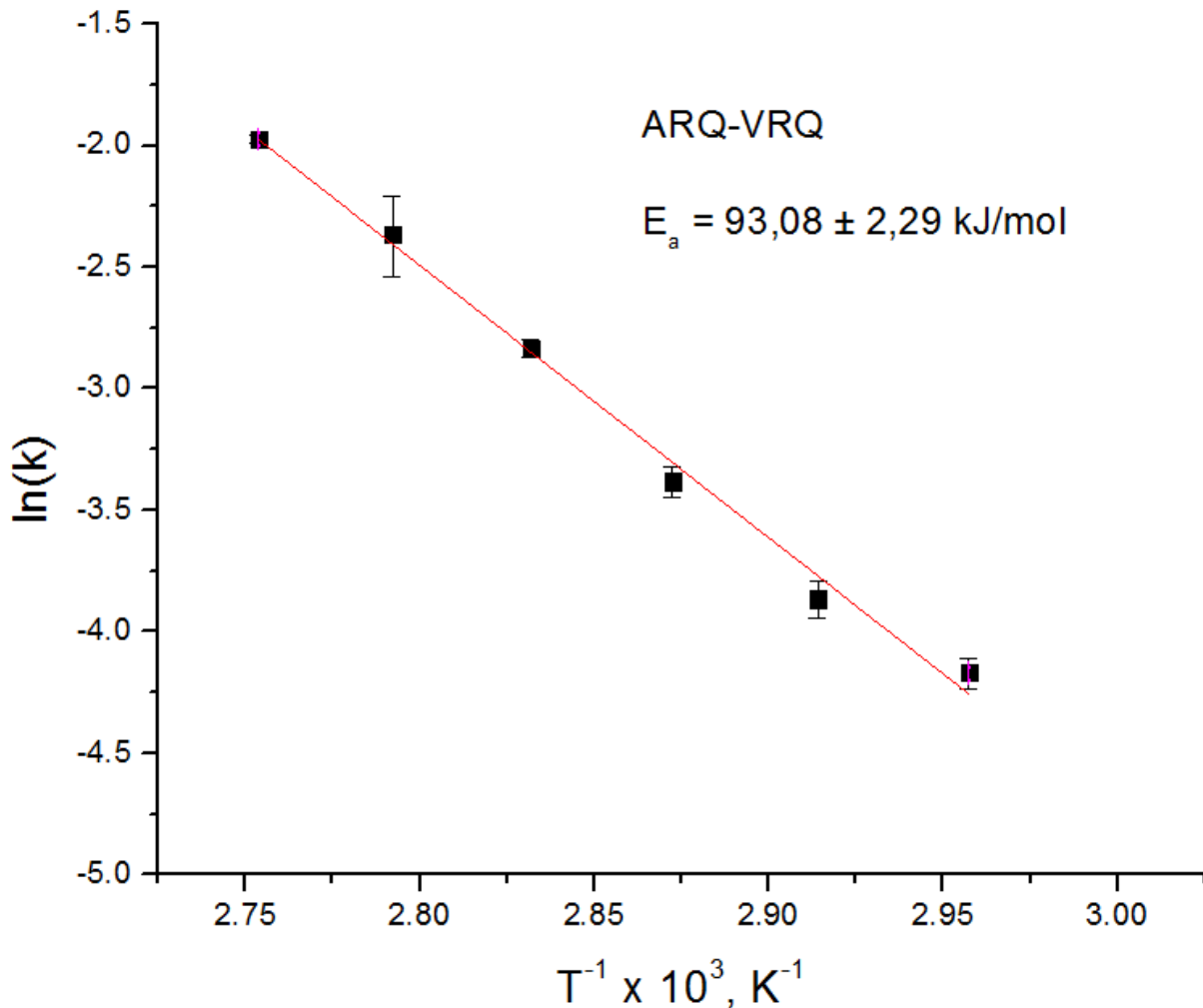
Kiekvienam iš keturių atvejų, esant tai pačiai GuHCl koncentracijai ir skirtingoms temperatūroms nubrėžti  $k$  verčių priklausomybės nuo temperatūros grafikai Arenijaus koordinatėse (3.15 pav., 3.16 pav., 3.17 pav., 3.18 pav.). Apskaičiuoti per grafikų taškus einančių tiesių krypties koeficientai, pagal kuriuos naudojant Arenijaus lygtį apskaičiuotos fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energijos.





