



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro studijų programos II kurso studentė

Dovilė DAUNORAITĖ

Magistro baigiamasis darbas

**Hsp90, kaip antiparazitinių slopiklių taikinio, termodinaminiai ir
kristalografiniai tyrimai**

Darbo vadovas:

dr. Egidijus Kazlauskas

Mokslinės konsultantės:

dokt. Donata Tuminauskaitė

Aurelija Mickevičiūtė

Vilnius 2020

**Hsp90, kaip antiparazitinių slopiklių taikinio, termodinaminiai ir
kristalografiniai tyrimai**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Darbą atliko:

Dovilė Daunoraitė

Darbo vadovas:

dr. Egidijus Kazlauskas

Darbo mokslinės konsultantės:

dokt. Donata Tuminauskaitė

Aurelija Mickevičiūtė

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1 Parazitinės ligos	9
1.1.1 Parazitinių ligų aktualumas	9
1.1.2 Parazitų apžvalga.....	12
1.2 Molekuliniai šaperonai	19
1.2.1 Molekulinių šaperonų apžvalga.....	19
1.2.2 Hsp90.....	22
1.2.3 Hsp90 kaip antiparazitinių vaistų taikinyš	26
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	29
2.1 Prietaisai, priemonės, medžiagos ir tirpalai	29
2.1.1 Prietaisai	29
2.1.2 Medžiagos, priemonės ir rinkiniai	30
2.1.3 Terpės ir tirpalai.....	30
2.1.4 Bakterijų kamienai, vektorius ir pradmenys.....	33
2.2 Metodai	33
2.2.1 Genetinio konstrukto, koduojančio <i>TcHsp90N</i> , kūrimas	33
2.2.2 Genetinio konstrukto, koduojančio <i>TcHsp90N</i> , modifikacija	34
2.2.3 DNR elektroforezė.....	35
2.2.4 DNR skyrimas	35
2.2.5 Restrikcijos reakcija	35
2.2.6 Ligavimo reakcija	36
2.2.7 Ląstelių transformacija ir auginimas	36
2.2.8 Biomasės auginimas ir <i>TcHsp90N</i> raiška.....	36
2.2.9 Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje	37
2.2.10 <i>TcHsp90N</i> tirpumo tikrinimas ir gryninimas	37
2.2.11 Fluorescencinis terminio poslinkio tyrimas.....	38

2.2.12	Baltymų paruošimas kristalinimui.....	39
2.2.13	Baltymų kristalinimas.....	40
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	41
3.1	Genetinio konstrukto, koduojančio <i>TcHsp90N</i> , kūrimas.....	41
3.2	Rekombinantinio <i>TcHsp90N</i> gavimas.....	43
3.3	Rekombinantinio <i>TcHsp90N</i> jungimosi su slopikliais tyrimas.....	45
3.4	Parazitinių organizmų ir žmogaus <i>Hsp90N</i> kristalinimas.....	47
3.4.1	<i>LmHsp90N</i> kristalinimas.....	48
3.4.2	<i>LdHsp90N</i> kristalinimas.....	49
3.4.3	<i>PfHsp90N</i> kristalinimas.....	50
3.4.4	<i>TgHsp90N</i> kristalinimas.....	51
3.4.5	<i>TbHsp90N</i> kristalinimas.....	51
3.4.6	<i>TsHsp90N</i> kristalinimas.....	52
3.4.7	<i>Hsp90αN</i> kristalinimas.....	53
3.5	Rezultatų aptarimas.....	56
	IŠVADOS.....	61
	REZULTATŲ SKLAIDA.....	62
	FINANSINĖ PARAMA.....	63
	PADĖKA.....	64
	SANTRAUKA.....	65
	SUMMARY.....	66
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	67

SANTRUMPOS

- AA/BAA** – Akrilamidas / bis-akrilamidas;
- Amp** – ampicilinas;
- ANS** – 8-anilinonaftalen-1-sulfoninė rūgštis;
- APS** – amonio persulfatas;
- aps.** – apsisukimai;
- BHI** – angl. Brain Heart Infusion;
- DMSO** – dimetilsulfoksidas;
- dNTP** – deoksiribonukleotidas;
- DTT** – ditioneitolis;
- EDTA** – etilendiamintetraacto rūgštis;
- FTSA** – fluorescencinis terminio poslinkio metodas;
- GHLK** – girazių, Hsp90, histidino kinazių, MutL šeima;
- GRP94** – 94 kDa nuo gliukozės priklausomas baltymas (angl. 94 kDa glucose-regulated protein);
- HEPES** – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis;
- Hsp** – šiluminio šoko baltymas (angl. Heat shock protein);
- Hsp90C** – Hsp90 ortologas chloroplastuose;
- Hsp90 α** – žmogaus Hsp90 α izoforma;
- HtpG** – aukštos temperatūros baltymas G (angl. high temperature protein G);
- IDA** – iminodiacto rūgštis;
- IEXC** – jonų mainų chromatografija;
- IMAC** – imobilizuotų metalų jonų afininė chromatografija;
- IPITG** – izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozidas;
- K_b** – jungimosi konstanta;
- LB** – angl. Lysogeny Broth;
- LdHsp90** – *Leishmania donovani* Hsp90;
- LmHsp90** – *Leishmania major* Hsp90;
- NDS** – natrio dodecilsulfatas;
- NGD** – N galo domenai;
- NTD** – apleistos tropinės ligos (angl. neglected tropical diseases);
- PAGE** – poliakrilamidinio gelio elektroforezė;
- PEG** – polietilenglikolis;
- PfHsp90** – *Plasmodium falciparum* Hsp90;

