



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Neurobiologijos studijų programos II kurso studentas

Simonas Jurgis KULIEŠIUS

Magistro darbas

**PELĖS PRONO BALTYMO PRIONINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAS**

Darbo vadovas

Dr. Vytautas Smirnovas

Vilnius 2017

# PELĖS PRIONO BALTYMO PRIONINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAS

Darbas atliktas Vilniaus Universiteto Gyvybės Mokslų centre (Vilnius, Lietuva)  
Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Simonas Jurgis KULIEŠIUS:

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS:

\_\_\_\_\_  
(parašas)

## TURINYS

<u>Santrumpos</u> .....	5
<u>IVADAS</u> .....	6
<u>Darbo tikslas ir uždaviniai</u> .....	7
<u>1. Literatūros apžvalga</u> .....	8
<u>1.1. Prionų tyrimų istorija</u> .....	8
<u>1.2. Prionai ir su jais susijusios ligos</u> .....	9
<u>1.2.1. Priono koncepcija</u> .....	9
<u>1.2.2. Priono baltymo biologinė funkcija</u> .....	10
<u>1.2.3. Prioninių ligų patofiziologija</u> .....	11
<u>1.2.4. Prioninių ligų ląsteliniai reiškiniai</u> .....	12
<u>1.2.4.1. Priono baltymo degradacija <i>in vivo</i></u> .....	14
<u>1.3. Priono baltymo struktūra</u> .....	14
<u>1.3.1. Tarprūšinis barjeras</u> .....	17
<u>1.3.2. Prionų kamieniai</u> .....	18
<u>1.3.3. Amiloidinės fibrilės</u> .....	18
<u>1.4. Prionų agregacijos kinetika</u> .....	19
<u>2. Medžiagos ir metodai</u> .....	24
<u>2.1. Reagentai</u> .....	24
<u>2.1.1. Naudota aparatūra</u> .....	24
<u>2.2. Metodai</u> .....	24
<u>2.2.1. Duomenų analizė</u> .....	26
<u>3. Rezultatai ir jų aptarimas</u> .....	27

<u>3.1. Priono baltymo sėklos auginimas</u> .....	27
<u>3.2. Amiloidogeninių sėklų indukuota baltymų agregacija</u> .....	29
<u>3.3. Homologinių baltymų agregacijos indukcija MoPrP sėkla</u> .....	31
<u>4. Išvados</u> .....	34
<u>5. Literatūros sąrašas</u> .....	35
<u>Santrauka</u> .....	39
<u>Summary</u> .....	40
<u>Priedas</u> .....	41

## Santrumpos

GuHCl – Guanidino hidrochloridas

PrP – Priono baltymas (angl. *Prion Protein*)

PrP<sup>Sc</sup> – Priono baltymo skrepi forma (angl. *scrapie*)

PrP<sup>c</sup> – Priono baltymo ląstelinė forma (angl. *cellular*)

PMCA – Neteisingo baltymų susilankstymo ciklinė amplifikacija (angl. *Protein Misfolding Cyclic Amplification*)

MoPrP – Pelės priono baltymas (angl. *Mouse Prion Protein*)

ePrP – elnio Priono baltymas (angl. *elk*)

HuPrP – žmogaus Priono baltymas (angl. *Human*)

xlPrP – naguotosios varlės Priono baltymas (lot. *Xenopus Laevis*)

tPrP – vėžlio Priono baltymas (angl. *turtle*)

bvPrP – rudojo pelėno Priono baltymas (angl. *bank vole*)

## ĮVADAS

Baltymo gebėjimas išlaikyti natyvią struktūrą yra kertinis akmuo jo biologinio aktyvumo ilgaamžiškumui. Neteisingai sulankstytos baltymo struktūros bei tų baltymų agregacija yra tiesiogiai ar netiesiogiai susiję su dešimtimis žinduolių ligų. Ligų atveju, baltymų agregatai dažniausiai yra sudaryti iš vieno tam tikro baltymo ir charakterizuojami kaip ploni ir pailgos formos, todėl dar vadinami amiloidinėmis fibrilėmis. Geriausiai, nors ne iki galo, ištirtos su neteisingu baltymų susilankstymu susijusios ligos yra sąlygotos smegenų audinio degeneracijos: Alzheimerio (susiję baltymai  $A\beta_{1-40}$ ,  $A\beta_{1-42}$ , priono baltymas), Parkinsono ( $\alpha$ -sinukleinas), Huntingtono (huntingtin) sindromai bei prioninės ligos (priono baltymas). (Gillam et al., 2013, Younan et al., 2013) Amiloidinių fibrilių struktūra pasižymi itin dideliu  $\beta$  klosčių kiekiu, kurios tarpusavyje stabilizuotos vandenilniais ryšiais peptidinėje grandinėje. Dėl šios priežasties daugelis baltymų, tarpusavyje neturintys homologinių ar struktūros panašumų, tam tikromis sąlygomis gali formuoti amiloidinius oligomerus.

Prionai pasižymi unikalia savybe dauginti save, šiame procese nedalyvaujant nukleorūgštims. Liga plinta besidauginant save replikuojančiai patogeninei organizme randamo baltymo izoformai  $PrP^{Sc}$  (Prion Protein<sup>sc</sup> – *scrapie*, pagal avių ligą tuo pačiu pavadinimu) keičiant nepatogeninę to paties baltymo izoformą  $PrP^C$  ( $C$  – *cellular*, ląstelinė) į save.  $PrP^{Sc}$  izoformos kiekis kaupiasi centrinėje nervų sistemoje ir, su laiku, pasiekus patogeninę baltymo koncentraciją, išsivysto prioninė liga. Ligos progresavimo metu susiformuojančios amiloidinės struktūros pasižymi agregacija, sumažėjusiu tirpumu,  $\beta$ -juostų konformacija ir atsparumu proteazėms. Egzistuojantys vidu- ir tarprūšiniai barjerai prioninėms ligoms nėra iki galo ištirti, tačiau žinoma, kad pirminės struktūros panašumas turi lemiamą įtaką užkrato stiprumui (Telling, 2011).

Baltymų agregacija taip pat turi neigiamą poveikį gaminant, gryninant, saugant bei naudojant baltymus bei jų produktus farmacijoje bei maisto pramonėje. (Gillam et al., 2013)

Dėl amiloidinių fibrilių sąsajos su įvairiomis ligomis, dažniausiai jos yra tiriamos siekiant nuslopinti ar sumažinti baltymų agregaciją, taip tikintis sulėtinti patologijos eigą.

**Darbo tikslas** – Ištirti pilno ilgio rekombinantinio pelės priono baltymo agregacijos kinetiką.

**Darbo uždaviniai:**

1. Paruošti infekcinėmis savybėmis baltymams pasižyminčią sėklą(-as) iš pilno ilgio pelės prioninio baltymo;
2. Ištirti pilno ilgio pelės priono baltymo sėklos(-ų) indukuotos baltymų agregacijos kinetiką;
3. Ištirti pilno ilgio pelės priono baltymo sėklos(-ų) galimybę įveikti tarprūšinį barjerą.

# 1. Literatūros apžvalga

## 1.1. Prionų tyrimų istorija

Priono baltymas ir jo plitimas yra pirmasis literatūroje aprašytas baltymų dauginimasis be nukleorūgščių dalyvavimo. (Prusiner, 1982) Baltymų dauginimasis procese nedalyvaujant nukleorūgštims prieštarauja iki tol vyravusiai dogmai, jog genetinė informacija yra perduodama iš DNR į RNR ir tada baltymui, tačiau niekad iš baltymo į baltymą, kaip vyksta prionų ligose. Geriausias šio proceso pagrindimas yra galimybė *in vitro* sukurti peptidus nenaudojant DNR ar RNR, kurie pasižymi infektyvumu bei patogeninių žymių pasireiškimu *in vivo*. (Benetti et al., 2010)

Priono idėja bei sąvoka pasiūlyta 1982 metais Stanley B. Prusiner (JAV), kuris buvo apdovanotas Nobelio premija 1997 už tyrimus šioje srityje. Po pirminių žmonių būdingų kuru ir Creutzfeldt-Jakob ligų perdavimo beždžionėms, pradėta ieškoti lėtai veikiančių virusų, sukeliančių analogišką ligą scrapie avyse bei ožkose. Tiriant scrapie užkrėtus žiurkėnus atrasti baltymo žymenys, tačiau nebuvo išskirta virusinių nukleorūgščių žymenų. Prusiner pasiūlė priono terminą apibūdinti infekcinėmis savybėmis pasižyminčius baltymus, sukeliančius scrapie ir Creutzfeldt-Jakob ligas. Netrukus pavyko išskirti 27 - 30 kDa baltymą, kuris pasižymėjo scrapie infektyvumu. Sacharozės gradiento ultracentrifugavimo metu iš scrapie užkrėtų žiurkėnų smegenų išskirtos dvi frakcijos, lengvoji - mažų 27 - 30 kDa baltymo dalelių (oligomerų) ir sunkioji - didelių, pailgų struktūrų amiloidinių fibrilių, sudarytų iš to paties baltymo.

Pradedant 1985 metais neurodegeneracinėmis ligomis sergančių pacientų smegenys po mirties buvo tiriamos, siekiant identifikuoti plokštelių, raizginių ir tarpląstelinių kūnelių struktūrą bei kompoziciją. Atrasta, jog visi baltymai, sudarantys šiuos darinius, tam tikromis sąlygomis agreguoja į amiloidines fibriles. Alzheimerio ligos atveju, amiloidinėse fibrilėse aptiktas Aβ peptidas, kuris yra mažesnė dalis pilno amiloidinio pirmtako baltymo (APP). Neurofibriliniai raizginiai daugumoje neurodegeneracinių ligų pasižymėjo τ baltymo gausa. Mutacijos tuose pačiuose baltymuose ar jų metabolizme aptiktos ir tiriant paveldimas neurodegeneracines ligas. Šių mutantinių genų ekspresija transgeninėse pelėse atspindėjo daugelį žmogaus ligos aspektų. Tai



leido spėti, jog tokiose ligose kaip Alzheimerio ar Parkinsono sindromai gali dalyvauti prioninėmis savybėmis pasižymintys baltymai.

Negana to, kol kas nėra sukurta metodika pagaminti infektyvų PrP *in vitro*, pasižymintį visomis natyvaus PrP<sup>Sc</sup> savybėmis, kas galutinai patvirtintų baltyminės infekcijos modelį (Legname et al., 2004, Raymond et al., 2012).

## **1.2. Prionai ir su jais susijusios ligos**

Prionai – baltymai, gebantys įgyti alternatyvias stabilias konformacijas, kurios gali veikti kaip katalizatorius tolimesnei kitų baltymų molekulių konversijai. Baltymų transformacija į prioninę formą dažniausiai susijusi su  $\beta$  klosčių struktūrų formavimusi ir agregacija į oligomeras bei amiloidines fibriles.

### **1.2.1. Priono koncepcija**

Prionai yra infektyvūs, save replikuojantys baltymai, sukeltantys neurodegeneracines ligas, taip pat žinomas kaip spongiforminės encefalopatijos. Prioninių ligų metu, PrP<sup>Sc</sup> paveikia aplinkinius natyvios, funkciją atliekančios formos PrP<sup>C</sup> baltymus, skatindamas infektyvaus konformacinio izomero formavimąsi, stipriai pakreipdamas izomerizacijos pusiausvyrą į PrP<sup>Sc</sup> formavimosi pusę. Šie baltymai turi iš pradžių susilankstyti į prioninę formą ir tada, susikaupus pakankamam jų kiekiui, prionai galėtų dauginti patys save naudodami įprastų baltymų gausą. Tokiu būdu prionų dauginimasis tampa nekontroliuojamu procesu ir galiausiai yra padaroma žala centrinei nervų sistemai. Pradinis šios konversijos etapas, tai yra, pirmojo stabilaus PrP<sup>Sc</sup> susiformavimas, yra laikomas pirmuoju ir fundamentaliu įvykiu prioninės ligos vystimeši. (Sandberg et al., 2011)

Nepaisant to, kad dauguma paveldimas neurodegeneracines ligas sukeliančių mutantinių baltymų yra ekspresuojami nuo embriogenezės, neurologiniai simptomai nėra pastebimi iki organizmo senėjimo procesų pradžios. Galima manyti, kad senėjimas aktyvuoja tam tikrus procesus, kurie sudaro sąlygas ligai būdingiems baltymams tapti patogeniškais. Yra pasiūlyta daug galimų priežasčių paaiškinančių vėlyvą paveldimų neurodegeneracinių ligų pasireiškimą, pvz. DNR, lipidų bei baltymų oksidacija, autofagijos sulėtėjimas, egzogeninių toksinų kaupimasis (sunkieji

metalai, hormonai ir kt.), klaidinga šaperonų veikla ir kt. Deja, nėra pakankamai duomenų patvirtinančių šiuos mechanizmus. Prionų oligomerų formavimasis ir amiloidinių fibrilių kaupimasis iš įprastų baltymų leidžia paaiškinti daugelio skirtingų neurodegeneracinių ligų vėlyvą manifestaciją, individo amžių bei genetinį polinkį laikant svarbiausiais rizikos faktoriais.