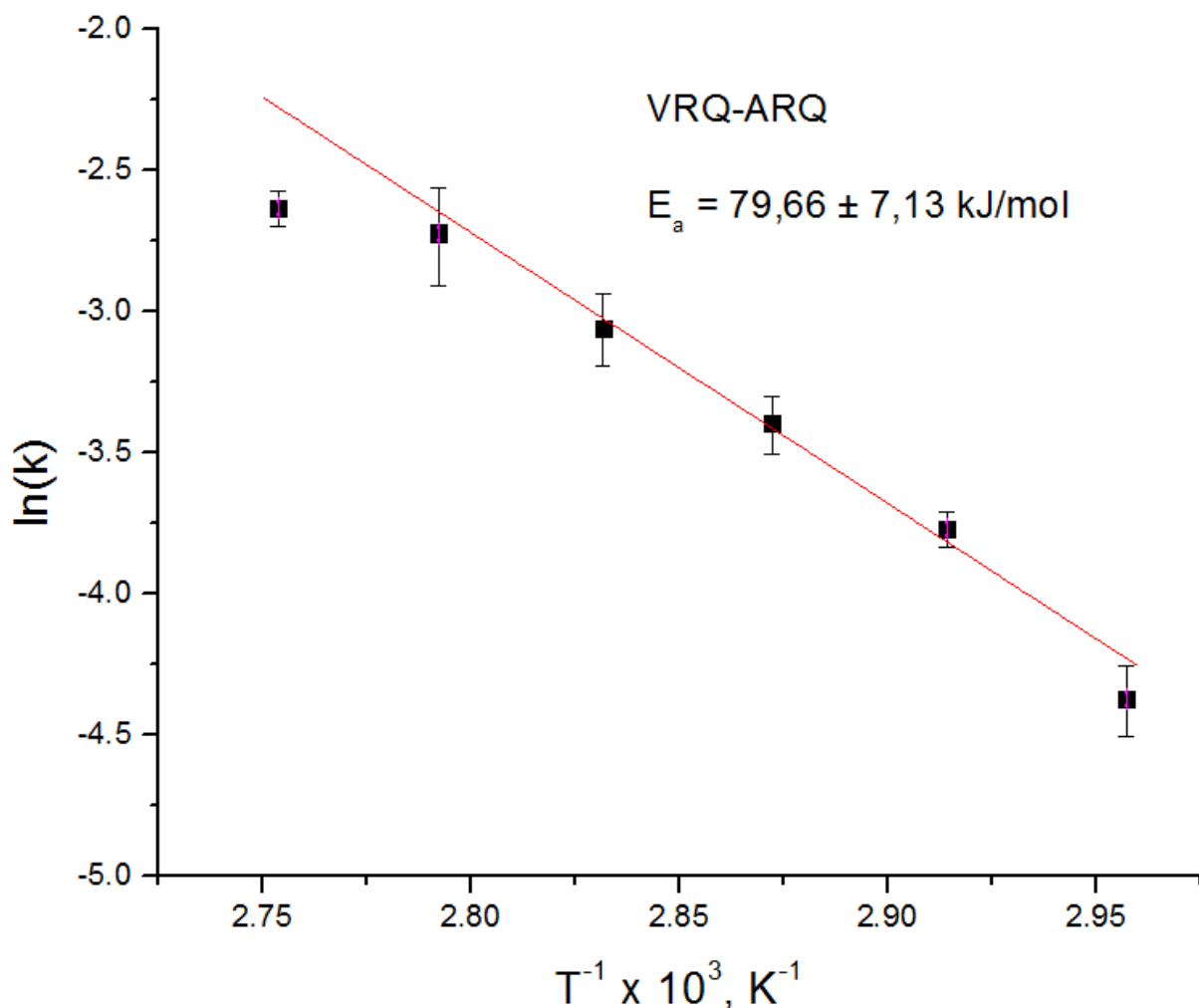
**3.15 pav.** PrPARQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPARQ monomerams  $k$  verčių priklausomybė nuo temperatūros Arenijaus koordinatėse.