PGR – polimerazēs grandininē reakcija;
PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;
PNK – polinukleotid-5′-hidroksil-kinazē;
PSO – Pasaulio sveikatos organizacija;
SOC – angl. Super Optimal broth with Catabolite repression;
TAE – TRIS bazē, acto rūgštis, EDTA;
TbHsp90 – *Trypanosoma brucei* Hsp90;
TcHsp90 – *Trypanosoma cruzi* Hsp90;
TEMED – tetrametiletilendiaminas;;
TgHsp90 – *Toxoplasma gondii* Hsp90;
T_m – lydymosi temperatūra;
TRAP1– su TNF receptoriumi susijęs baltymas 1 (angl. TNF receptor associated protein 1);
TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;
TsHsp90 – *Trichinella spiralis* Hsp90;

IVADAS

Parazitinės ligos, nepaisant mokslo pažangos ir sparčiai progresuojančios medicinos, vis dar yra didelė problema tiek besivystančiuose regionuose, tiek didelio ekonominio pajėgumo šalyse. Milijonai žmonių kasmet kenčia dėl parazitinių sukeltų sveikatos, socialinių ir ekonominių problemų, didelė dalis užsikrėtusiųjų miršta. Parazitinės ligos yra labiausiai aktualios atogrąžų regionuose, tačiau pastaraisiais dešimtmečiais klimato kaita bei globalizacija lemia spartėjantį jų plitimą į anksčiau nepaveiktas šalis (Sönmez et al., 2019). Parazitinių ligų gydymas dažnu atveju yra komplikuojamas didelio vaistų toksiškumo žmogui bei sparčiai besivystančių parazitinių organizmų atsparumo veikliosioms medžiagoms (Horn and Duraisingh, 2014). Šios problemos sukuria naujų, efektyvesnių ir saugesnių vaistų poreikį.

Vienas iš potencialių antiparazitinės terapijos taikinių yra molekulinis šaperonas Hsp90. Šis baltymas yra atsakingas už tinkamą baltymų-klientų (baltymų, su kuriais šaperonas sąveikauja) tretinės struktūros įgavimą, susirinkimą į daugiabaltyminius kompleksus (Schopf et al., 2017). Daugybė skirtingų, įvairiuose metaboliniuose ir signaliniuose procesuose dalyvaujančių baltymų yra Hsp90 klientai (Picard, 2020), todėl šaperono vaidmuo ląstelės reguliacijoje yra itin ryškus. Akivaizdus šaperono raiškos padidėjimas ląstelėse stebimas esant atsakui į įvairius stresinius veiksnius, tokius kaip temperatūriniai svyravimai, sunkiųjų metalų, laisvųjų radikalų poveikis (Taipale et al., 2010). Gerai dokumentuota Hsp90 svarba parazitinių organizmų vystymuisi ir išgyvenimui šeimininko organizme infekcijos metu (Roy et al., 2012) skatina naujų junginių, slopinančių parazitų Hsp90, vystymą.

Tokie Hsp90 slopiklių tyrimai atliekami ir VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje. Ieškoma cheminių junginių, stipriai bei specifiskai besijungiančių Hsp90 ATP surišančiame N galo domene. Pirmosiose vaistų vystymo stadijose yra svarbu gauti grynus ir stabilus baltymų mėginius, atlikti slopiklių jungimosi termodinaminis matavimus, nustatyti tiriamų baltymų-ligandų kompleksų struktūras. Šio magistrinio darbo metu buvo atliekami šešių parazitinių pirmuonių (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major*), vienos parazitinės kirmėlės (*Trichinella spiralis*) bei žmogaus Hsp90 N galinio domeno termodinaminiai ir kristalografiniai tyrimai, siekiant gauti reikšmingos informacijos, reikalingos kuriant efektyvius Hsp90 slopiklius, galinčius tapti naujų vaistų veikliąja medžiaga.

Darbo tikslas:

Gauti kristalus, reikalingus parazitų ir žmogaus Hsp90 struktūroms su slopikliais nustatyti.

Darbo uždaviniai:

- Surasti optimalias sąlygas *TcHsp90N* raiškai *Escherichia coli* bakterijose ir išgryninti baltymą.
- Nustatyti rekombinantinio *TcHsp90N* baltymo stabilumą ir patikrinti jo sąveiką su parinktais slopikliais ICPD26, ICPD47 ir 17-AAG.
- Atlikti *LmHsp90N*, *LdHsp90N*, *PfHsp90N*, *TgHsp90N*, *TbHsp90N*, *TsHsp90N* ir Hsp90 α N kristalizacijos sąlygų paiešką.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Parazitinės ligos

1.1.1 Parazitinių ligų aktualumas

Parazitinių organizmų sukeltos ligos, arba parazitozės, nepaisant spartaus medicinos progreso, vis dar išlieka didele problema pasaulyje. Nors paprastai siejamos su besivystančiais regionais, kai kurios jų yra aktualios ir didesnio ekonominio pajėgumo šalyse (Fletcher et al., 2012), o dėl tokių veiksnių kaip kelionės, migracija ar klimato kaita, ligos, anksčiau endeminės konkrečiose zonose, išplinta į naujas teritorijas. Parazitiniai susirgimai yra sukelti organizmų, gyvenančių ir besidauginančių šeimininkų organuose. Parazitiniams organizmams priskiriami pirmuonys (vienaląsčiai eukariotiniai organizmai), helmintai (plokščiosios, apvaliosios ir kitos kirmėlės) bei ectoparazitai (daugialąsčiai organizmai, gyvenantys šeimininko išorėje, dažnai vabzdžiai ar voragyviai). Virusinės ir bakterinės infekcijos nėra priskiriamos parazitozėms (CDC, 2019).