Yra manoma, kad beveik visi baltymai tam tikromis sąlygomis gali tapti netirpiais ir suformuoti amiloidines fibriles. (Goldschmidt et al., 2010) Visų su amiloidiniais baltymais susijusių ligų atvejais šis procesas yra lėtas ir vyksta daugelį metų iki pirmųjų simptomų atsiradimo. Pačių amiloidinių fibrilių formavimasis panašus visiems amiloidiniams baltymams, jiems sudarant tirpius oligomeras, netirpius prefibrilinius agregatus bei protofibriles. (Dillin et al., 2011) Nepaisant variacijos baltymo pirminėje struktūroje, visi amiloidiniai baltymai pasižymi dideliu  $\beta$  klosčių kiekiu, persidengiančiomis hidrofobinių grupių sąveikomis ir to sąlygotu atsparumu įprastai baltymų degradacijai. Į visas šias prioninių baltymų savybes galima žvelgti ir iš pozityvios perspektyvos – galima pasitelkti amiloidinių fibrilių temperatūrinį bei konformacinį stabilumą, savęs surinkimą ir kitas savybes kuriant specializuotos funkcijos nanomedžiagas.

### **1.2.2. Priono baltymo biologinė funkcija**

Iki šiol nėra žinoma tiksli prioninio baltymo biologinė funkcija. Priono baltymo geno Prnp abliacija pelėse nesukuria išskirtinio fenotipo, iš kurio būtų galima spręsti apie baltymo funkciją. Tačiau, nepašalinant viso geno, o tik įvedus taškinę mutaciją ar deleciją centriniame hidrofobiniame baltymo regione, pelės fenotipe išryškėja stiprus neurotoksiškumas bei neurodegeneracija. (Weissmann et al., 2003) Dauguma paveldimų prioninių ligų formų pasižymi mutantinio priono baltymo raiška, kas leidžia manyti, jog nuokrypis nuo natyvios baltymo formos nėra gerai toleruojamas ir padidina neteisingo priono baltymo sulankstymo tikimybę. (van Rheede et al., 2003)

Naujausi prionų tyrimai natyviai PrP formai priskiria kelias funkcijas: dalyvavimą neuronų signalų tinkluose, neurogenezėje bei embriogenozėje ar net ilgalaikės atminties formavimą. (Fleisch et al., 2013, Majumdar et al., 2012) Taip pat pasiūlytos ir viduląstelinės PrP<sup>C</sup> funkcijos, tokios kaip apsauga nuo oksidacinio streso, metalų jonų transportas, neurotoksiškumas bei apsauga nuo jo. (Bhamra, 2014) Visgi, labiausiai tikėtina, kad PrP<sup>C</sup> yra pleiotropinis baltymas, turintis daug

skirtingų, moduluojančių funkcijų, tačiau jos atlieka tik pagalbinį vaidmenį, tai yra, nėra būtinos organizmo išgyvenimui. (Singh et al., 2015)

Žinduoliuose identifikuota daugiau nei 10 baltymų, turinčių prioninę formą, panašus skaičius aptiktas ir grybų karalystėje. Kai kurie prionai yra naudingi, atliekantys tam tikras ląstelines funkcijas, tuo tarpu kitos prionų formos sukelia neurodegeneracinius efektus. Amiloidinėmis savybėmis pasižymintys žinduolių baltymai atlieka konkrečias funkcijas ir nesukelia jokių patologinių reiškinių, pavyzdžiui citoplazminis poliadenilino elementą prijungiantis baltymas (CPEB), mitochondrinis antivirusinio signalo baltymas (MAVS), T ląstelėms būdingas viduląstelinis antigenas 1 (TIA-1). Tai parodo, kad ne visi amiloidiniai baltymai yra kenksmingi. Viena iš jų funkcijų gali būti neutralizuoti nedidelių nefibrilinių neteisingai sulankstytų baltymų kompleksų neurotoksiškumą, sujungiant juos į vieną grupę, taip sumažinant jų cheminį aktyvumą. (Bolshette et al., 2014)

### **1.2.3. Prioninių ligų patofiziologija**

Prioninės ligos gali būti skirstomos į tris kategorijas pagal kilmės priežastį: sporadiškai atsirandančios (nežinomos priežastys), paveldimos (sąlygotos genetinių faktorių) ir įgytos (infektyvios baltymo formos perdavimas tarp individų).

Prioninės ligos nepasireiškia iškart susirgus, kadangi jos pasižymi ilgu inkubaciniu periodu prieš pasireiškiant pirmiesiems klinikiams simptomams. Ankstyvieji neurologiniai simptomai yra plataus spektro: depresija, atminties praradimas, ataksija, epilepsija ir kt. Šie simptomai yra skirtingi kiekvienam pacientui ir dažnai medikų yra neteisingai priskiriami kitoms neurodegeneracinėms ligoms. (Brown et al., 1979, Collinge et al., 1992) Prioninės ligos šiuolaikiškai įvertinamos pasitelkus klausimynus, magnetinio rezonanso, elektroencefalografijos metodus. (Thompson et al., 2013) Nepaisant postūmių įvertinant prioninių ligų simptomus, iki šiol nėra galimybės išgydyti ar tik prislopinti ligos eigą.

Kadangi dėl prioninių ligų mirusių pacientų smegenys panašėja į kempinę, ši ligų grupė bendrai vadinama spongiformine encefalopatija arba tiesiog kempinlige. „Skylės“ smegenyse atsiranda dėl masiškos neuronų, glijos ir kitų ląstelių žūties. Smegenų audinį ištyrus imunohistochemiškai,

išskiriamos tankios amiloidinės plokštelės bei inkluzijos, kurių forma bei tipas ryškiai būdingi prioninio pobūdžio ligai. (Flechsigt et al., 2003)

Dauguma neurodegeneracinių ligų žmonėms pasireiškia sporadiškai, 10 - 20 % - dėl paveldimų genetinių faktorių. Neurodegeneracinių ligų vėlyvas pasireiškimas tikėtina yra nulemtas stochastinių prionų formavimosi procesų. Prionų kiekis turi peržengti tam tikrą ribą, pirmųjų stabilių oligomerų susiformavimą, po kurios jis gali didėti nesustabdomai ir sukelti patologinius reiškinius.

Creutzfeldt-Jakob liga, kempinligė, kuru yra geriausiai ištirtos ligos iš šios grupės, visos jos yra mirtinos ir neturinčios terapinių priemonių. Taip pat egzistuoja hipotezių, kad į prionus panašūs ar net pats priono baltymas atlieka reikšmingą vaidmenį ir kitose neurodegeneracinėse ligose, kaip Alzheimerio ( $A\beta$ ,  $\tau$  peptidai), Parkinsono ( $\alpha$ -sinukleinas) sindromai (Prusiner, 2012, Soto, 2012). Nors didžioji žmonių prioninių ligų dalis yra pavieniai atvejai, yra žinoma, kad tam tikrais atvejais prionais galima užsikrėsti (Klug et al., 2013, Lang et al., 1998).

Patogeniniai žinduolių prionai apima prioninį baltymą (PrP),  $\beta$  - amiloidinį peptidą ( $A\beta$ ),  $\tau$  baltymą,  $\alpha$  - sinukleiną, superoksido dismutazę 1 (SOD1) ir kitus. Visi jie sukelia ar dalyvauja specifinėse neurodegeneracinėse ligose. Žinduolių prioniniai baltymai formuoja  $\beta$  klosčių struktūras ir oligomerizuojasi tarpusavyje, stabilizuodami šią struktūrą ir paspartindami tolimesnę savęs dauginimo reakciją. Prionų savęs dauginimo reakcijos kontrolė nėra iki galo ištirta, tačiau yra kritiškai svarbi organizmo gerbūviui. Patogeninių žinduolių prionų dauginimasis yra paremtas eksponentine kinetika, tuo tarpu tikslūs mechanizmai, kuriais prionai sukelia atitinkamas ligas nėra žinomi.

#### **1.2.4. Prioninių ligų ląsteliniai reiškiniai**

Po transkripcijos ir translacijos susidaręs baltymas susilanksto ar yra sulankstomas į natyvią, dažniausiai tretinę ar ketvirtinę, formą, gebančią atlikti tam tikrą funkciją. Konkretaus baltymo įgijama forma šio proceso metu yra daugiausia nulemta paties baltymo amino rūgščių sekos. Transliacijos metu surinkta polipeptidinė grandinė yra veikiamą dviejų pagrindinių jėgų - hidrofobinių sąveikų, vykstančių tarp grandinės hidrofobinių segmentų su dideliu hidrofobinių amino rūgščių skaičiumi ir hidrofiliųjų sąveikų dėl įkrautų ar polinių amino rūgščių šoninių

grandinių, kurios sąveikauja su citozolio aplinka. Yra ir daugiau sąveikų, būdingų tam tikriems baltymams, pavyzdžiui integraliniai baltymai, turintys hidrofobinių ir/ar hidrofilinių sąveikų su lipidiniu dvisluoksniu. Visoms šioms sąveikoms susidaryti tiksliai ir greitai padeda šaperonų baltymų klasė, kurios baltymai dalyvauja beveik visų baltymų lankstyme. Kaip ir kiekvienas biologinis procesas, baltymų lankstymas nėra tobulas ir kartais baltymai yra sulankstomi neteisingai. Tokių nefunkcionalių baltymų kaupimasis ląstelėje yra reguliuojamas proteosominės sistemos, skaldančios šiuos bei kitus, nebereikalingus ląstelei baltymus. Jei neteisingo baltymų susilankstymo bei agregacijos greitis viršija proteosominės sistemos veikimo greitį, baltymai gali suformuoti nesuskaidomus viduląstelinius ar užląstelinius kompleksus, kurių kaupimasis gali nulemti ląstelės apoptozę. (Eisenberg et al., 2012) Tai iš esmės apibūdina amiloidų kaskados hipotezę, pasiūlytą 1992 apibūdinti molekulinis reiškinius, vykstančius Alzheimerio ligos metu. (Hardy et al., 1992) Šiuo metu yra žinoma, kad dauguma baltymų yra tirpūs ir nors jie turi gebėjimą susilankstyti neteisingai, ląstelėse vyrauja homeostazė. Tai taip pat galioja ir ligoms, susijusioms su neteisingu baltymų lankstymusi, kurios dažniausiai sąlygojamos organizmo senėjimo ir su juo neišvengiamai susijusio baltymų agregatų kaupimosi.

Deja, vis dar nėra aišku ar patogeninės baltymo formos tiesiogiai pažeidžia nervinio audinio ląsteles, dalyvauja sudėtingesnėse biocheminėse sąveikose ar yra tik šalutinis prioninių ligų veiksnys. Pasiūlyti ir dalinai iširti variantai yra amiloidinių fibrilių sąlygotos praduriamos ląstelių membranos, glutamato homeostazės panaikinimas, vedantis į ekscitotoksiškumą, endoplazminio tinklo veiklos sutrikdymas padidinant viduląstelinį  $Ca^{2+}$  lygį, proteazių slopinimas, toksiškų užląstelinių baltymų pagausėjimas, reaktyvių deguonies formų gamyba, aksoninio transporto sutrikdymas, sinapsinių pūslelių defektų pasireiškimas bei glaudžiųjų jungčių sunaikinimas. (Bubeck, 2014). Taip pat įmanoma, kad būtent oligomerinės patogeninių žinduolių prioninių baltymų formos yra toksiškos supančioms ląstelėms ir oligomerų sujungimas į didesnius polimerus, pavyzdžiui, amiloidines fibriles, gali būti vienas iš natūralių apsaugos mechanizmų.

Nėra žinoma ar prionų neurotoksiškumas yra nulemtas  $PrP^C$  sumažėjimo, vedančio į pokyčius signaliniuose keliuose, ar  $PrP^{Sc}$  formavimosi ir plitimo. Tačiau dabartinis prionų replikacijos modelis sufleruoja, jog susiformavusios fibrilės turi iširti, kad susidarytų naujas  $PrP^{Sc}$  šablonas ir formuotųsi naujos fibrilės.

#### 1.2.4.1. Priono baltymo degradacija *in vivo*

Ląstelėje PrP<sup>C</sup>, kaip ir dauguma kitų ląstelės paviršiaus baltymų, yra skeliamas keliais būdais, sukuriant naują baltymo funkciją ar ją panaikinant. PrP<sup>C</sup> proteolizės svarbą nurodo tai, kad ląstelėse ir audiniuose pilno ilgio priono baltymo yra mažiau nei jo dalių sumos. (Kuczius et al., 2007) Visais priono baltymo degradacijos atvejais, baltymo C galas lieka prijungtas prie membranos ir gali būti endocituojamas, tuo tarpu nukirptas baltymo N galas lieka užląstelinėje erdvėje. (Haigh et al., 2016, Liang et al., 2012, Mangé et al., 2004)

- $\alpha$  skėlimas, tarp 109 – 110 amino rūgščių, veikiant ADAM grupės proteinazėms. Tai yra pagrindinis baltymo skėlimo būdas centrinėje nervų sistemoje, generuojantis C1 ir N1 fragmentus. Ši post-transliacinė modifikacija gali būti laikoma kaip turinti apsauginę funkciją, kadangi apsaugo nuo potencialiai žalingo  $\beta$  skėlimo;
- $\beta$  skėlimas, netiksliai skeliamas tarp 74 ir 103 amino rūgščių, generuoja C2 ir N2 fragmentus. *In vivo* dalyvaujantys baltymo skėlimo fermentai nežinomi, manoma, kad gali veikti aktyvios deguonies formos, kalpainsas, katepsinas. (Dron et al., 2010) Įdomu tai, kad  $\beta$  skėlimas vyksta tik PrP<sup>Sc</sup> ir nevyksta esant PrP<sup>C</sup> baltymo izoformai. (Altmeppen et al., 2012) Nors manoma, kad šis skėlimas sukuria nefunkcinę patogeninę baltymo formą, genetinė modifikacija išjungianti  $\beta$  skėlimo veikimą padidina ląstelių imlumą oksidaciniam stresui (Watt et al., 2005);
- $\gamma$  skėlimas, vykstantis tarp 176 ir 200 amino rūgščių goldžio komplekse. Šis skėlimas gali įvykti prieš baltymo migraciją į plazminę membraną (iškart po transliacijos) arba jį endocitavus. Ši post-transliacinė modifikacija vyksta pakankamai retai ir kol kas yra mažiausiai ištirta (Lewis et al., 2016);
- Baltymo membranos inkaro pašalinimas, skeliant netoli glikofosfatidilinozitolio inkaro. Proceso veikia pagrindinai ADAM10 metaloproteazė.