PrPARQ fibrilių ilgėjimo greitis prisijungiant PrPARQ monomerams buvo pats lėčiausias iš visų tirtų variantų. Pagal Arenijaus lygtį apskaičiuota PrPARQ fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energija prisijungiant PrPARQ monomerams yra  $69,16 \pm 3,42$  kJ/mol.



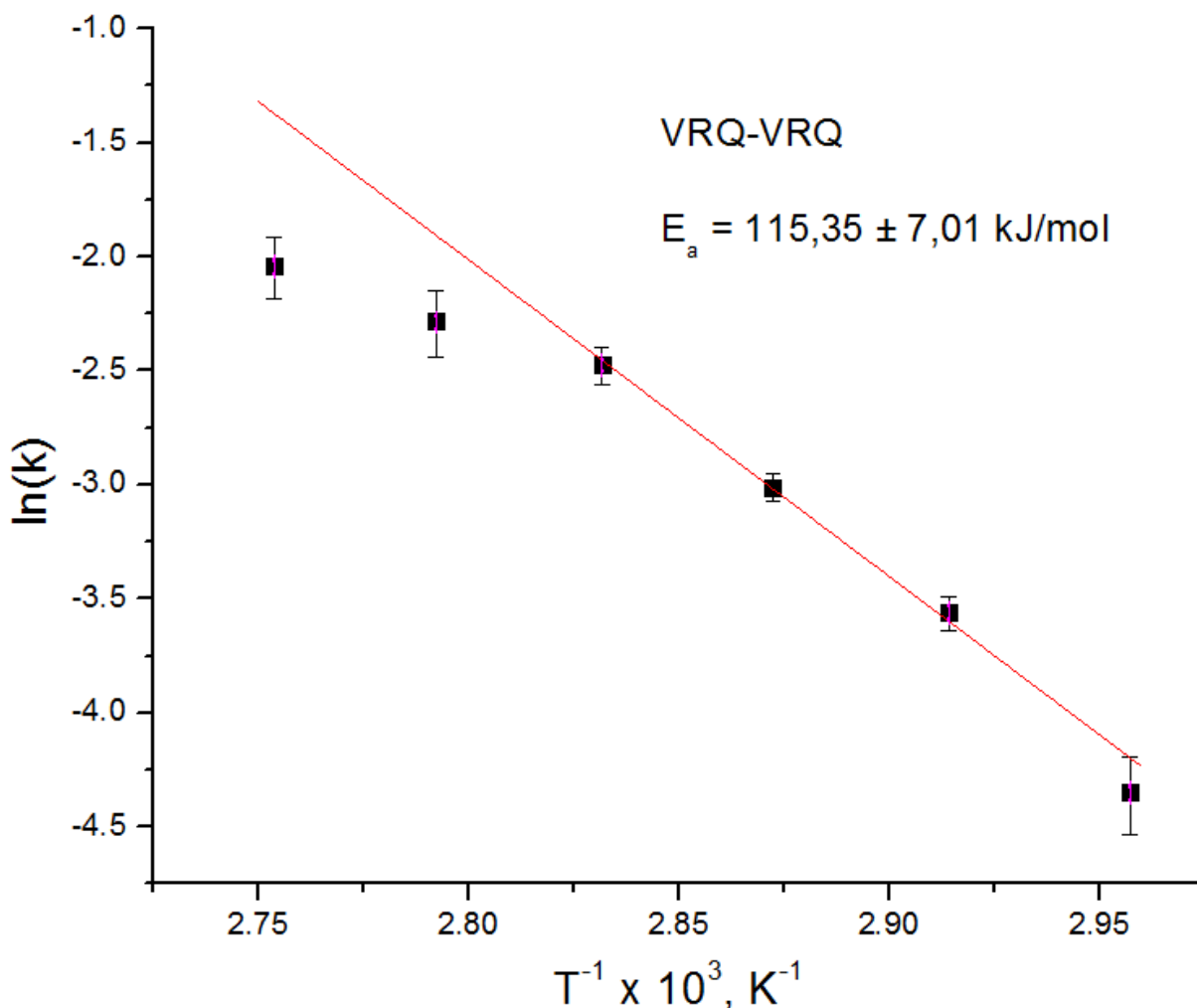
**3.16 pav.** PrPARQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPVRQ monomerams  $k$  verčių priklausomybė nuo temperatūros Arenijaus koordinatėse.