Daugelis parazitinių infekcijų yra paplitusios šiltuose ir drėgnuose tropikų, subtropikų ir vidutinių platumų regionuose (Wang, 2017). Ypač didelę šių ligų naštą patiria Užsachario Afrikos šalys, kurioms būdingas ekstremalus skurdas. Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) išskiria atskirą kategoriją infekcijų, dažnai parazitinių, vadinamų apleistomis tropinėmis ligomis (angl. neglected tropical diseases, NTD), paplitusių tropiniuose ir subtropiniuose regionuose ir bendrai charakterizuojamų savo neproporcingu poveikiu neturtingiausioms žmonių populiacijoms. Dėl to, kad labiausiai paveikia skurdžiausius pasaulio regionus, istoriškai buvo dedama mažiau pastangų šių ligų eliminavimui. Be sukeltų mirčių ir akivaizdžios žalos užsikrėtusių sveikatai, apleistos tropinės ligos siejamos su dar didesniu skurdo įsigalėjimu, socialinėmis ir ekonominėmis pasekmėmis. NTD sukeltas fizinis neįgalumas bei augimo ir kognityvinio vystymosi sutrikdymas mažina žmonių galimybes gyventi produktyvų gyvenimą, neigiamai paveikia bendruomenes ir ištisas šalis (Hotez et al., 2016; Mitra and Mawson, 2017). Taip pat parodyta, kad nuo šių ligų kenčiančių žmonių patiriama diskriminacija, socialinė stigmatizacija ir statuso visuomenėje praradimas turi ne tik ekonominių pasekmių, bet ir yra susiję su suprastėjusia gyvenimo kokybe ir pablogėjusia psichine sveikata (Hofstraat and van Brakel, 2016). PSO apleistų tropinių ligų kategorijai priskiria dvidešimt susirgimų, iš kurių trys yra sukelti pirmuonių, du virusų, penki bakterijų, aštuoni helmintų, du gyvūnų įkandimų. Teigiama, kad šios ligos paveikia per milijardą žmonių 149 šalyse ir kasmet lemia šimtus tūkstančių mirčių (Molyneux et al., 2017, PSO, 2020). Dalis parazitinių ligų, nepriskiriamų NTD grupei, plinta ne vien skurdžiose

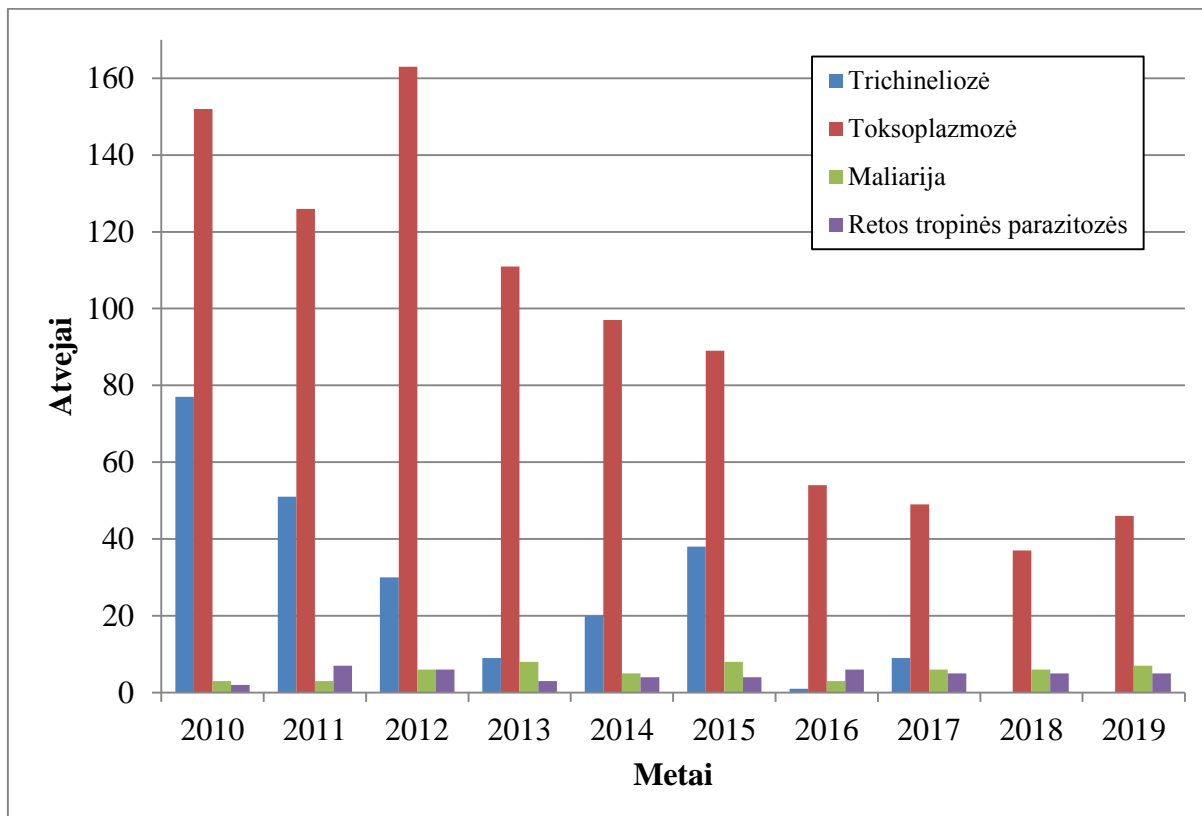
šalyse. Toksoplazmozės atvejai fiksuojami visame pasaulyje, įskaitant aukšto ekonominio pajėgumo šalis (Pappas et al., 2009), o maliarija – daugiausiai gyvybių nusinešanti parazitinė liga – pavojinga bene pusei visos žmonių populiacijos (PSO, 2020).