### 1.3. Priono baltymo struktūra

Nors didžiausia priono baltymo dalis yra neuronų viduląstelinėje dalyje, jis yra ekspresuojamas visoje centrinėje nervų sistemoje ir ekspresijos lygis priklauso nuo CNS regiono, ląstelės tipo bei kitų biocheminių žymenų. (Prusiner, 2013) Natyvus priono baltymas yra lokalizuotas ląstelės

paviršiuje, prijungtas išorinėje lipidinio bisluoksnio dalyje, per glikofosfatidilinozitolį baltymo C gale. Pilnas priono baltymas N gale turi signalinę seką, skirtą lokalizuoti baltymą išorinėje membranos dalyje prijungus glikofosfatidilinozitolį. Subrendusi žinduolių priono baltymo forma yra gaunama nukirpus N (1 – 22 amino rūgštys) ir C (231 – 254 amino rūgštys) signalinius galus ir turi 208 amino rūgštis. (Puig et al., 2014) Galutinė natyvaus priono baltymo forma gali būti glikozilinta Asn180 bei Asn196. Fakultatyvus glikozilinimas sukuria priono baltymui būdingą trijų juostų žymenį analizuojant mėginius Western blot metodika, atitinkančius dvigubai, viengubai glikozilintus ir neglikozilintus baltymus.

Tiriant infektyvaus priono baltymo konformaciją, iškyla bendros problemos, būdinga visoms su neteisingu baltymų susilankstymu susijusioms ligoms – tirpaus vienalyčio mėginio išgavimas. Nepaisant to, vienas sėkmingiausių struktūrinių PrP<sup>Sc</sup> tyrimų atliktas panaudojant elektronų mikroskopą, kuris leidžia įvertinti baltymo konformacinio izomero 3D formą. (Serpa et al., 2013) Priono baltymas pagal amino rūgščių sekos ypatumus bei struktūrą gali būti suskirstytas į 3, dalinai persiklojančius domenų (Bhamra, 2014):

- lankstų, daug glicino amino rūgščių turintį N galo domeną (23 – 120 amino rūgštys), kuriame du įkrauti CC1 ir CC2 regionai bei penki oktapeptido pasikartojimai (OPR regionas);
- hidrofobinį regioną, pasižymintį membraną pereinančios spiralės seka (PTM) (110 – 134 amino rūgštys);
- globulės formos domeną (121 – 230 amino rūgštys), kuris yra pagrindinis su kitais prionų baltymais sąveikaujantis komponentas prioninėse ligose.

Amino proksimalinėje baltymo dalyje (23 – 120 amino rūgštys) yra daug glicino amino rūgščių, kurie padidina baltymo gebėjimą lankstytis šioje dalyje. Tai patvirtina branduolių magnetinio rezonanso tyrimai, kurie yra itin sudėtingi tiriant šią baltymo dalį dėl didelio galimų priono baltymo konformacijų skaičiaus. (Giachin et al., 2013) *In vivo* ir *in vitro* tyrimai parodė, kad dalis lankstaus N domeno (23 – 88 amino rūgštys) gali būti pašalinta nuslopinant PrP<sup>Sc</sup> formavimosi efektyvumą. Lanksti priono baltymo dalis dalyvauja tiek vidumolekulinėse, tiek tarpmolekulinėse sąveikose, reikalingose formuoti PrP<sup>Sc</sup>, dalinai per oktapeptido fragmentą. (Supattapone et al.,

2001) Priono baltymo N galas yra multifunkcinis ir, nepaisant savo lankstumo, nėra atsitiktinai susilankstęs *in vivo*. Kadangi N galas yra tiesiogiai prijungtas prie lipidinio dvisluoksniu, tikėtina, kad lipidinė mikroaplinka stabilizuoja tam tikrą apibrėžtą natyvią domeno struktūrą. (Di Natale et al., 2010) Šio domeno delecija transgeninėse pelėse sukelia ataksijas ir smegenėlių pažaidas. (Weissmann et al., 2003) Kadangi viename tyrime priono baltymo fibrilių disociacija stebėta tik pilno ilgio baltymo agregatuose (23 – 230 amino rūgštys), o ne baltymo mutante be 23 – 90 amino rūgščių N galo peptido, manoma, kad priono baltymo N galas gali dalyvauti krūvių sąveikoje tarp baltymo regionų. (Qi et al., 2012)

Kaip ir amiloido pirmtako baltymo atveju, priono baltymo N-galas yra nuskeliamas, o mutacijos aplink skėlimo vietą yra siejamos su pagreintu amiloidinių fibrilių formavimusi. (McDonald et al., 2014) Dėl šios priežasties, dauguma tyrimų naudoja prionų baltymus su nukirptu N galu (89 – 230 amino rūgštys ar trumpiau), kadangi prarandamos amino rūgštys nėra būtinos amiloidinėms fibrilėms formuotis. Tačiau dalis N galo peptidinės grandinės taip pat formuoja mažiau stabilias struktūras oligomeruose, kas gali būti susiję su PrP<sup>C</sup> stabilumu ar PrP<sup>Sc</sup> agregacija. (Chatterjee et al., 2013)

PrP<sup>C</sup> C galo regionas turi dvi β klostes, tris α spirales ir glikofosfatidilinozitolio inkarą, prikabinatą prie paskutinės (230) amino rūgšties. α2 ir α3 spiralės sujungtos formą ir funkciją stabilizuoja dvi disulfidiniai tilteliai per cisteino amino rūgštis. (Ning et al., 2014) Manoma, kad C galo regionas yra fundamentali PrP<sup>C</sup> konversijos dalis, procese dalyvaujant pagalbinėms sritims bei faktoriams. Konversijos metu didžiausias konformacinis pokytis įyksta būtent C galo regione, kur α spiralės tampa β klostėmis. (Chen et al., 2013) Iš trijų priono baltyme esančių α spiralių, stabiliausia yra α1, mažiau stabili α3 ir mažiausiai α2, kuri pakitus sąlygoms geba greičiausiai išsivynioti ir pakeisti struktūrą į β klostes. (Yamaguchi et al., 2013)

Kadangi kol kas nėra nustatyta pakankamai aukštos rezoliucijos oligomerinės PrP<sup>Sc</sup> formos struktūra, ieškant terapinių priemonių tenka remtis PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> reakcijos molekulinio mechanizmu. Yra pasiūlytos tvi galimybės nuslopinti ar sustabdyti ligos eigą. Abi jos remiasi agregacijos eigai esminių baltymo PrP<sup>C</sup> formos α spiralių (α1 ir α2) stabilizavimu cheminiais metodais (antikūnai, ligandai). (Singh et al., 2014) Tokiu būdu yra potencialiai sumažinama natyvių proteazių apkrova, leidžiant joms sunaikinti neteisingai besilankstančius baltymus ir taip sustabdant tolimesnį PrP<sup>Sc</sup> fibrilių ilgėjimą. (Singh et al., 2015)



Egzistuoja minimalus priono baltymo segmentas, kuris gali užkrėsti kitus, pilno ilgio baltymus, vadinamas miniprionu. (Bonetto et al., 2002) Pilno ilgio pelės priono baltymo atveju, esminė peptidinė grandinė suformuojanti miniprioną nustatyta kaip baltymo 127 – 143 amino rūgščių peptidas. (Chatterjee et al., 2013) Nors miniprionas ir yra naudingas modelis įvairiems kinetiniams tyrimams, jo negalima tiesiogiai lyginti su pilno ilgio PrP<sup>C</sup> baltymu bei jo kinetika.

### **1.3.1. Tarprūšinis barjeras**

Priono baltymas yra evoliuciškai konservatyvus žinduoliuose. Specifiškai, labiausiai konservatyvios yra baltymo glikozilinimo vietos, hidrofobinis regionas bei disulfidinį tiltelių formuojančios cisteino šoninės grupės. Tai leidžia manyti, kad šios lokacijos yra itin svarbios normaliai priono baltymo funkcijai palaikyti arba, kad bet kokia mutacija baltymą padaro itin infektyviu. (van Rheede et al., 2003) Įdomu tai, kad tarprūšinis barjeras vis tiek egzistuoja, nepaisant didelio sekos homologijos lygio.

Nors manoma, kad tarprūšinį barjerą PrP sukuria pačių baltymų sekų skirtumai, barjero stiprumo neįmanoma nustatyti prionų baltymų sekų palyginimu. Tiriant tarprūšinį barjerą būtina naudoti *in vitro* ar *in vivo* technikas. (Castilla et al., 2008) Savaiame suprantama, kad nors *in vivo* tyrimai pateikia labiau realybę atspindinčius rezultatus, tačiau be juos supančių etinių įsipareigojimų, neįmanomi ir kai kurių organizmų atsparumų prionams tyrimai, pavyzdžiui, žmogaus. Istoriškai iš klinikinių atvejų žinoma, kad galvijų smegenų encefalopatijos yra perduodamos žmonėms ir joms tirti privalomi *in vitro* tyrimai su žmogaus priono baltymu. (Castilla et al., 2008)

Nors rekombinantinis priono baltymas nėra glikozilintas bei neturi glikofosfatidilinozitolio inkaro, jo tretinė struktūra yra identiška natyviame, iš organizmo smegenų išskirtam priono baltymui. (Moda et al., 2015) Negana to, skirtingomis sąlygomis paruošti amiloidogeniniai rekombinantinio priono baltymo mėginiai geba sukurti skirtingus kamienus ir neuropatologinius žymenis *in vivo*. (Moda et al., 2015) Visa tai leidžia manyti, kad patologinės priono baltymo savybės nepriklauso nuo jo postransliacinių modifikacijų ir tai įgalina daugelį priono baltymo funkcijų, kinetiką bei struktūrą aiškinančių tyrimų atlikti *in vitro* sąlygomis.

### 1.3.2. Prionų kamienai

PrP<sup>Sc</sup> susiformuoja po konformacinio PrP<sup>C</sup> pokyčio, kurio metu susidaro daugiau  $\beta$  klosčių turinti struktūra. (Eisenberg et al., 2012) Vienas konkretus amiloidinėmis savybėmis pasižymintis baltymas gali sukurti kelis skirtingus savo erdvine konformacija besiskiriančius kamienus ir jie gali būti skirstomi pagal šias savybes (Morales et al., 2007):

- Gebėjimą užkrėsti kitus baltymus, ląstelių kultūras;
- Baltymo glikozilinimo lygį (neglikozilintas, mono- ir di- glikozilinti);
- Inkubacijos laiką (užkrėtimo proceso greitį bei kinetiką);
- Atsparumą proteinazei K (kai kurių kamienų amiloidinės fibrilės visiškai atsparios degradacijai).

Bet kuris kamienas išlaiko savo struktūros unikalumą užkrėsdamas kitus baltymus. Dėl šios priežasties, visi tam tikros prioninės ligos metu susidarę baltymų agregatai yra to paties kamieno ir pasižymi analogiškomis savybėmis. (Mahal et al., 2007)

Pagal apibrėžimą, PrP<sup>Sc</sup> yra proteinazei K atsparti baltymo forma, tačiau prioninėse ligose gali dalyvauti ir proteinazei K neatsparios oligomerinės baltymo formos, pasižyminčios identiškai ar panašiai į PrP<sup>Sc</sup> struktūra. (Sajnani et al., 2012) Patogeninės oligomerinės PrP formos gali būti išskiriamos tiesiogiai iš smegenų audinio, neveikiant jo proteazėmis, taip pat aptinkamos ląstelių kultūrų viduląstelinėje aplinkoje. (Singh et al., 2015)

Vienas iš būdų tirti amiloidinių fibrilių kinetiką yra naujų kamienų paieška. Panaudojant tą patį baltymą, tačiau varijuojant kitomis sąlygomis (temperatūra, denatūrantais bei jų koncentracija, tirpikliais) galima sukurti skirtingomis savybėmis (infektyvumu, kinetiniais parametrais) pasižyminčius amiloidinius kamienus. Tai rodo, kad aplinkos faktoriai nulemia amiloidinio kamieno prigimtį pirminės nukleacijos metu, tuo tarpu elongacijos metu kamienas išlaiko savo unikalumą. (Sneideris et al., 2015)

### 1.3.3. Amiloidinės fibrilės

Dėl savo dydžio, amiloidinių fibrilių struktūra dažniausiai vizualizuojama transmisinės elektroninės mikroskopijos arba atominės jėgų mikroskopijos metodais. Ištyrus įvairių baltymų