Pagal Arenijaus lygtį apskaičiuota PrPARQ fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energija prisijungiant PrPVRQ agregatams yra  $93,08 \pm 2,29 \text{ kJ/mol}$ . PrPARQ fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energija prisijungiant PrPVRQ monomerams yra žymiai didesnė nei prisijungiant PrPARQ monomerams.



**3.17 pav.** PrPVRQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPARQ monomerams  $k$  verčių priklausomybė nuo temperatūros Arenijaus koordinatėse.

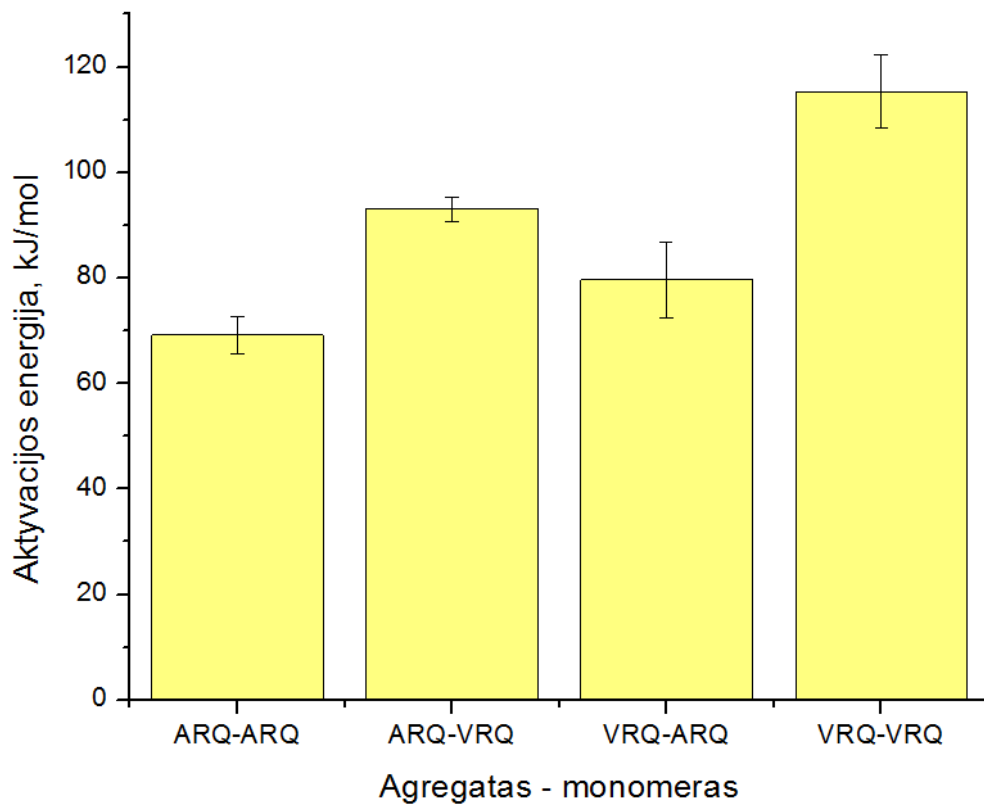
PrPVRQ fibrilių ilgėjimas prisijungiant PrPARQ monomerams aukštose temperatūrose vyko labai greitai, todėl per pirmas dvi minutes, kol tirpalas buvo šildomas iki 85 °C ir 90 °C, dalis monomerų prisijungė prie fibrilių ir tai lėmė didelę 85 °C agregacijos paklaidą bei 90 °C taško nuokrypį. Pagal Arenijaus lygtį apskaičiuota PrPVRQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPARQ monomerams aktyvacijos energija yra  $79,66 \pm 7,13 \text{ kJ/mol}$ .