Pastaraisiais dešimtmečiais imtasi priemonių parazitinių ligų suvaldymui ir eliminavimui – mažėjant skurdui, užtikrinama prieiga prie švaraus geriamojo vandens bei maisto produktų, įmanoma efektyvesnė higiena, skiriama vis daugiau resursų švietimui ir informacijos sklaidai bei ligų prevencijai. Didelę reikšmę ligų plitimo sulėtinimui turi vektorių (vabzdžių, per kurių įkandimus perduodami patogenai) kontrolė, o kai kurių susirgimų sustabdymui padeda prevencinė chemoterapija (Hotez et al., 2007). Dėl šių pastangų, kai kurias ligas pavyko beveik išnaikinti ar labai sumažinti atvejų skaičių. Pavyzdžiui, helminto sukeltos drakunkuliozės pasireiškimų skaičius sumažėjo nuo daugiau nei trijų milijonų 1980-taisiais iki vos penkiasdešimt keturių 2019-taisiais (PSO, 2019). Visgi, vienoms ligoms atsitraukiant, kitos yra eliminuojamos lėčiau ar fiksuojami nauji protrūkiai. Dėl karinių konfliktų ir jų lemiamos sveikatos apsaugos sistemos griūties Afganistane, Sirijoje bei Irake, šiose teritorijose stipriai padidėjo sergamumas tokiomis parazitinėmis ligomis kaip odos leišmaniozė (Hotez, 2015).

Gerėjanti skurdžiausių šalių ekonominė situacija ir jos lemiamas sveikatos apsaugos išvystymas leidžia optimistiškai žvelgti į parazitinių ligų situaciją ateityje. Visgi, net ir sparčiai besivystant mokslui, tikėtina, kad visuomenė ateityje susidurs su naujais iššūkiais. Manoma, kad ateityje didėjant šalių ekonominiam pajėgumui bei vykstant urbanizacijai, daugės žmonių, gyvenančių neturtinguose lūšnynų kvartaluose, o ligos, paprastai laikomos kaimiškų vietovių problema, neišnyks, o paprasčiausiai persikels į miestus, kur dėl artimo kontakto galės plisti dar paprasčiau (Hotez, 2018). Kita problema, su kuria susiduria žmonija, yra klimato kaita. Šio proceso lemiamą kylančią temperatūrą bei besikeičiantys kritulių kiekiai daro įtaką gyvūnų rūšių išplitimui, įskaitant ir parazitus pernešančius vabzdžius-vektorius. Apie šiuos pokyčius signalizuoja maliarijos ir kitų tropinių ligų atvejų didėjimas pietų Europoje (Hotez, 2016), o taip pat ligų, kurios jau būdingos šiam regionui, tokių kaip leišmaniozė, plitimas į šiaurės Europą (Naucke et al., 2008; Ready, 2010). Nors sparti mokslo pažanga, susijusi su modernia diagnostika, naujomis vakcinomis bei vaistais, ateityje turėtų padėti kovoje su sveikatai pavojingais parazitais, procesą apsunkina kylantys nauji iššūkiai.

Lietuvai, kaip ir daugeliui Europos valstybių, dėl vyraujančio klimato bei esamo ekonominio statuso, nėra būdingos sunkios parazitinės infekcijos. Visgi, vektoriaus nebuvimas ir aukštas medicinos lygis šalyje nėra pakankamos sąlygos visiškai užkirsti kelią parazitozių plitimui. Ligas, plintančias per maisto produktus ir vandenį, galima kontroliuoti laikantis tinkamų sanitarinių sąlygų, tačiau nusižengimų pasitaiko, ir kone kasmet fiksuojami

tam tikrų parazitinių susirgimų protrūkiai (pavyzdžiui, trichineliozės iš užkrėstų šernų mėsos). Vėsaus klimato nulemtas įvairių vabzdžių-vektorių nebuvimas taip pat ne iki galo leidžia išvengti atogrąžų regionams būdingų ligų. Dėl pastaraisiais dešimtmečiais palengvėjusios migracijos bei kelionių įvairios, anksčiau konkrečiuose geografiniuose regionuose lokalizuotos ligos, nesunkiai gali išplisti į bene visas pasaulio šalis (Sönmez et al., 2019). Lietuva nėra išimtis iš kitų Europos valstybių, čia kasmet yra fiksuojami įvairių, net ir regionui nebūdingų, parazitinių ligų atvejai (1 pav.).



1 pav. Užfiksuoti kai kurių parazitinių ligų atvejai Lietuvoje. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centro metinių ataskaitų duomenys (ULAC, 2020).

Viena dažniau pasitaikančių parazitozių Lietuvoje – toksoplazmozė, kuria kasmet užsikrečia po keliasdešimt žmonių. Panaši situacija ir su trichinelioze, kurios atvejų pasitaiko nereguliariai, tačiau užsikrėtusiems neretai reikalinga medikų pagalba. Priešingai nei šių dviejų ligų atveju, kai kasmet galima stebėti tam tikrą pasireiškimų mažėjimo tendenciją, įvežtinės infekcijos fiksuojamos reguliariai. Taip pat galima pastebėti, kad labai dažnai šiomis ligomis užsikrėtusiems yra reikalinga rimta pagalba – pavyzdžiui, 2019 m. iš septynių žmonių, užsikrėtusių maliarija, šeši buvo gydomi ligoninėje (ULAC, 2020).

1.1.2 Parazitų apžvalga

Nors parazitinės ligos turi nemažai bendrumų (dažniausiai paveikia labiausiai pažeidžiamas visuomenės grupes, pasižymi gydymo sunkumais), visų jų sukėlėjai yra unikalūs organizmai, kuriems būdingi fiziologijos, paplitimo, infektyvumo skirtumai. Dėl šios priežasties nėra universalių antiparazitinių vaistų, kiekvienas gydymo kursas turi būti pritaikomas konkrečiam sukėlėjui. VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje vykdomuose vaistų paieškos eksperimentuose dirbama su keletu skirtingų parazitinių organizmų baltymais. Tyrimų objektai yra skirtingoms filogenetinėms grupėms priklausantys parazitai: *Kinetoplastea* klasei priskiriami *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei* ir *Trypanosoma cruzi*, *Apicomplexa* tipui priskiriami *Toxoplasma gondii* bei *Plasmodium falciparum* ir *Nematoda* tipo kirmėlė *Trichinella spiralis*. Toliau pateikiama šių organizmų apžvalga.