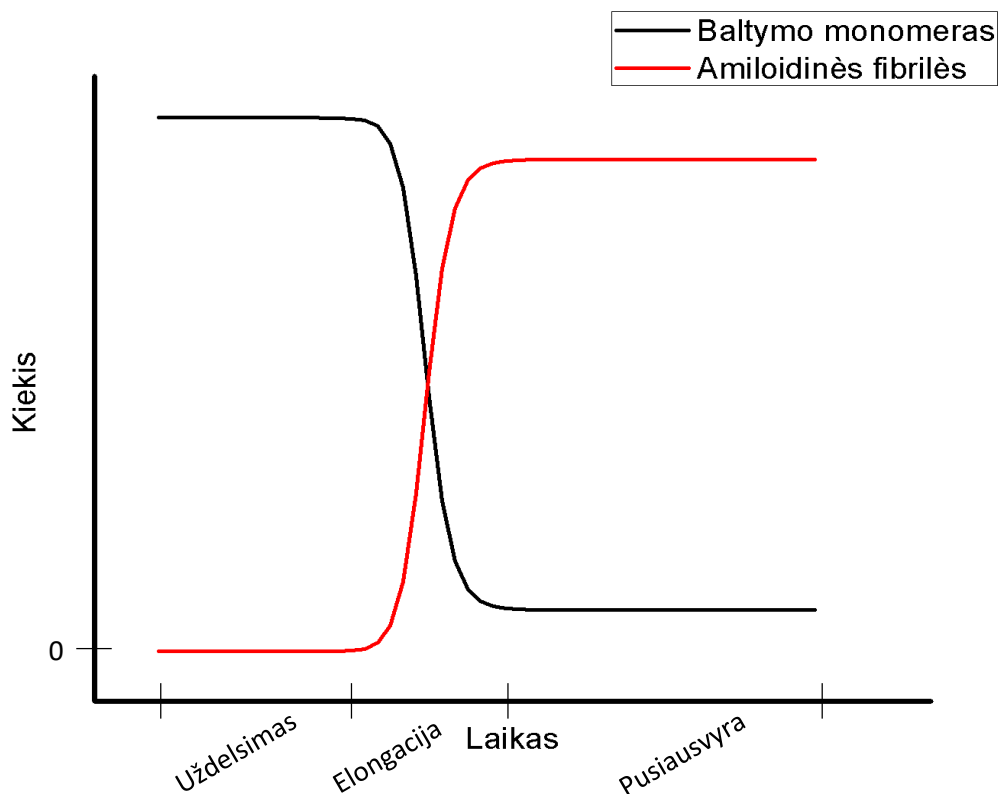
amiloidinių fibrilių struktūrą pastebėta, kad jos formuoja nesišakojančias linijines gijas, pasižyminčias įvairiu sukimo lygiu. Fibrilių diametras varijuoja tarp 2 – 20 nm, ilgis gali siekti kelis mikronus. (Gillam et al., 2013) Keičiant aplinkos faktorius (pH, druskų bei denatūrantų koncentracijas) galima išskirti skirtingo ilgio fibriles. Bendru atveju, trumpesnės fibrilės (oligomerai) pasižymi didesniu toksiškumu amiloidinėse ligose. (Tycko et al., 2013)

Teoriniai skaičiavimai rodo, kad egzistuoja 20 – 25 kcal energijos barjeras, reikalingas PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> reakcijai vykti. (Singh et al., 2017) Padidinus prionų agregacijos reakcijos temperatūrą susidaro metastabilios baltymo struktūros, kurios gali skatinti netvarkingą baltymo susilankstymą. Metastabilios priono struktūros stabilizuojamos daugiausia vidumolekulinių jėgų – terminalinių domenų sąveikos, globulinės formos, vidumolekulinių vandenilinių ryšių, didesnio β klosčių skaičiaus. (Singh et al., 2017)

Amiloidinių fibrilių termodinaminį stabilumą lemia tai, kad jų sukurta baltymo konformacija pasižymi žemiausia laisvąja energija ir yra stabilesnė už natyviają baltymo struktūrą. (Gillam et al., 2013) Amiloidinės fibrilės išlaiko savo konformacinį stabilumą esant itin aukštomis stiprių baltymų denatūrantų koncentracijoms. Priklausomai nuo kamieno, prionų amiloidinės fibrilės gali išlikti stabilios esant net 7,5 M guanidino hidroklorido koncentracijai. (Cobb et al., 2014)

#### **1.4. Prionų agregacijos kinetika**

Fibrilių formavimosi mechanizmo bei kinetikos suvokimas yra esminis norint sukurti būdus slopinti ar sustabdyti fibrilių augimą. Mažai daliai baltymų išsilankstant ir atveriant amiloidogeninius segmentus, kurie tarpusavyje suformuoja stabilų branduolį, gali prasidėti grandininė reakcija, kurios metu kitos dalinai išsilanksčiusios baltymų molekulės yra stabilizuojamos ir formuojamos protofibrilės. Šiam procesui pasikartojant ir toliau stabilizuojant branduolį susidaro tvarkingos struktūros amiloidinės fibrilės. (Goldschmidt et al., 2010) Vienas gerai ištirtas neurodegeneracinės ligos pavyzdys, kuriame dalyvauja amiloidinės fibrilės, yra Huntingtono sindromas, kur huntingtino baltymas turi keletą poli-Glu pasikartojimų, o jų skaičius nulemia ligos simptomų pasireiškimo amžių.



**1 pav.** Amiloidinių fibrilių formavimosi kinetika bendru atveju. Išskiriamos uždelsimo, elongacijos ir reakcijos pabaigos (pusiausvyros) fazės.

Viena dažniausiai taikomų metodikų, baltymų neteisingo susilankstymo ciklinis amplifikavimas (PMCA, *protein misfolding cyclic amplification*), naudoja trumpus ultragarso intervalus, skirtus suskaldyti besiformuojantiems PrP<sup>Sc</sup> agregatams į mažesnius amplifikacijos centrus, "sėklas" (Pav. 1) (Soto et al., 2006). Vis dėlto, maža išeiga, PMCA reakcijų sudėtingumas esant natyviems baltymams iš smegenų homogenato neleidžia daryti griežtų išvadų apie infektyvių baltymų lankstymosi mechanizmą (Timmes et al., 2013). Nepaisant to, šiuo metu yra pasiūlyta nuostata keturiems etapams fibrilių formavimėsi (Pav. 2) (Meisl et al., 2014, Sneideris et al., 2015, Soto et al., 2006):

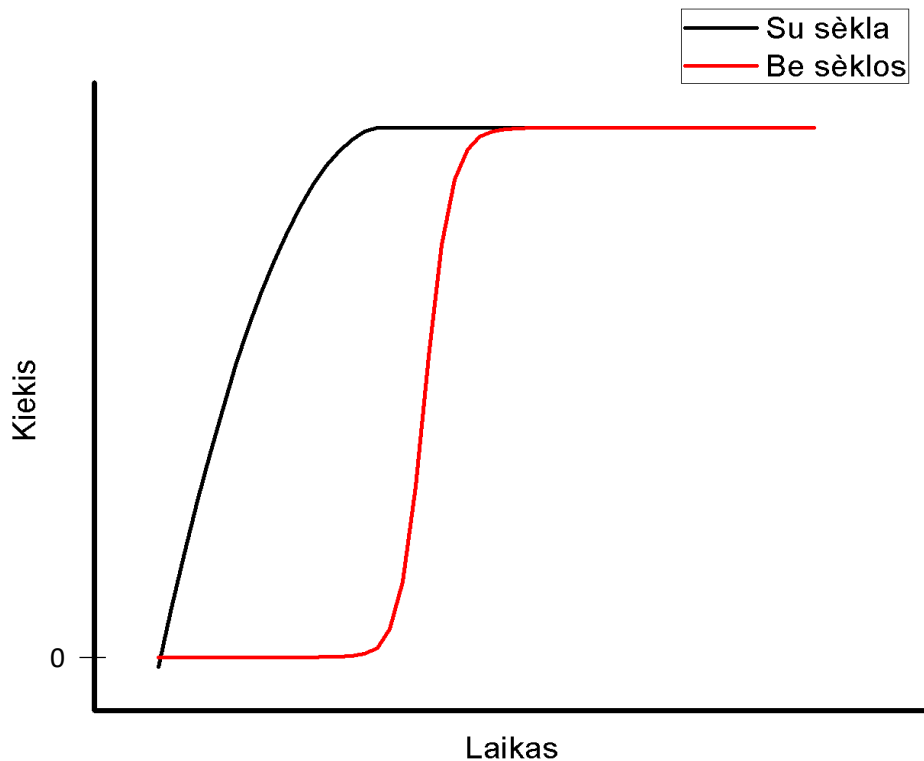
- Pirminė nukleacija – dalies reakcijos terpėje esančių baltymo molekulių stochastinis spontaniškas erdvinės struktūros pakeitimas, sujungiant tuos baltymus tarpusavyje į pirminius reakcijos branduolius. Šis procesas yra itin lėtas, galintis užtrukti nuo dienų iki dešimtmečiųdėl stochastinio etapo prigimties (pav. 1).;
- Elongacija – susidarę nukleacijos branduoliai veikia kaip pamatai daug greitesnei reakcijai

laiko atžvilgiu, pakeisdami ir prijungdami tirpius PrP<sup>C</sup> baltymus. Iš kelias baltymų molekules turinčio oligomero elongacijos metu gali susiformuoti tūkstančius baltymų turinčios fibrilės. Šis procesas yra daug kartų greitesnis už pirminę nukleaciją (pav. 1). Taip pat, elongaciją greitina didesnio branduolių skaičiaus buvimas, kas rodo, jog patys branduoliai tam tikru būdu skatina neteisingą baltymų lankstymąsi. Pirminės nukleacijos etapą įmanoma praleisti ir pradėti reakciją nuo elongacijos į sistemą įvedant sėklą – iš anksto susiformavusių amiloidinių branduolių (pav. 2);

- Fibrilių fragmentacija – susidariusių fibrilių suskaldymas, sukuriant naujus branduolius ir potencialias jungimosi vietas. Dėl šios priežasties fibrilių ilgis yra ribotas, o tolimesnė fibrilių elongacija gali vykti greičiau dėl antrinės nukleacijos sąlygoto reaktyvaus paviršiaus padidėjimo;
- Antrinė nukleacija – pagreitintas monomerų jungimosi procesas, sukurtas fibrilių paviršiaus ploto padidėjimo. Monomerai geba jungtis ne tik fibrilių galuose, bet ir jų viduryje.

Susiformavę prioninių baltymų branduoliai gali vykdyti veiklą ir ne natyviose sąlygose (Milto et al., 2014). Dažniausiai amiloidinės fibrilės *in vitro* sudaromos esant gana didelei denatūrantų koncentracijai. Tokiomis sąlygomis didžioji dalis natyvaus baltymo yra išsivyniojusi ir tai potencialiai palengvina jungimąsi prie nukleacijos branduolių. Taip pat nustatyta įvairių prioninių baltymų infektyvumo priklausomybė nuo pH, reduktorių įtakos, sėklos koncentracijos, temperatūros, lipidų, RNR ir kitų medžiagų (Imamura et al., 2011, Milto et al., 2014, Sneideris et al., 2015, Timmes et al., 2013). Bendra šių ir kitų tyrimų išvada teigia, kad aplinka apibūdina pirminės sėklos konformaciją, o toliau, net pakeitus aplinką, yra veikiamas tik elongacijos kinetika.

PrP<sup>Sc</sup> izoliacija ir tyrimas naudojant biologinius audinius, dažniausiai galvos smegenų audinį, yra sudėtinga dėl paties baltymo savybių – atsparumo proteinazei K, susidariusių oligomerų netirpumo bei problematiškumo, susijusio su paties audinio gavimu bei panaudojimu. Dėl šių priežasčių, dažniausiai tyrimuose yra naudojami sintetiniai prioniniai baltymai, užauginti bakterijose *in vitro*. Tai leidžia saugiai ir lengvai tirti įvairias patogenines Prnp geno mutacijas bei amiloidinės reakcijos ypatybes. PrP baltymo agregacijos kinetika *in vitro* yra stipriai nulemta reakcijos eksperimentinių sąlygų – pH, laiko, denatūrantų bei baltymo koncentracijos, temperatūros, PrP



**2 pav.** Amiloidinių fibrilių agregacijos kinetikos pokytis praleidus pirminės nukleacijos etapą, reakciją pradėdant su iš anksto suformuota sėkla

disulfidinio tiltelio stabilumo, oksidantų, buferinio tirpalo kompozicijos, baltymo ilgio ir kitų faktorių. (Kim et al., 2014, Milto et al., 2014, Singh et al., 2015)

Dėl didelės fibrilių formavimuisi įtaką darančių sąlygų įvairovės yra svarbu palaikyti pastovias aplinkos sąlygas tiriant PrP agregaciją, siekiant išvengti heterogeniškumo fibrilių dydyje bei konformacijoje. Nepaisant to, skirtingomis sąlygomis užauginti PrP<sup>Sc</sup> oligomerai pasižymi citotoksiškumu. (Singh et al., 2015)

Tioflavino-T prijungimą apibūdinančios kinetinės kreivės dažnai geriausiai apibūdinamos kaip sigmoidinės kreivės, kurios amplitudė (susijungimo į fibriles laipsnis) didėja dėl gausėjančių β klosčių kiekio bei greitėjančios monomerinės priono baltymo formos agregacijos. Kai kurios prionų agregaciją apibūdinančios kreivės pasižymi varijuojančios trukmės uždelsimo faze ( $\tau_{\text{uždelsimo}}$  (s)), po kurios seka greita akumuliacija į fibriles ( $r_{\text{max}}$  (s<sup>-1</sup>)). Baigiantis baltymo monomerui reakcijos aplinkoje, reakcijos greitis slopsta ir pasiekiami galutinė pusiausvyra tarp

amiloidinių fibrilių ir natyvaus baltymo kiekio. Toks sigmoidinis kinetinis profilis būdingas daugeliui fibrilinių procesų *in vitro*. (Gillam et al., 2013)