**3.18 pav.** PrPVRQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPVRQ monomerams  $k$  verčių priklausomybė nuo temperatūros Arenijaus koordinatėse.

PrPVRQ fibrilių ilgėjimo greitis prisijungiant PrPVRQ monomerams aukštose temperatūrose buvo pats didžiausias iš visų keturių mišinių ir taip pat kaip su PrPVRQ fibrilėmis ir PrPARQ monomerais nebuvo užfiksuotos reakcijos pradžios fluorescencijos vertės, tai lėmė 85 °C ir 90 °C taškų nuokrypį nuo tiesės. Pagal Arenijaus lygtį apskaičiuota PrPVRQ fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energija prisijungiant PrPVRQ monomerams yra  $115,35 \pm 7,01 \text{ kJ/mol}$ .

PrPARQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPARQ monomerams aktyvacijos energija yra pati mažiausia, o PrPVRQ fibrilių ilgėjimo prisijungiant PrPVRQ monomerams – pati didžiausia (3.19 pav.).



**3.19 pav.** Abiejų fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energijos prisijungiant skirtingiems monomerams 0,5 M GuHCl koncentracijoje.

Esant tam pačiam monomerui ir skirtingoms fibrilėms, PrPVRQ fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energija yra didesnė nei PrPARQ fibrilių.

## Išvados

1. Prioniniai baltymai be His-Tag gali būti gryninami renatūruojant ant sorbento prisijungusius baltymus, keičiant guanidino hidroklorido koncentraciją nuo 4 M iki 0 M per 132 min.
2. PrPVRQ terminis stabilumas 0 M ir 0,5 M guanidino hidroklorido koncentracijose yra didesnis nei PrPARQ.
3. PrPARQ ir PrPVRQ fibrilių ilgėjimo proceso aktyvacijos energija jungiantis PrPVRQ monomerams yra didesnė nei jungiantis PrPARQ monomerams.

# **Rekombinantinių avies prioninių baltymų ARQ ir VRQ gryninimas ir agregacijos tyrimai**

## **Santrauka**

Prioniniai baltymai yra ląstelių paviršiaus glikoproteinai, kurie egzistuoja dviejose formose. Normali ląstelinė prioninio baltymo forma ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) turi alfa spiralėmis turtingą antrinę struktūrą, o pataloginė forma ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) turtinga beta struktūromis.  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  forma gali katalizuoti normalaus prioninio baltymo vartimą į pataloginę formą (amiloidines fibriles), kuri sukelia įvairias spongiformines encefalopatijas.

Šiame darbe buvo sėkmingai išgryninti du polimorfiniai avių prioniniai baltymai (ARQ ir VRQ). Jų agregacijos tyrimai parodė, kad vienos aminorūgšties skirtumas 136 pozicijoje daro įtaką avies prioninių baltymų agregacijos kinetikai.

# **Recombinant Sheep Prion Protein ARQ and VRQ Purification and Aggregation Analysis**

## **SUMMARY**

Prion proteins are cell surface glycoproteins that exist in two forms. Normal prion proteins (PrP<sup>C</sup>) have predominantly alpha-helical secondary structure while pathologic form of prions (PrP<sup>Sc</sup>) is composed mainly of beta-structures. The PrP<sup>Sc</sup> form has can catalyze conversion of normal prion proteins into their pathologic form (amyloid fibrils) which causes various spongiform encephalopathies.

In this work, two polymorphs of sheep prion protein (ARQ and VRQ) were successfully purified. Aggregation analysis of both proteins revealed a correlation between the aggregation kinetics and the single amino acid difference at the 136th position.