1.1.2.1 *Leishmania major* ir *Leishmania donovani*

Leishmania – viduląsteliniai obligatiniai parazitiniai pirmuonys, gebantys sukelti leišmaniozę. Infekcija kyla po užsikrėtusios smėlio musės (lot. *Phlebotominae*) įkandimo. Leišmanijos rūšys skiriasi sukeliama ligos forma, yra paplitusios skirtinguose geografiniuose regionuose. *L. donovani* yra antroponotinė rūšis, gebanti sukelti visceralinę ligos formą žmonėms ir daugiausiai paplitusi Pietų Azijoje ir Afrikoje. Kita žmogui pavojinga rūšis – *L. major* – sukelia odos leišmaniozę ir yra labiausiai paplitusi Afrikoje, Vidurinių Rytų regione ir Centrinėje Azijoje (Alemayehu and Alemayehu, 2017). Liga dažnai siejama su skurdu ir iš to kylančia nepakankama mityba, prastu apgyvendinimu, silpna imunine sistema ir finansinių išteklių trūkumu. Kasmet užfiksuojama šimtai tūkstančių susirgimo atvejų ir dešimtys tūkstančių mirčių. Visceralinė ligos forma (dar vadinama kala-azar) yra mirtina 95% atvejų, jei yra negydoma. Pagrindiniai simptomai yra karščiavimo priepuoliai, svorio kritimas, blužnies bei kepenų tinimas, anemija. Odos leišmaniozė – dažniau pasitaikanti, tačiau lengvesnė forma. Pagrindinis simptomas – opų formavimasis atvirose kūno vietose. Ant odos gali susiformuoti šimtai opų, o joms užgijus lieka randai (PSO, 2020).

Gydymas priklauso nuo ligos formos bei parazito rūšies ir dažnai gali būti nesėkmingas dėl imunosupresijos ar parazito atsparumo. Pirmaeilis vaistas leišmaniozei gydyti yra penkiavalentis stibis (Sb^{5+}). Kaip veiklioji medžiaga skirtingų preparatų sudėtyje jis taikomas visceralinei bei odos leišmaniozės formoms gydyti. Šių vaistų veikimas greičiausiai pasižymi parazitų glikolizės ir riebalų rūgščių oksidacijos procesų slopinimu (Haldar et al., 2011). Visgi, yra žinoma, jog ilgametis stibio preparatų vartojimas skatina parazitų atsparumo jiems išsivystymą. Antraeiliai vaistai, tokie kaip tripanosomozė gydymui

naudojami pentamidinas ir amfotericinas, taip pat yra pasitelkiami kovai su *Leishmania* infekcija. Antivėžinis preparatas miltefosinas, gebantis inhibuoti ląstelės AKt/PKB signalinius kelius, naudojamas kaip trečiaeilis vaistas *Leishmania* infekcijai gydyti ir pasižymi paprastesniu vartojimu (per burną, kai tuo tarpu kiti vaistai yra intraveniniai) bei trumpu gydymo kursu. Visgi, visiems šiems vaistams yra būdingi stiprūs šalutiniai poveikiai, dažnai susiję su kraujotakos sistemos pažeidimu. Daugelis naudojamų vaistų yra netinkami tam tikroms žmonių grupėms, pavyzdžiui, nėščioms moterims. Kol kas efektyviausias būdas užkirsti kelią leishmaniozei yra kombinuotos terapijos, vienu metu naudojant kelis vaistus. Tokiu būdu parazitai eliminuojami efektyviau, dėl to sutrumpėja gydymo trukmė (Ghorbani and Farhoudi, 2017).

1.1.2.2 *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum – parazitas, sukeliantis didžiąją dalį maliarijos atvejų. Pirmuonis žmonėms yra pernešamas per užkrėstų maliarinių uodų (lot. *Anopheles*) patelių įkandimus. Teigiama, kad beveik pusė pasaulio žmonių populiacijos yra rizikos zonoje. Kasmet užfiksuojama šimtai milijonų ligos atvejų ir šimtai tūkstančių mirčių. Maliarija ypač pavojinga kūdikiams, jaunesniems nei penkerių metų vaikams, nėščiosioms ir žmonėms, užsikrėtusiems ŽIV. Maliarija gali būti apibūdinama kaip ūminė karštinė. Pirmieji simptomai, tokie kaip karščiavimas, galvos skausmas, šalčio krėtimas, gali būti nestiprūs ir sunkiai priskiriami maliarijai. Jeigu liga negydoma pirmąsias dvidešimt keturias valandas, gali progresuoti ir dažnu atveju lemti mirtį. Vaikams, kuriems pasireiškia sunki ligos forma, dažnai išsivysto tokie simptomai: sunki anemija, kvėpavimo takų sutrikimai, susiję su metaboline acidoze, cerebralinė maliarija. Suaugusiems taip pat gali pasiekti daugybinis organų nepakankamumas (PSO, 2020).

Efektyviausia kovos su *P. falciparum* sukelta maliarija priemonė šiuo metu yra artemisinino pagrindo vaistų kombinacijos. Artemisininas yra iš natūralių šaltinių gaunamas cheminis junginys, kurio veikimui privaloma jo aktyvacija kraujyje. Ši aktyvacija įvyksta, kai hemo geležies (II) oksidas skelia molekulinę endoperoksido žiedą (Tilley et al., 2016). Šio proceso metu yra atpalaiduojami laisvieji radikalai, kurie pažeidžia parazito baltymus. Dėl jo trumpo veikimo laiko bei galimybės išsivystyti atsparumui, artemisininas skiriamas kartu su kitais, paprastai ilgiau veikiančiais vaistais (tokiais kaip amodiakinas, piperakinas, pironaridinas, lumefantrinas, meflokinas ar sulfadoksinas/pirimetaminas). Ši kombinuota terapija paprastai skiriama oraliniu būdu esant lengvesnėms ligos formoms. Kovai su sunkia ir komplikauta maliarija rekomenduojamas intraveninis pusiau sintetinis artemisinino darinys artesunatas, pasižymintis geresniu įsisavinimu ir efektyvumu. Paprastai šių vaistų šalutiniai

efektai nėra labai sunkūs, dažnai primenantys maliarijos simptomus. Visgi, pagrindinės problemos, su kuriomis susiduriama taikant gydymą yra aukšta vaistų kaina ir vis labiau plintantis *P. falciparum* atsparumas veikliosioms medžiagoms (Tilley et al., 2016; PSO, 2018).