Baltymų kinetiniai mechanizmai yra itin jautrūs aplinkos sąlygoms. Nėra įmanoma *in vitro* pilnai atkurti mikroaplinkos sąlygų, baltymo patiriamų *in vivo*. Baltymų bei jų oligomerų sąveika su paviršiais, unikaliais *in vitro* sąlygoms, gali pakeisti reakcijos kinetiką bei mechanizmą. Nors antriniai procesai dominuoja tiriant amiloidinių fibrilių formavimąsi *in vitro*, pirminė nukleacija, suformuojanti sėklą tolimesnei reakcijos eigai, gali būti svarbiausias žingsnis norint užkirsti kelią prioninėms ligoms (Gillam et al., 2013)

Nukleacijos procesai yra stochastiškos prigimties, todėl mažėjant monomerinės formos baltymo koncentracijai, kartu mažėja ir tyrimo atsikartojamumas, net išlaikant kitas reakcijos sąlygas identiškomis. (Sneideris et al., 2015)

Kol kas nėra sukurto matematinio modelio, puikiai ir be išimčių aprašančio amiloidinių fibrilių formavimosi kinetiką. Tai gali būti tiek dėl matematinio modelio netobulumo, tiek dėl eksperimentinių duomenų netikslumo, kada yra neatsižvelgiama į agregacijoje vykstančius procesus. Dėl šių priežasčių, norint tiksliai atlikti kinetinius matavimus yra rekomenduotina griežtai kontroliuoti reakcijos sąlygas, norint užtikrinti šalutinių procesų nebuvimą. (Milto et al., 2013)

Įvertinant amiloidinės reakcijos greitį bei ribinę fluorescencijos vertę, atsitiktiniai ir mažai kontroliuojami įvykiai amiloidinių sėklų paruošimo metu yra svarbesni nei įvykiai matuojant elongacijos procesą. (Milto et al., 2013)

## 2. Medžiagos ir metodai

### 2.1. Reagentai

- Visi baltymai, įskaitant MoPrP (23 – 230) pagaminti ir išgryninti iš *E. Coli* VU Gyvybės Mokslų centre;
- Guanidino chloridas (GuHCl) (>99,7 %) (Carl Roth GmbH);
- Tioflavinas-T (Fisher Scientific)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ir kitos medžiagos buferinio tirpalo ruošimui (Fisher Scientific);

#### 2.1.1. Naudota aparatūra

- Bandelin Sonopuls 3100 Ultragarsinimo homogenizatorius su MS 72 antgaliu (Bandelin);
- Rotor-Gene Q PGR platforma (QIAGEN);
- Cary Eclipse Fluorescencijos spektrofotometras (Agilent Technologies).

### 2.2. Metodai

#### ➤ Priono sėklų ruošimas

Pilno ilgio pelės priono baltymo mėginiai paruošti esant skirtingoms 0,5 M, 2 M ir 4 M guanidino chlorido koncentracijoms 1 mL 50 mM fosfatiniame buferyje. Visų mėginių baltymo koncentracija buvo 0,5 mg/mL. Sutrumpintos formos pelės priono baltymo (89 – 230 amino rūgštys) agregacijos metu, trumpiausia uždelsimo fazė registruota pH = 6. (Colby et al., 2009) Dėl nedidelių struktūrinių skirtumų tarp baltymų bei jų funkcionalumo, šiame darbe aprašytam tyrimui taip pat pasirinkta eksperimentus atlikti esant šiai pH vertei. Kiekvienos guanidino chlorido koncentracijos ruošiniai padalinti į dvi grupes siekiant sukurti skirtingas spontaninės fibrilizacijos sąlygas – purtymo ir maišymo. Maišyti mėginiai patalpinti į sukamojo tipo inkubatorių, kuriame jie buvo sukti ir maišyti aplink horizontalią mėgintuvėlio ašį 8 apsisukimų per minutę greičiu. Purtyti mėginiai patalpinti į purtomojo tipo inkubatorių, kuriame jie buvo purtyti ir maišyti aplink vertikalią mėgintuvėlio ašį 220 apsisukimų per minutę greičiu.



Fibrilių agregacijos procesas įvertintas paimant 10 µL kiekvieno mėginio (trumpam sustabdant inkubaciją) ir atskiedžiant jį 90 µL 50 µM tioflavino T tirpalu.

Vienas dažniausiai naudojamų spektroskopinių metodų tiriant amiloidines fibriles yra tioflavino T prijungimo analizė. (Kumar et al., 2017) Tioflavinas T, dėl šiuo metu iki galo gerai nežinomų priežasčių, specifiskai jungiasi prie fibrilinės baltymų formos, tuo pačiu padidindamas savo fluorescencijos intensyvumą. Fluorescencijos sužadinimas standartiškai laikomas 440 nm bangos ilgiu, fluorescencija – apie 485 nm. Dėl savo specifiskumo jungiantis tik prie agregatų, tioflavinas T puikiai tinka įvairių fibrilių formavimosi kinetiniams tyrimams. (Kumar et al., 2017)

Šio mėginio fluorescencija tirta fluorescencijos spektrometru, sužadinant 440 nm bangos ilgiu ir registruojant 465 – 500 nm intervale; smailė registruota apie 485 nm. Tiek maišyti, tiek purtyti mėginiai inkubuoti 37 °C temperatūroje kol nenustatyta, kad fibrilių agregacija nebevysta, tai yra, nedidėja fluorescencijos intensyvumas per 24 valandas.

#### ➤ **Sėklos mėginio veikimas ultragarsu**

Prieš atliekant kinetinius amiloidinių baltymų tyrimus, pradinė sėkla dažnai yra veikia ultragarsu. Tokiu būdu nepakeičiant bendro baltymo kiekio amiloidinės fibrilės yra dalinai suardomos į trumpesnius fragmentus, kurie pagreitina tolimesnės elongacijos reakcijos eigą į reakciją pridėjus monomerinės baltymo formos. Veikimas ultragarsu taip pat sukuria homogeniškesnius prioninių baltymų oligomerus, kas potencialiai padidina tyrimų atsikartojamumą. (Milton et al., 2013)

Paruošta sėkla skiedžiama 10 (užkrečiant pelės priono baltymo 23 – 230 monomera) arba 2,5 (užkrečiant kitus baltymus) kartų iki 1 mL tirpalo tūrio, išlaikant sėklai natyvią guanidino chlorido koncentraciją. Tuomet, sėklos ruošinys veikiamas ultragarso pulsais 10 kartų po 30 sekundžių su 30 sekundžių pertraukomis naudojant Bandelin Sonopuls homogenizatorių su MS 72 antgaliu, esant 20 % homogenizavimo amplifikavimui. Bendra sistemai suteikta energija ~4.216 kJ. Ultragarso metu mėginys laikytas lede, 0 °C temperatūroje, siekiant išvengti ultragarso sukkelto temperatūros pakilimo.

#### ➤ **Sėklų užkrėtimo tyrimas**

Homogenizuotos ultragarsu sėklos gebėjimas užkrėsti monomerinę pelės priono baltymo formą tirtas 20 µL tūriuose, 60 °C temperatūroje, esant 0.5 mg/mL bendrai baltymo koncentracijai.

Mėginys buvo patalpinamas į PGR įrenginį, kuris buvo naudojamas vienu metu ir kaip inkubatorius, ir kaip reakcijos eigos matavimo įrenginys. Mėginys buvo pašildomas vieną minutę inkubatoriaus viduje, viso tyrimo metu centrifuguojamas. Reakcijos eiga tirta matuojant mėginio fluorescenciją pagal tioflaviną T, kurio koncentracija buvo 0,15 mM. Priklausomai nuo tyrimo, amiloidinei agregacijai leista vykti 15 h arba 65 h.

Mėginyje buvo procentaliai nuo monomero kiekio įdėta homogenizuotos sėklos, kurios santykinis procentalus kiekis buvo varijuojamas nuo 2 % iki 0.00625 %. Nėgana to, tyrimuose buvo keičiama guanidino hidrochlorido koncentracija, reakcijos temperatūra.

Kiekvienam mėginiui atlikti 3 – 4 pakartojimai. Kadangi amiloidinių fibrilių formavimosi kinetika yra stochastinis procesas, registruotas kiekvieno mėginio fluorescencijos intensyvumas kartais skyrėsi iki 3 kartų. Nepaisant to, kinetinė kreivė, kartu su susijusiu pusamžiu nekito per visus pakartojimus, kas rodo, kad mėginiai nesiskiria, todėl rezultatuose pateikiami aritmetiniai kreivių vidurkiai.

#### ➤ **Kryžminis sėjimas**

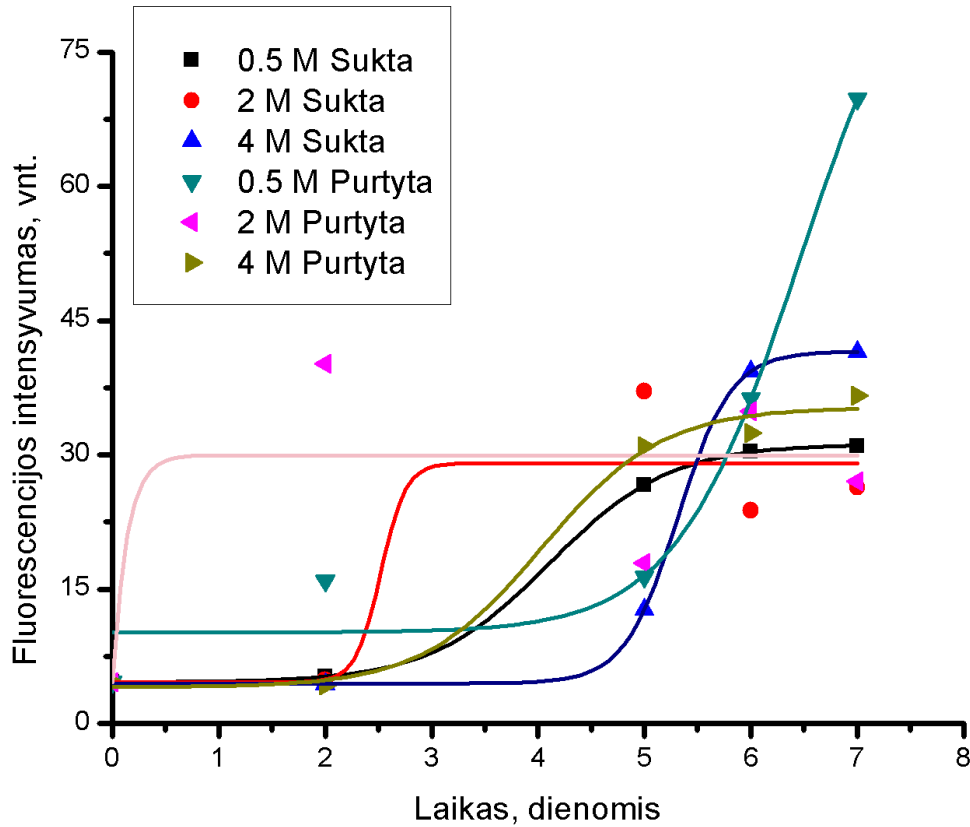
Tiriant pilno ilgio pelės priono baltymo amiloidinės sėklos gebėjimą infekuoti kitus priono baltymus, buvo atliekamos identiškos procedūros kaip aprašyta sėklų užkrėtimo tyrime aukščiau. Metodiniai skirtumai buvo: pastovi santykinė sėklos koncentracija, 2 %, visi tyrimai atlikti 15 h laikotarpyje esant 60 °C temperatūrai.

#### **2.2.1. Duomenų analizė**

- Rotor-Gene Q programinė įranga (Agilent Technologies) preliminariai rezultatų analizei;
- Excel (Microsoft) duomenų apdorojimui;
- Origin 8.0 (OriginLab) duomenų atvaizdavimui, paveikslėlių kūrimui.