## Literatūros sąrašas

- Aguzzi, A., Calella, A. M. (2009). Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases, 1105–1152. <http://doi.org/10.1152/physrev.00006.2009>.
- Benetti, F., Legname, G. (2015). New insights into structural determinants of prion protein folding and stability, 119–124. <http://doi.org/10.1080/19336896.2015.1022023>
- Biancalana, M., Koide, S. (2011). Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils, *1804*(7), 1405–1412. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>.Molecular
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., ... Schäfer, F. (2009). Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC), *463*(09), 439–473. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5)
- Cameron, C., Bell-rogers, P., Mcdowall, R., Rebelo, A. R., Cai, H. Y. (2014). Prion protein genotypes of sheep as determined from 3343 samples submitted from Ontario and other provinces of Canada from 2005 to 2012 *Résumé*, (11), 260–266.
- Cancedda, M. G., Di Guardo, G., Chiocchetti, R., Demontis, F., Marruchella, G., Sorteni, C., ... Ligios, C. (2014). Role of palatine tonsils as a prion entry site in classical and atypical experimental sheep scrapie. *Journal of Virology*, *88*(2), 1065–70. <http://doi.org/10.1128/JVI.02750-13>
- Chianini, F., Mario, G., Steele, P., Hamilton, S., Hawthorn, J., Siso, S., ... Nonno, R. (2015). Correlation between Infectivity and Disease Associated Prion Protein in the Nervous System and Selected Edible Tissues of Naturally Affected Scrapie Sheep, 1–21. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122785>
- Dassanayake, R. P., Madsen-bouterse, S. A., Truscott, T. C., Zhuang, D., Mousel, M. R., Davis, W. C., Schneider, D. A. (2016). Classical scrapie prions are associated with peripheral blood monocytes and T-lymphocytes from naturally infected sheep. *BMC Veterinary Research*, 6–13. <http://doi.org/10.1186/s12917-016-0651-6>

Dobly, A., Heyden, S. Van Der, Roels, S. (2013). Science Trends in genotype frequency resulting from breeding for resistance to classical scrapie in Belgium ( 2006 - 2011 ). *Journal of Veterinary Science*, 14(May 2012), 45–51.

Fediaevsky, A., Calavas, D., Gasqui, P., Moazami-Goudarzi, K., Laurent, P., Arsac, N., ... Moreno, C. (2010). Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie in French sheep and potential consequences of the current breeding programme for resistance to scrapie on the risk of atypical scrapie, 1–7.

Fitzmaurice, T. J., Burke, D. F., Hopkins, L., Yang, S., Yu, S., Sy, M.-S., ... Bujdoso, R. (2008). The stability and aggregation of ovine prion protein associated with classical and atypical scrapie correlates with the ease of unwinding of helix-2. *The Biochemical Journal*, 409(2), 367–75. <http://doi.org/10.1042/BJ20071122>

Garza, C., Monzo, M., Jose, J. (2014). Distribution of Peripheral PrP Sc in Sheep with Naturally Acquired Scrapie, 9(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097768>

Gielbert, A., Thorne, J. K., Hope, J. (2014). Pyroglutamyln-terminal prion protein fragments form naturally in sheep brain during the development of transmissible spongiform encephalopathies. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(March). <http://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00007>

Groschup, M. H., Lacroux, C., Buschmann, A., Lühken, G., Mathey, J., Eiden, M., ... Andreoletti, O. (2007). Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 1201–1207. <http://doi.org/10.3201/eid1308.070077>

Groveman, BR., Dolan, MA., Taubner, LM., Kraus, A., Wickner, RB., Caughey, B. (2014). Parallel in-register intermolecular  $\beta$ -sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35):24129-42. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.578344>

Hautaniemi, M., Tapiovaara, H., Korpenfelt, S.-L., Sihvonen, L. (2012). Genotyping and surveillance for scrapie in Finnish sheep. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 122. <http://doi.org/10.1186/1746-6148-8-122>