1.1.2.3 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii – parazitinis vienaląstis pirmuonis, sukeliantis žinduolių ligą toksoplazmozę. Pirminiai mikroorganizmo šeimininkai yra katinių šeimos atstovai, gebantys šalinti subrendusias oocistas savo išmatose. Žmonės užsikrėsti gali įvairiais būdais, tačiau pagrindinis jų – per maistą, vartojant nepakankamai termiškai apdorotą užkrėstų gyvūnų mėsą arba nešvarius vaisius bei daržoves. Toksoplazmozė, priešingai nei didelė dalis kitų pirmuonių sukiamų ligų, yra aktuali ne tik skurdžiuose ar tropinio klimato regionuose – kasmet Europoje užfiksuojama apie milijonas užsikrėtimo atvejų. Teigiama, kad iki 95% užsikrėtimo atvejų liga yra besimptomė, nes sveiko individo imuninė sistema efektyviai kovoja su parazitu. Visgi, *T. gondii* išlieka žmogaus organizme ir, esant imunosupresijai, gali tapti aktyvus. Imunodeficito atveju (pvz., sergant AIDS), liga gali sukelti intensyvius sutrikimus, tokius kaip akių infekcija ar encefalitas ir gali būti mirtina. Toksoplazmozė ypač pavojinga nėščioms moterims, nes užsikrėtus nėštumo metu ar prieš pat jį, infekcija gali lemti persileidimą arba gimusio vaiko neįgalumą (PSO, 2015).

Ligai gydyti taikoma kombinuota pirimetamino, sulfodiazino ir folio rūgšties terapija. Vaistai veikia per folio rūgšties metabolizmo inhibiciją. Nėščiosioms paprastai skiriamas kitas preparatas – spiramicinas, sumažinantis tikimybę toksoplazmozę perduoti vaisiui (CDC, 2018). Pagrindinės problemos, susijusios su ligos gydymu, yra parazito gebėjimas įsitvirtinti išoriniam poveikiui atspariose cistose, didelis šiuo metu naudojamų vaistų neigiamas poveikis (dažniausiai pasireiškiantis stipriomis alerginėmis reakcijomis bei kaulų čiulpų supresija) ir labai ilgų gydymo kursų poreikis. Nustatyta, kad net 62 % nuo toksoplazmozės gydytų žmonių pajaučia šalutinį vaistų poveikį ir net 44 % prireikia keisti terapiją (Alday and Doggett, 2017).

1.1.2.4 *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis – parazitinis nematodas, sukeliantis žmonių ir gyvūnų ligą trichineliozę. Užsikrečiama valgant nepakankamai termiškai apdorotą gyvūnų mėsą (ypač kiaulieną arba šernieną) su cistomis. Patekusios į žarnyną, lervos yra išleidžiamos iš cistų, subręsta, pasidaugina ir palikuonys migruoja į raumenis. Parazitas yra paplitęs visame pasaulyje, ir kasmet užfiksuojama apie dešimt tūkstančių ligos atvejų. Infekcija gali būti suskirstyta į dvi stadijas: žarnyno ir raumenų. Patekusios į žarnyną, lervos gali sukelti

gastroenteritą, susijusį su diarėja ir pilvo skausmais. *T. spiralis* lervoms migruojant, jos ir jų metabolitai sukelia organizmo atsaką, susijusį su imunologiniais, patologiniais ir metaboliniais pakitimais. Tokių pakitimų pasekmė gali būti audinių edema (ypač aplink akis), kraujagyslių sienelių uždegimas ar išbėrimai. Ūminio uždegimo simptomai, atsirandantys parazitui patenkant į raumenis, gali būti karščiavimas, raumenų skausmas, galimos komplikacijos, tokios kaip miokarditas ar encefalitas. Retais atvejais, trichineliozė gali pasibaigti mirtimi. Gydytas yra efektyvus, jei pradedamas ankstyvose stadijose, nes, po lervų įsitvirtinimo raumenyse, jos tampa atsparios vaistams ir gali išlikti gyvybingos daugelį metų (Gottstein et al., 2009).

Pagrindiniai vaistai trichineliozei gydyti yra mebendazolas ir abendazolas. Šie preparatai yra skiriami pradinėse ligos stadijose, yra nutaikyti į mikrovamzdelių sintezę helminto ląstelėse ir užkerta kelią jo gebėjimui apsigaubti cistomis. Šie vaistai negali būti naudojami nėščių moterų ir vaikų iki dviejų metų amžiaus ir, nors yra sąlyginai saugūs, kai kuriais atvejais gali sukelti kaulų čiulpų supresiją. Sunkesnėms infekcijos formoms gydyti gali būti taikomi steroidai, tokie kaip prednisonas, dažniausiai skirti uždegimui ir raumenų skausmui sumažinti, tačiau, kaip minėta, po įsitvirtinimo raumenyse, *T. spiralis* pašalinimas tampa komplikuotas (CDC, 2019).