### 3. Rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Priono baltymo sėklos auginimas



**3 pav.** *Priono baltymo amiloidinių fibrilių auginimas*

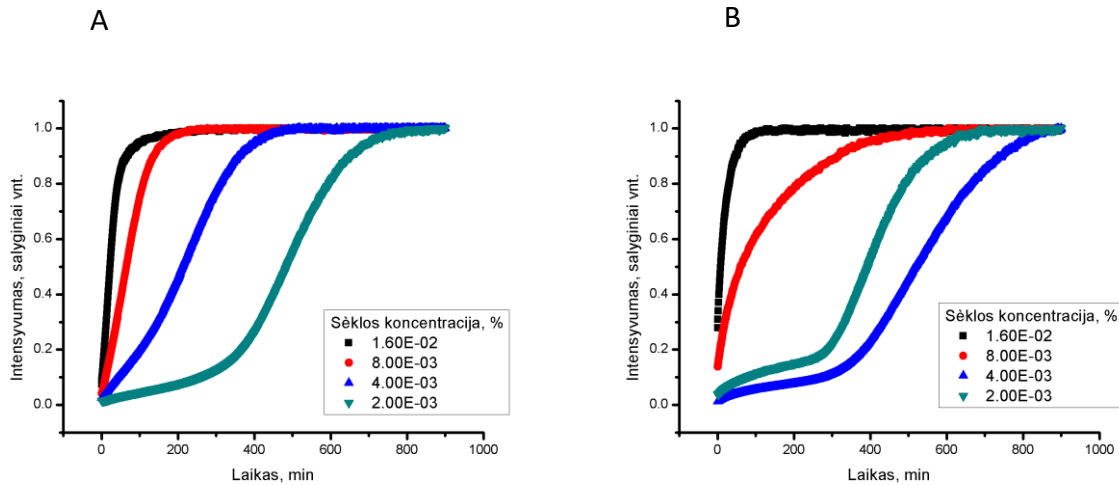
Siekiant išvengti ilgos uždelsimo fazės ir padaryti tyrimo eigą efektyvesne, nuspręsta užauginti amiloidogeninę sėklą iš pilno ilgio pelės priono baltymo. Šio proceso metodika aprašyta metodinėje skiltyje. Rezultatai (pav. 3) parodo, kad jau po savaitės inkubacijos periodo yra matomas nusistovėjimas intensyvumo amplitudėje. Tai reiškia, kad yra pasiekta pusiausvyrinė būseną (pav. 1), kada oligomerų susidarymo ir skilimo greičiai yra lygūs. Įdomu tai, kad beveik visi skirtingomis sąlygomis paruošti mėginiai po 7 dienų išsidėstė daugmaž tame pačiame fluorescencijos intensyvumo lygmenyje, nepaisant daug greitesnio agregavimo jau antrą dieną. (pav. 3). Itin išsiskiria 0,5 M ir 2 M guanidino hidroklorido turėję purtyti mėginiai, lyginant juos su atitinkamos denatūrantų koncentracijos suktais mėginiais, kurių elongacijos

procesas išsryškėja vėliau, po 3 – 4 dienų. Tai leidžia manyti, kad skirtingais būdais ir sąlygomis susiformavusios amiloidinės fibrilės pasižymi skirtinga kinetika, tačiau ne afiniškumu, kadangi 6 – 7 dienos metu po reakcijos pradžios pusiausvyra yra pasiekta daugmaž tame pačiame taške. Galima daryti prielaidą, kad svarbi yra ne denatūrantų koncentracija, išvyniojanti monomerines baltymo formas, bet pačios sėklos konformacija ir prigimtis, kadangi greita (po 2 dienų) agregacija stebėta tiek esant vidutinei, tiek žemai denatūrantų koncentracijoms. Aukštos, 4 M, denatūrantų koncentracijos purtytas mėginys buvo panašesnis savo agregacijos greičiu į suktų mėginių, nes tokia guanidino hidroklorido koncentracija galimai destabilizuoja baltymų tarpusavio sąveikos domenus.

Esantis ~20 % fluorescencijos intensyvumo verčių skirtumas bei pačių kreivių tolygumo nebuvimas toleruotinas dėl stochastinių procesų įtakos, tokių kaip skirtingas fibrilių kiekis paimtas fluorescencijos mėginiui, fibrilių nusėdimas nat mėgintuvėlio sienelių inkubacijos ar fluorescencijos matavimo metu. Taip pat verta pastebėti, atrodytų, nesustojamą 0.5 M purtytos sėklos skatinamą fibrilizaciją, tačiau tai gali būti sąlygota tų pačių stochastinių procesų – vienas didelis amiloidinių fibrilių kompleksas gali stipriai pakelti bendrą mėginio fluorescencijos intensyvumą.

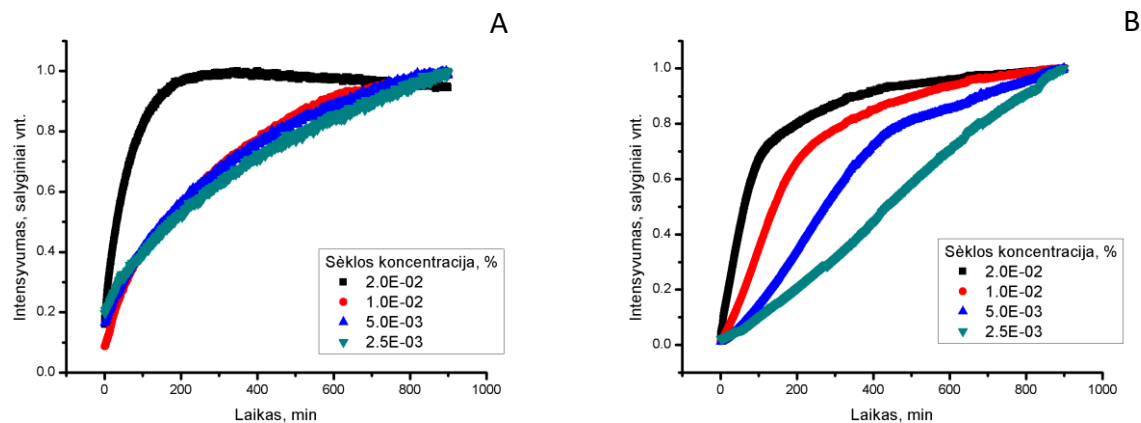
Po 7 dienų inkubacijos periodo kai kurių mėginių mėgintuvėlių dugnuose galima buvo vizualiai pastebėti balkšvas amorfinės nuosėdas, kurios intensyviai papurtytos ištirpdavo, o nestipriai centrifuguotos nenusėdavo. Dėl šios priežasties ir dėl fluorescencinio intensyvumo nusistovėjimo, nuspręsta, kad buvo sėkmingai susintetintos pelės priono baltymo amiloidinės fibrilės.

### 3.2. Amiloidogeninių sėklų indukuota baltymų agregacija



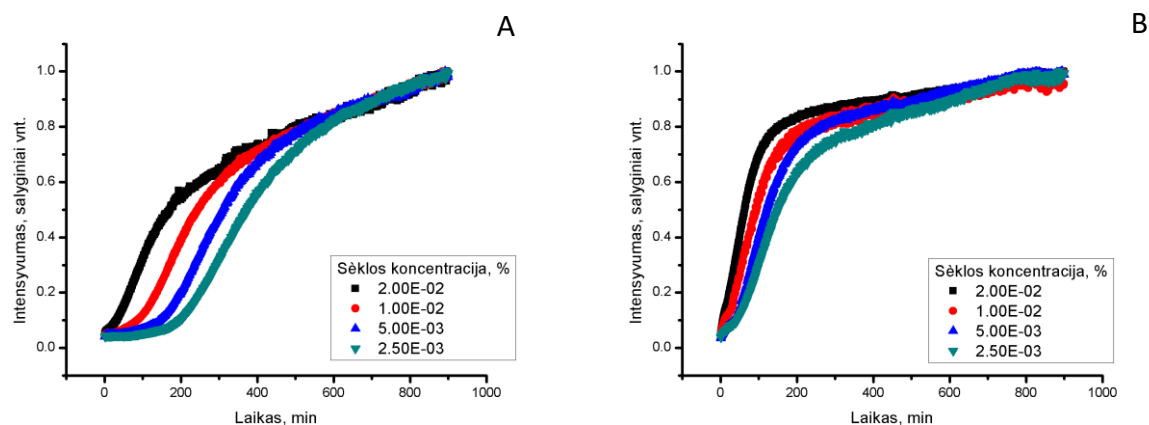
**Pav. 4** 2 M GuHCl sėklų kamienu palyginamosios kinetinės kreivės. A – 2 M GuHCl Sukta sėkla, B – 2 M GuHCl Purtyta sėkla.

Norint iširti ar skirtingos pirminės nukleacijos sąlygos sąlygoja skirtingų sėklų kamienu atsiradimą, buvo išmatuoti ir palyginti skirtingas sėklos koncentracijas turintys mėginiai (Pav. 4). Pasirodo, kad mažinant pradinę sėklos koncentraciją mėginyje, išryškėja antrinės nukleacijos reiškinys, kada esantys branduoliai yra reakcijos pradžioje linkę ne ilgėti, o skilti, sudarydami daugiau branduolių, ir, pasiekę kritinę masę pradeda elongacijos procesą. Tokiu būdu išsiskiria dviejų skirtingų savybių sėklos (Pav. 4 C), šiomis sąlygomis pasižymintios itin skirtinga kinetika. Panašu, kad purtyta sėkla pasižymi trumpesnėmis fibrilėmis, kadangi esant mažesnei sėklos koncentracijai ji sugeba pradėti elongacijos reakciją greičiau už suktą sėklą. Tai atrodytų logiška iš globalios perspektyvos, kadangi intensyvus purtymas turėtų sukurti daugiau „aštresnių“ galų pasižymintias struktūras, nei lėtas sukimas inkubacijos metu. Tačiau, norint patvirtinti šią hipotezę, reikėtų atlikti atominės jėgos mikroskopijos tyrimus fibrilių vizualizavimui.



**Pav. 5** 4 M GuHCl sėklų kamienu palyginamosios kinetinės kreivės. A – 4 M GuHCl Sukta sėkla, B – 4 M GuHCl Purtyta sėkla.

Analogiškai ištyrus 4 M GuHCl sėklas tokių ryškių kinetinių skirtumų nepastebėta (5 pav.) Tikėtina, kad tokiomis sąlygomis susiformavusios amiloidinės fibrilės yra itin atsparios denatūrantų sukeltai degradacijai. (Sneideris et al., 2015) Visai įmanoma, kad šį atsparumą sąlygoja unikalus struktūrinis elementas, kuris privalo susidaryti tiek purtymo, tiek sukimo inkubacijų metu.



**Pav. 6** 0,5 M GuHCl sėklų kamienu palyginamosios kinetinės kreivės. A – 0,5 M GuHCl Sukta sėkla, B – 0,5 M GuHCl Purtyta sėkla.

Ištyrus 0,5 M GuHCl suformuotas sėklas taip pat pastebėtas tas pats elementas, kaip ir analizuojant 2 M GuHCl sėklas – purtyta sėkla greičiau ir efektyviau pradeda elongacijos etapą ir tai geriau pastebima esant mažoms pradinėms sėklos koncentracijoms (Pav. 6).

Taip pat buvo atlikti kontroliniai tyrimai, siekiant išsiaiškinti, ar denatūrantų koncentracija neturi visapusiškos įtakos reakcijos eigai. Atlikti tyrimai su 0,5 M (Priedas, pav. 1 B,D) ir 2 M (duomenys neparodyti) GuHCl formuotomis sėklomis, atliekant amiloidinės fibrilizacijos reakcijas skirtingose denatūrantų koncentracijose, parodė, kad kiekviena sėkla atlieka reakciją efektyviausiai (stebima intensyviausia tioflavino T fluorescencija → yra daugiau fibrilių) esant artimoms reikšmėms į jų pradines sąlygas.

### **3.3. Homologinių baltymų agregacijos indukcija MoPrP sėkla**

Norint ištirti kelių pelės priono baltymo sėklos kamienų gebėjimą įveikti tarprūšinį barjerą, buvo pasirinktas sąrašas įvairių gyvūnų priono baltymo homologų su varijuojančiais ilgiais bei specifinėmis mutacijomis. Siekiant tyrimą atlikti efektyviai, buvo pasirinkti du heterogeniški pelės priono baltymo sėklos kamienai – 0,5 M purtytos ir 2 M purtytos sėklos. Pasirinkta tyrimus atlikti tik su viena sėklos koncentracija, 0,02 sėklos ir baltymo santykiu, kuri efektyviausiai sąlygoja elongacijos procesą bendru pelės priono baltymo atveju.