Jacobs, J. G., Bossers, A., Rezaei, H., Keulen, L. J. M. Van, Mccutcheon, S., Sklaviadis, T., ... Langeveld, J. P. M. (2011). Proteinase K-Resistant Material in ARR / VRQ Sheep Brain Affected with Classical Scrapie Is Composed Mainly of VRQ Prion Protein □ †, 85(23), 12537–12546. <http://doi.org/10.1128/JVI.00448-11>

Jeffrey, M., Martin, S., Chianini, F., Eaton, S., Dagleish, M. P., González, L. (2014). Incidence of infection in Prnp ARR/ARR sheep following experimental inoculation with or natural exposure to classical scrapie. *PLoS ONE*, 9(3), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0091026>

Le Dur, A., Béringue, V., Andréoletti, O., Reine, F., Laï, T. L., Baron, T., ... Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 16031–16036. <http://doi.org/10.1073/pnas.0502296102>

Levine, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer ' s disease @ -amyloid peptides : Detection of amyloid aggregation in solution, 404–410.

Millhauser, G. L. (2013). *Prions and Diseases. Physiology* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-5305-5>

Milto, K., Michailova, K., Smirnovas, V. (2014). Elongation of Mouse Prion Protein Amyloid-Like Fibrils : Effect of Temperature and Denaturant Concentration, 9(4), 1–5. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094469>

PDB [duomenų bazė internete]. Protein Data Bank. Sukurta 1999-12-15 (cituota 2016-05-12). Adresai: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1XYU>  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1TPX>

Race, B., Phillips, K., Meade-white, K., Striebel, J., & Chesebro, B. (2015). Increased Infectivity of Anchorless Mouse Scrapie Prions in Transgenic Mice Overexpressing Human Prion Protein, 89(11), 6022–6032. <http://doi.org/10.1128/JVI.00362-15>

Richt, A., Nicholson, E. M., Hamir, A. N., Greenlee, J. J., & Kunkle, R. A. (2014). Lack of Prion Accumulation in Lymphoid Tissues of PRNP ARQ / ARR Sheep Intracranially Inoculated with the Agent of Scrapie, 9(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0108029>

Salami, S., Zadeh, R. A., Omrani, M. D., Ramezani, F., & Amniattalab, A. (2011). Allelic frequency and genotypes of prion protein at codon 136 and 171 in Iranian Ghezel sheep breeds, *5*(3), 228–231. <http://doi.org/10.4161/pri.5.3.16098>

Simmons, M. M., Moore, S. J., Lockey, R., Chaplin, M. J., Konold, T., Vickery, C., & Spiropoulos, J. (2015). Phenotype Shift from Atypical Scrapie to CH1641 following Experimental Transmission in Sheep. *PloS One*, *10*(2), e0117063. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0117063>

Swayampakula, M., Baral, P. K., Aguzzi, A., Kav, N. N. V., & James, M. N. G. (2013). The crystal structure of an octapeptide repeat of the Prion protein in complex with a Fab fragment of the POM2 antibody, *22*, 893–903. <http://doi.org/10.1002/pro.2270>

Völkel, D., Blankenfeldt, W., & Schomburg, D. (1998). Large-scale production , purification and refolding of the full-length cellular prion protein from Syrian golden hamster in *Escherichia coli* using the glutathione S -transferase-fusion system, *1*, 462–471.

Wadsworth, J. D. F., Joiner, S., Linehan, J. M., Balkema-Buschmann, A., Spiropoulos, J., Simmons, M. M., ... Collinge, J. (2013). Atypical Scrapie Prions from Sheep and Lack of Disease in Transgenic Mice Overexpressing Human Prion Protein. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(11), 1731–1739. <http://doi.org/10.3201/eid1911.121341>

Yang, S., Thackray, A. M., Hopkins, L., Monie, T. P., Burke, D. F., & Bujdoso, R. (2014). Polymorphisms at amino acid residues 141 and 154 influence conformational variation in ovine PrP. *BioMed Research International*, *2014*, 372491. <http://doi.org/10.1155/2014/372491>