1.1.2.5 *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei – vienaląstis parazitinis pirmuonis, sukeliantis žmogaus afrikinę tripanosomozę, kitaip dar vadinamą mieglige. Liga gali užsikrėsti tiek laukiniai bei naminiai gyvūnai, tiek žmonės, o pagrindinis pernešimo vektorius yra musė cėcė (lot. *Glossina*). Didžiausias pavojus užsikrėsti tripanosomozė egzistuoja Užsachario Afrikos šalyse, kur ligos proveržiai daro didžiulę žalą žmonių gerovei, galvijų auginimui bei žemės ūkiui. Nors pastaraisiais metais matoma dokumentuotų ligos atvejų mažėjimo tendencija, milijonai žmonių vis dar gyvena aukšta užsikrėtimo rizika pasižyminčiuose regionuose. Yra galimos dvi ligos formos, priklausomai nuo to, kokių parazitų užsikrečiama. *T. brucei gambiense* yra atsakingas už 98 % susirgimų atvejų ir sukelia chronišką infekcijos formą. Parazitas gali išlikti organizme mėnesius ar net metus po užsikrėtimo nesukeldamas simptomų, o kai jie pasireiškia, liga gali būti progresavusi ir paveikusi centrinę nervų sistemą. Kitas pirmuonis *T. brucei rhodesiense* yra susijęs su ūmine tripanosomozės forma. Pirmieji simptomai atsiranda po keleto savaičių ar mėnesių nuo užsikrėtimo, liga sparčiai vystosi ir apima centrinę nervų sistemą ir, jei negydoma, šeiminingą gali nužudyti per šešis mėnesius (PSO, 2020). Po musės cėcės įkandimo, parazitas patenka į kraujotakos sistemą, kur dalijasi ir sukelia nespecifinius simptomus, tokius kaip galvos ir sąnarių skausmas, karščiavimas, silpnumas, sąstingis, odos

niežėjimas, limfadenopatija. Šis periodas vadinamas hemolimfatine ligos stadija. Parazitui perėjus kraujo-smegenų barjerą bei nukeliavus į centrinę nervų sistemą, prasideda meningoencefalitinė ligos stadija. Jai būdingi intensyvūs neurologiniai simptomai, tokie kaip miego ir psichiatriniai sutrikimai, ataksija, traukuliai, koma (Büscher et al., 2017; PSO, 2020).

Ligai gydyti šiuo metu naudojami šeši vaistai, kurie yra skiriami atsižvelgiant į sukėlėją (*T. brucei gambiense* ar *T. brucei rhodesiense*) bei stadiją (hemolimfatinė ar meningoencefalitinė). *T. brucei gambiense* sukeltai infekcijai pirmojoje stadijoje gydyti skiriamas pentamidinas. Jo veikimo mechanizmas nėra visai aiškus, manoma kad jis jungiasi prie DNR, yra atsakingas už mitochondrinės membranos suardymą (Lanteri et al., 2008). Antrajai *T. brucei gambiense* stadijai gydyti skiriama nifurtimokso-eflornitino kombinacija, nutaikyta į parazito ornitino dekarboksilazę (Bacchi et al., 1980). Suraminas yra skiriamas gydyti *T. brucei rhodesiense* sukeltą infekciją pirmoje jos stadijoje. Vaisto taikynys yra piruvato kinazės (Morgan et al., 2011). Meningoencefalitinei *T. brucei rhodesiense* sukeltos infekcijos stadijai gydyti naudojamas melarsoprolas, veikiantis tripanotoną – parazito molekulę, užtikrinančią redukuojančią aplinką ląstelėje (Fairlamb et al., 1989). Šis vaistas yra itin toksiškas, net 10 % pacientų sukelia reaktyvią encefalopatiją (pasireiškiančią kaip koma, traukuliai, cerebralinė edema), nuo kurios pusė jų miršta (Büscher et al., 2017). Visų šių vaistų pateikimo būdas yra intraveninis, o tai sukelia problemų nesant pakankamų sanitarinių sąlygų. Melarsoprolas yra tirpinamas propilenglikolyje, todėl šio vaisto injekcijos yra itin skausmingos. Vienintelis oraliniu būdu skiriamas vaistas yra feksinidazolas. Tai naujas preparatas, skiriamas abiemis *T. brucei gambiense* stadijoms gydyti. Mechanizmas, manoma, susijęs su parazito nitroreduktazių aktyvacija ir reaktyvių aminų, mutageniškų ir toksiškų tripanosomoms, generacija (Torreale et al., 2010). Visgi, nors ir paprasčiau pateikiamas, vaistas, kaip ir visi kiti, turi nemenkų šalutinių poveikių (Lindner et al., 2020). Taigi, nors ir veiksmingi, vaistai, šiuo metu skiriami miegliagai gydyti, turi nemenkų trūkumų, susijusių su sudėtingu vartojimu ir neigiamu poveikiu pacientui. Taip pat pastaraisiais metais pastebimas atsirandantis parazitų atsparumas tokių vaistų kaip pentamidinas ir melarsoprolas veikliosioms medžiagoms (Graf et al., 2013).

1.1.2.6 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi – parazitinis pirmuonis, atsakingas už Amerikinę tripanosomozę, dar vadinamą Čagaso (Čago) liga. Pagrindiniai ligos židiniai yra Lotynų Amerikos šalys, tačiau pastaraisiais dešimtmečiais stebimas išplitimas tiek į Jungtines Amerikos Valstijas ir Kanadą, tiek į daugelį Europos, kai kurias Afrikos bei Azijos šalis (Guhl, 2017). Infekcija yra glaudžiai susijusi su skurdu ir pažeidžiamomis visuomenės grupėmis ir PSO yra