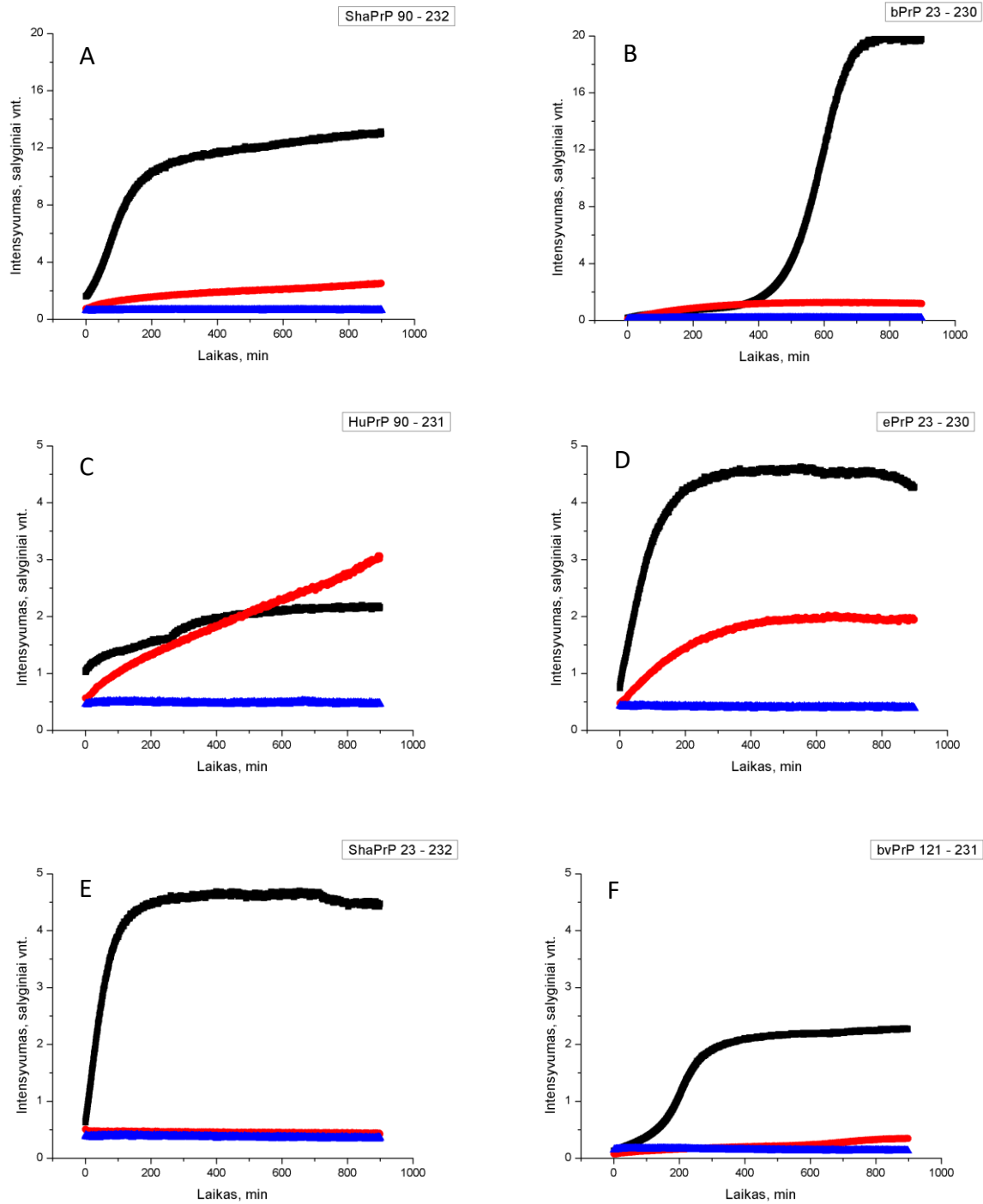
Atlikus tyrimus pastebėta, kad egzistuoja ryškus heterogeniškumas tarp pasirinktų sėklų gebėjimo paspartinti fibrilių formavimąsi baltymų homologams. Kadangi tioflavino T fluorescencijos intensyvumas dalinai aprašo baltymų fibrilių kiekį mėginyje, pasirinkta sudaryti dvi rezultatų grupes: sėkmingą tarprūšinio barjero įveikimą, kai maksimalus pasiektas fluorescencijos intensyvumas buvo didesnis nei 2 (pav. 7) ir kitą grupę, mažesnio maksimalaus intensyvumo nei 2, kur amiloidogeninėms sėkloms nepavyko perkopti šio barjero (Priedas, pav. 2). Reguliariai matuojamos tokios sėklos koncentracijos sąlygotos pelės priono baltymo agregacijos maksimalus fluorescencijos intensyvumas būna didesnis nei 80.

Iš visų tirtų baltymų, sėkmingiausiai tarprūšinį barjerą įveikė ShaPrP (Sirijos žiurkėno) (90 – 231 amino rūgštys) ir bPrP (jaučio) pilno ilgio baltymams.

Bendru atveju galima pastebėti, kad iš tirtų baltymų, 0,5 M guanidino chlorido purtyta sėkla įveikė 6 tarprūšinius barjerus, tuo tarpu 2 M purtytas kamienas – tik 2 (Pav. 7). Tai leidžia teigti, kad šie kamienai fundamentaliai skiriasi savo gebėjimu ne tik prisijungti į save identiškus baltymus, bet ir jų homologus. Negana to, 0,5 M purtytas kamienas buvo efektyvesnis, sujungdamas daugiau baltymo monomerų į fibriles ir sąlygodamas didesnę fluorescencijos intensyvumą. Vėlgi, tai gali

būti nulemta per didelio baltymų išsyviniojimo esant aukštomis denatūrantų koncentracijoms, kas gali nulemti baltymų sąveikos tretinės struktūros suardymą.





**Pav. 7** Pelės priono sėklų 0.5 M GuHCl purtyta (**juoda**) ir 2 M GuHCl purtyta (**raudona**) paveiktų tarprūšinių homologų kinetinės kreivės. **Mėlyna** – kontrolė be pridėtinės sėklos. A, B – Intensyvumo sąlyginiai vienetai ordinačių ašyje nuo 0 iki 20, C, D, E, F – nuo 0 iki 5.

## 4. IŠVADOS

1. Sėkmingai paruoštos dviejų kamienų pilno ilgio rekombinantinio pelės priono baltymo sėklos;
2. Amiloidinių fibrilių antrinės nukleacijos procesas išryškėja mažėjant pradinei sėklos koncentracijai ir yra apspręstas sėklos prigimties;
3. Pilno ilgio rekombinantinio pelės priono baltymo prioniniai kamienai pasižymi skirtingais tarprūšinio barjero įveikimo gebėjimais.

## 5. Literatūros sąrašas

- Altmeppen HC, Puig B, Dohler F, Thurm DK, Falker C, Krasemann S, Glatzel M. Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *American Journal of Neurodegenerative Disease*. 2012; 1(1): 15-31.
- Benetti F, Geschwind MD, Legname G. De novo prions. *F1000 biology reports*. 2010; 2.
- Bhamra SK (2014). Systematic mutagenesis of the mouse prion protein to identify critical regions for the efficient propagation of prions, UCL (University College London).
- Bolshette N, Thakur K, Bidkar A, Trandafir C, Kumar P, Gogoi R. Protein folding and misfolding in the neurodegenerative disorders: a review. *Revue neurologique*. 2014; 170(3): 151-61.
- Bonetto V, Massignan T, Chiesa R, Morbin M, Mazzoleni G, Diomede L, Angeretti N, Colombo L, Forloni G, Tagliavini F. Synthetic miniprion PrP106. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(35): 31327-34.
- Brown P, Cathala F, Sadowsky D, Gajdusek DC. Creutzfeldt-Jakob disease in France: II. Clinical characteristics of 124 consecutive verified cases during the decade 1968–1977. *Annals of Neurology*. 1979; 6(5): 430-37.
- Bubeck D. The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex. *Biochemistry*. 2014; 53(12): 1908-15.
- Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saá P, Morales R, De Castro J, Soto C. Crossing the Species Barrier by PrPSc Replication In Vitro Generates Unique Infectious Prions. *Cell*. 2008; 134(5): 757-68.
- Chatterjee B, Lee C-Y, Lin C, Chen EH-L, Huang C-L, Yang C-C, Chen RP-Y. Amyloid core formed of full-length recombinant mouse prion protein involves sequence 127–143 but not sequence 107–126. *PloS one*. 2013; 8(7): e67967.
- Chen J, Thirumalai D. Helices 2 and 3 are the initiation sites in the PrPC→ PrPSC transition. *Biochemistry*. 2013; 52(2): 310.
- Cobb NJ, Apostol MI, Chen S, Smirnovas V, Surewicz WK. Conformational stability of mammalian prion protein amyloid fibrils is dictated by a packing polymorphism within the core region. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(5): 2643-50.
- Colby DW, Giles K, Legname G, Wille H, Baskakov IV, DeArmond SJ, Prusiner SB. Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(48): 20417-22.
- Collinge J, Brown J, Hardy J, Mullan M, Rossor M, Baker H, Crow T, Lofthouse R, Poulter M, Ridley R. Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion: 2. Clinical and pathological features. *Brain*. 1992; 115(3): 687-710.
- Di Natale G, Pappalardo G, Milardi D, Sciacca MF, Attanasio F, La Mendola D, Rizzarelli E. Membrane interactions and conformational preferences of human and avian prion N-terminal tandem repeats: the role of copper (II) ions, pH, and membrane mimicking environments. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010; 114(43): 13830-38.
- Dillin A, Cohen E. Ageing and protein aggregation-mediated disorders: from invertebrates to mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2011; 366(1561): 94-98.
- Dron M, Moudjou M, Chapuis J, Salamat MKF, Bernard J, Cronier S, Langevin C, Laude H. Endogenous Proteolytic Cleavage of Disease-associated Prion Protein to Produce C2 Fragments

Is Strongly Cell- and Tissue-dependent. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(14): 10252-64.

Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*. 2012; 148(6): 1188-203.

Flechsigg E, Hegyi I, Leimeroth R, Zuniga A, Rossi D, Cozzio A, Schwarz P, Rüllicke T, Götz J, Aguzzi A. Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *The EMBO journal*. 2003; 22(12): 3095-101.

Fleisch VC, Leighton PL, Wang H, Pillay LM, Ritzel RG, Bhinder G, Roy B, Tierney KB, Ali DW, Waskiewicz AJ. Targeted mutation of the gene encoding prion protein in zebrafish reveals a conserved role in neuron excitability. *Neurobiology of disease*. 2013; 55: 11-25.

Giachin G, Biljan I, Ilc G, Plavec J, Legname G. Probing early misfolding events in prion protein mutants by NMR spectroscopy. *Molecules*. 2013; 18(8): 9451-76.

Gillam J, MacPhee C. Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2013; 25(37): 373101.

Goldschmidt L, Teng PK, Riek R, Eisenberg D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(8): 3487-92.

Haigh CL, Collins SJ. Endoproteolytic cleavage as a molecular switch regulating and diversifying prion protein function. *Neural Regeneration Research*. 2016; 11(2): 238-39.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992; 256(5054): 184-5.

Imamura M, Kato N, Okada H, Iwamaru Y, Shimizu Y, Mohri S, Yokoyama T. Strain-specific effects of reducing agents on the cell-free conversion of recombinant prion protein into a protease-resistant form. *Microbiol Immunol*. 2011; 55(9): 633-40.

Kim SG, Lee HM, Ryou C. Parameters that affect macromolecular self-assembly of prion protein. *Protein J*. 2014; 33(3): 243-52.

Klug GM, Wand H, Simpson M, Boyd A, Law M, Masters CL, Matej R, Howley R, Farrell M, Breithaupt M, Zerr I, van Duijn C, Ibrahim-Verbaas C, Mackenzie J, Will RG, Brandel JP, Alperovitch A, Budka H, Kovacs GG, Jansen GH, Coulthard M, Collins SJ. Intensity of human prion disease surveillance predicts observed disease incidence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84(12): 1372-7.

Kuczius T, Koch R, Keyvani K, Karch H, Grassi J, Groschup MH. Regional and phenotype heterogeneity of cellular prion proteins in the human brain. *European Journal of Neuroscience*. 2007; 25(9): 2649-55.

Kumar EK, Haque N, Prabhu NP. Kinetics of protein fibril formation: Methods and mechanisms. *Int J Biol Macromol*. 2017; 100: 3-10.

Lang C, Heckmann J, Neundörfer B. Creutzfeldt–Jakob disease via dural and corneal transplants. *Journal of the neurological sciences*. 1998; 160(2): 128-39.

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Synthetic mammalian prions. *Science*. 2004; 305(5684): 673-6.

Lewis V, Johanssen VA, Crouch PJ, Klug GM, Hooper NM, Collins SJ. Prion protein “gamma-cleavage”: characterizing a novel endoproteolytic processing event. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016; 73(3): 667-83.

Liang J, Kong Q.  $\alpha$ -Cleavage of cellular prion protein. *Prion*. 2012; 6(5): 453-60.

Mahal SP, Baker CA, Demczyk CA, Smith EW, Julius C, Weissmann C. Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(52): 20908-13.

Majumdar A, Cesario WC, White-Grindley E, Jiang H, Ren F, Li L, Choi EM-L, Kannan K, Guo F, Unruh J. Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory. *Cell*. 2012; 148(3): 515-29.

Mangé A, Béranger F, Peoc'h K, Onodera T, Frobert Y, Lehmann S. Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biology of the Cell*. 2004; 96(2): 125-32.

McDonald AJ, Dibble JP, Evans EG, Millhauser GL. A new paradigm for enzymatic control of  $\alpha$ -cleavage and  $\beta$ -cleavage of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(2): 803-13.

Meisl G, Yang X, Hellstrand E, Frohm B, Kirkegaard JB, Cohen SI, Dobson CM, Linse S, Knowles TP. Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(26): 9384-9.

Milto K, Botyriute A, Smirnovas V. Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics. *PloS one*. 2013; 8(7): e68684.

Milto K, Michailova K, Smirnovas V. Elongation of mouse prion protein amyloid-like fibrils: effect of temperature and denaturant concentration. *PloS one*. 2014; 9(4): e94469.

Moda F, Le T-NT, Aulić S, Bistaffa E, Campagnani I, Virgilio T, Indaco A, Palamara L, Andréoletti O, Tagliavini F. Synthetic prions with novel strain-specified properties. *PLoS Pathog*. 2015; 11(12): e1005354.

Morales R, Abid K, Soto C. The prion strain phenomenon: Molecular basis and unprecedented features. *Biochimica et biophysica acta*. 2007; 1772(6): 681-91.

Ning L, Guo J, Jin N, Liu H, Yao X. The role of Cys179–Cys214 disulfide bond in the stability and folding of prion protein: insights from molecular dynamics simulations. *Journal of molecular modeling*. 2014; 20(2): 2106.

Prusiner SB. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annual review of genetics*. 2013; 47: 601-23.

Prusiner SB. Cell biology. A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science*. 2012; 336(6088): 1511-3.

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982; 216(4542): 136-44.

Puig B, Altmeyden H, Glatzel M. The GPI-anchoring of PrP: Implications in sorting and pathogenesis. *Prion*. 2014; 8(1): 11-18.

Qi X, Moore RA, McGuirl MA. Dissociation of recombinant prion protein fibrils into short protofilaments: implications for the endocytic pathway and involvement of the N-terminal domain. *Biochemistry*. 2012; 51(22): 4600.

Raymond GJ, Race B, Hollister JR, Offerdahl DK, Moore RA, Kodali R, Raymond LD, Hughson AG, Rosenke R, Long D, Dorward DW, Baron GS. Isolation of novel synthetic prion strains by amplification in transgenic mice coexpressing wild-type and anchorless prion proteins. *J Virol*. 2012; 86(21): 11763-78.

Sajani G, Silva CJ, Ramos A, Pastrana MA, Onisko BC, Erickson ML, Antaki EM, Dynin I, Vázquez-Fernández E, Sigurdson CJ, Carter JM, Requena JR. PK-sensitive PrP<sup>Sc</sup> Is Infectious and Shares Basic Structural Features with PK-resistant PrP<sup>Sc</sup>. *PLOS Pathogens*. 2012; 8(3): e1002547.

Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, Clarke AR, Collinge J. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature*. 2011; 470(7335): 540-42.

Serpa JJ, Patterson AP, Pan J, Han J, Wishart DS, Petrotchenko EV, Borchers CH. Using multiple structural proteomics approaches for the characterization of prion proteins. *Journal of proteomics*. 2013; 81: 31-42.

Singh J, Kumar H, Sabareesan AT, Udgaonkar JB. Rational Stabilization of Helix 2 of the Prion Protein Prevents Its Misfolding and Oligomerization. *Journal of the American Chemical Society*. 2014; 136(48): 16704-07.

Singh J, Udgaonkar JB. Molecular Mechanism of the Misfolding and Oligomerization of the Prion Protein: Current Understanding and Its Implications. *Biochemistry*. 2015; 54(29): 4431-42.

Singh RK, Chamachi NG, Chakrabarty S, Mukherjee A. Mechanism of Unfolding of Human Prion Protein. *J Phys Chem B*. 2017; 121(3): 550-64.

Sneideris T, Milto K, Smirnovas V. Polymorphism of amyloid-like fibrils can be defined by the concentration of seeds. *PeerJ*. 2015; 3: e1207.

Soto C. Transmissible Proteins: Expanding the Prion Heresy. *Cell*. 2012; 149(5): 968-77.

Soto C, Estrada L, Castilla J. Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem Sci*. 2006; 31(3): 150-5.

Supattapone S, Muramoto T, Legname G, Mehlhorn I, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott MR. Identification of two prion protein regions that modify scrapie incubation time. *Journal of Virology*. 2001; 75(3): 1408-13.

Telling GC. Transgenic mouse models and prion strains. *Top Curr Chem*. 2011; 305: 79-99.

Thompson AG, Lowe J, Fox Z, Lukic A, Porter M-C, Ford L, Gorham M, Gopalakrishnan GS, Rudge P, Walker AS. The Medical Research Council Prion Disease Rating Scale: a new outcome measure for prion disease therapeutic trials developed and validated using systematic observational studies. *Brain*. 2013; 136(4): 1116-27.

Timmes AG, Moore RA, Fischer ER, Priola SA. Recombinant Prion Protein Refolded with Lipid and RNA Has the Biochemical Hallmarks of a Prion but Lacks In Vivo Infectivity. *PLoS ONE*. 2013; 8(7): e71081.

Tycko R, Wickner RB. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus vs. controversy. *Accounts of chemical research*. 2013; 46(7): 1487.

van Rheede T, Smolenaars MM, Madsen O, de Jong WW. Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Molecular biology and evolution*. 2003; 20(1): 111-21.

Watt NT, Taylor DR, Gillott A, Thomas DA, Perera WS, Hooper NM. Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem*. 2005; 280(43): 35914-21.

Weissmann C, Flechsig E. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *British medical bulletin*. 2003; 66(1): 43-60.

Yamaguchi K-i, Kamatari YO, Fukuoka M, Miyaji R, Kuwata K. Nearly Reversible Conformational Change of Amyloid Fibrils as Revealed by pH-Jump Experiments. *Biochemistry*. 2013; 52(39): 6797-806.

Younan ND, Sarell CJ, Davies P, Brown DR, Viles JH. The cellular prion protein traps Alzheimer's A $\beta$  in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers. *Faseb j*. 2013; 27(5): 1847-58.

## SUMMARY

Kuliešius J (2017). Pelės priono baltymo prioninių savybių tyrimas, VU (Vilniaus Universitetas).

Mano baigiamojo darbo tikslas yra pagerinti prionų baltymų agregacijos kinetikos supratimą, tokiu būdu sukuriant naujus būdus ieškoti su prionais susijusių ligų gydymo metodų ateityje. Šiame tyrime tirtas pilno ilgio pelės priono baltymas, kuris yra pagrindinis veiksnys ar dalyvauja dešimtyse neurodegeneracinių ligų ir yra žmogaus priono baltymo homologas. Darbe pristatyta detali naujausių prionų tyrimų apžvalga. Rezultatų skiltyje parodytas unikalus būdas pakeisti priono baltymo amiloidogeninės reakcijos kinetiką, pakeičiant maišymo būdą sėklos paruošimo metu. Taip pat parodyta, kad skirtingi amiloidinių fibrilių kamienai gali būti sukurti iš vienos baltymo struktūros, tai parodant skirtingomis baltyminio infektyvumo galimybėmis struktūriškai skirtingiems priono baltymo homologams. Šiame darbe pristatyti tyrimai gali būti pagrindu efektyviai ieškant cheminių veiksnių, slopinančių amiloidinių fibrilių augimą.

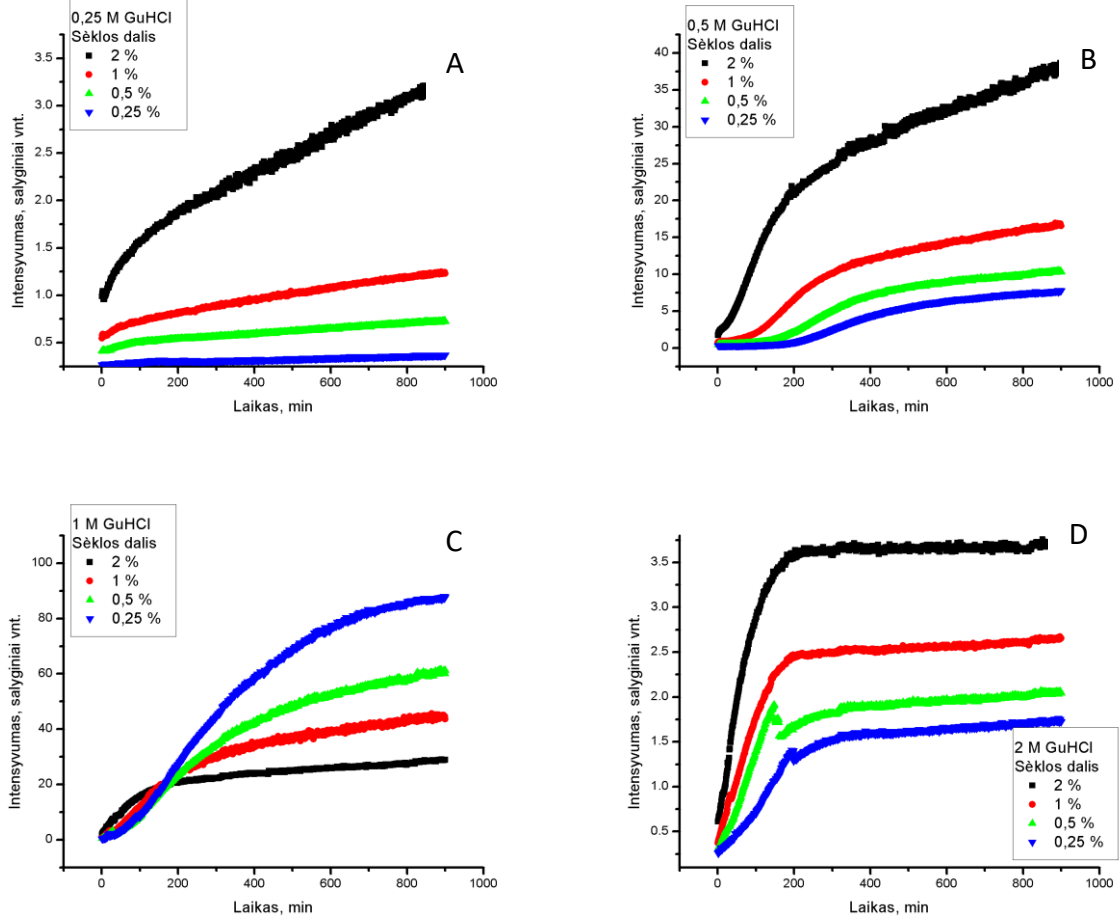
## SUMMARY

Kuliešius J (2017). A study of prionic properties of the mouse prion protein, VU (Vilnius University).

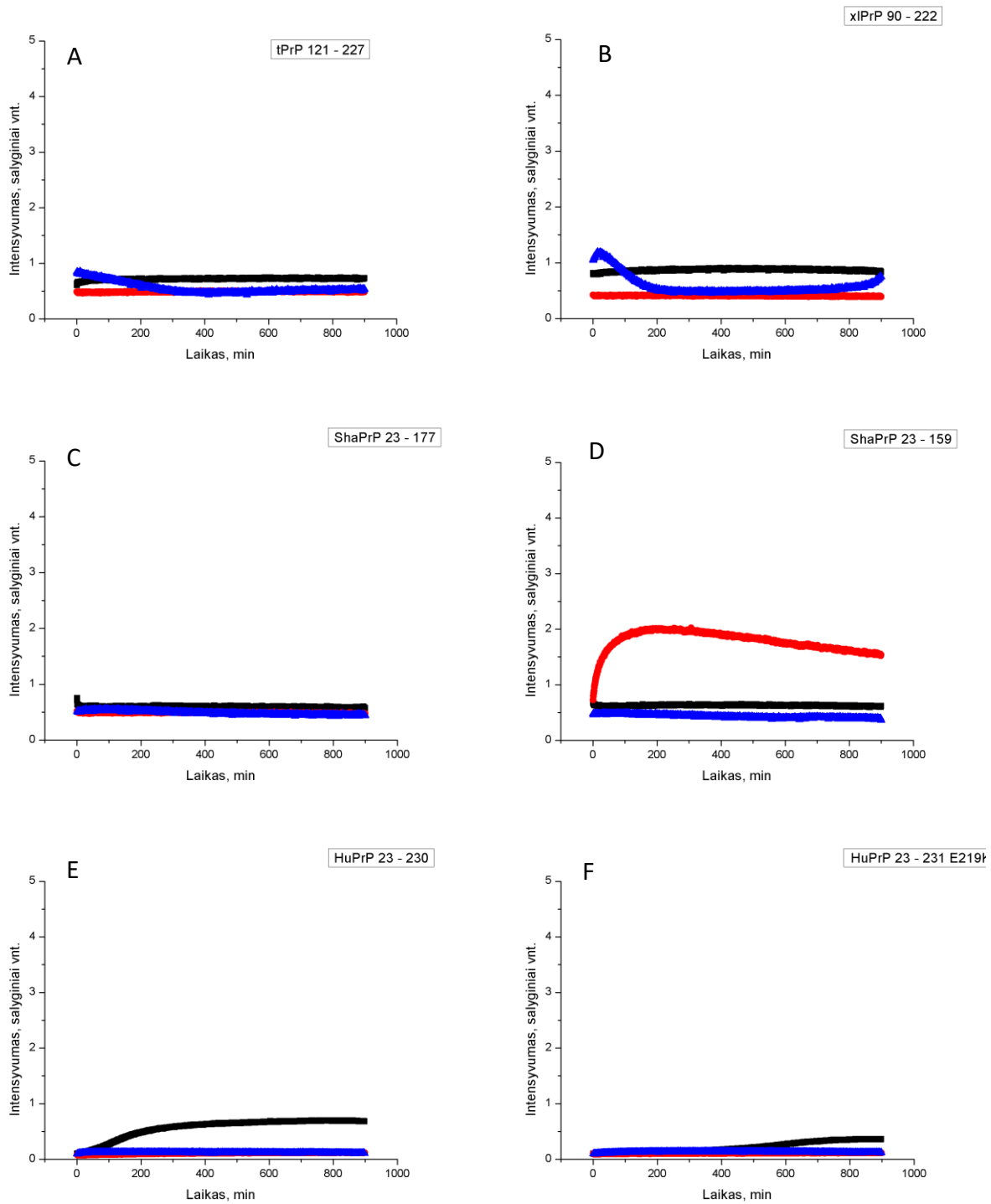
The purpose of my thesis is enhance the understanding of the kinetics of prion protein aggregation for potential possibilities to find a treatment to prion diseases in the future. The work is focused on the full length Mouse Prion Protein, which is known to participate in multiple neurodegenerative disorders and is a direct relative to the Human Prion Protein. A thorough review of the current state of research on the prion protein is presented. In the results section, an unique way of altering the kinetic properties of the amyloidogenic reaction is shown, by inducing a different kind of rotation during the preparation of seeds. Furthermore, multiple strains of amyloidogenic fibrils have been created from a single protein structure, proven by cross-seeding studies to structurally different prion proteins. This research paves the way for an efficient process of developing chemical agents that would inhibit the growth of amyloid fibrils.



PRIEDAS



**Pav. 1** 0.5 M GuHCl Suktos sėklos kinetiniai duomenys, keičiant aplinkos denatūrantu GuHCl koncentraciją. GuHCl koncentracija nurodyta legendose.



**Pav. 2** Pelės priono sėklų 0.5 M GuHCl purtyta (juoda) ir 2 M GuHCl purtyta (raudona) paveiktų tarprūšinių homologų kinetinės kreivės. *Mėlyna* – kontrolė be pridėtinės sėklos.