klasifikuojama kaip viena iš apleistų tropinių ligų. Skaičiuojama, kad visame pasaulyje nuo šešių iki septynių milijonų žmonių yra užsikrėtę *T. cruzi* parazitu ir kasmet dėl ligos miršta apie dešimt tūkstančių (PSO, 2020). Kitaip nei Afrikinę tripanosomozę, Čagaso ligą perneša kraujasiurbės *Triatoma* genties blakės. Šie vabzdžiai yra paplitę kaimiškose ir priemiesčių vietovėse ir gyvena namų sienose bei stogų įtrūkimuose. Paprastai yra aktyvūs naktį ir parazitini organizmą žmogui perduoda per įkandimą į atviras odos vietas (paprastai veidą). *Triatoma* vabzdžiui pasimaitinus krauju, jis su išmatomis išskiria *T. cruzi*, kuris per įkandimo žaizdą ar gleivinę (akių) patenka į žmogaus organizmą. Egzistuoja ir kiti užsikrėtimo būdai: perdavimas iš motinos vaisiui, perdavimas per kraują ir transplantacijas, ir rečiau pasitaikantys – vartojant užterštą maistą ir vandenį bei dėl nelaimingų atsitikimų laboratorijose (Pérez-Molina and Molina, 2018; PSO, 2020).

T. cruzi, kaip ir daugeliui parazitinių pirmuonių, būdingas sudėtingas gyvenimo ciklas, pasižymintis variacija tarp skirtingų morfologinių formų, susijusių su prisitaikymu išgyventi įvairiomis aplinkos sąlygomis. Žmogaus organizme parazitas gali egzistuoti dviem formomis. Žiuželiuota tripomastigota yra parazito forma, kurią vabzdys pašalina iš savo organizmo su išmatomis ir kuri geba patekti į šeimininko organizmą per žaizdas ir gleivines. Tripomastigotos yra judrios ir geba patekti į įvairias žmogaus ląsteles, tačiau negeba daugintis. Ląstelių viduje tripomastigotos transformuojasi į amastigotas. Ši pirmuonio forma neturi žiuželio, yra nejudri ir geba dalytis įvairiose organizmo ląstelėse, dažniausiai – mezenchiminėse. Trečioji morfologinė forma – epimastigota – egzistuoja vabzdžio žarnyne (Pérez-Molina and Molina, 2018). Liga pasireiškia dviem stadijomis – ūmine ir chroniška. Ūminės stadijos metu kraujyje cirkuliuoja didelis kiekis parazitų, tačiau pasireiškiantys simptomai paprastai yra neintensyvūs ir nespecifiniai (karščiavimas, galvos skausmas, padidėję limfmazgiai, tinimai, raumenų, pilvo, krūtinės skausmai). Ligai perėjus į chronišką stadiją, parazitas slepiasi širdies ir žarnyno raumenų ląstelėse, todėl daliai užsikrėtusiųjų pasireiškia širdies ir virškinamojo trakto pažeidimai, nereti ir neurologiniai sutrikimai. Ilgalaikė infekcija gali nulemti staigią mirtį dėl širdies aritmijos, susijusios su parazito sukeltais pažeidimais (PSO, 2020).

Du preparatai – benznidazolas ir nifurtimoksas – yra skiriami Čagaso ligai gydyti. Abu vaistai pasižymi aukštu efektyvumu, kai yra skiriami netrukus po infekcijos pradžios – ūminės stadijos metu (įskaitant ir įgimtą ligos formą). Kur kas sudėtingesnis gydymas ligai perėjus į chronišką formą, šiuo atveju vaistai gali sumažinti mirtinumą, tačiau visiškas pasveikimas nėra užtikrinamas. Nifurtimoksas – pirmasis efektyvus vaistas *T. cruzi* infekcijai sustabdyti. Jo veikimo principas nėra iki galo aiškus: ilgą laiką manyta, jog jis susijęs su oksidaciniu stresu ir yra atsakingas už laisvųjų radikalų generavimą. Visgi, kai kurie tyrimai

rodo, kad jo aktyvumas priklauso nuo pirmo tipo tripanosominės nitroreduktazės (Hall et al., 2011). Vaistas, nors ir efektyvus chroniškai ligos stadijai gydyti (ypač vaikams), net iki 97,5 % pacientų sukelia neigiamus šalutinius efektus ir iki 75 % žmonių gydymas turi būti nutraukiamas (Pérez-Molina and Molina, 2018). Dažniausi šalutiniai poveikiai yra svorio kritimas, anoreksija, neurologiniai sutrikimai, pykinimas ir vėmimas, bei karščiavimas ir bėrimas. Dėl šių nifurtimokso trūkumų, pirmenybė teikiama kitam vaistui benznidazolui, pasižyminčiam ne tik geresniu toleravimu, bet ir audinių pralaidumu bei efektyvumu. Keli skirtingi veikimo mechanizmai priskiriami šiam vaistui: kovalentinė DNR, baltymų ir lipidų modifikacija, aduktų su guanozino bazėmis DNR ir RNR suformavimas, poveikis fumarato reduktazei (Ribeiro et al., 2019). Pagrindinis šalutinis vaisto poveikis yra odos bėrimas (iki 50 % pacientų), taip pat virškinimo sutrikimai, anoreksija, galvos skausmas, miego sutrikimai. Šio vaisto terapija nutraukiama iki 29 % pacientų (Pérez-Molina and Molina, 2018).

Yra keletas priežasčių, kodėl parazitų, sukeltų tiek pirmuonių, tiek helmintų, gydymas yra sudėtingas ir ne visuomet veiksmingas. Už šias ligas yra atsakingi eukariotai, kurių ląstelės savo sandara nėra tolimos žmogaus ląstelėms. Dėl šios priežasties, sudėtinga rasti unikalių taikinių potencialiems vaistams, dažnu atveju veiklioji medžiaga sąveikauja ne tik su ligos sukėlėju, bet ir šeimininko ląstelės struktūromis. Todėl absoliuti dauguma antiparazitinių preparatų yra kenksmingi žmogaus sveikatai ir turi būti naudojami mažomis dozėmis ir trumpą laiką. Kita didelė problema, dėl kurios vis daugiau vaistų naudojimas yra nutraukiamas, yra parazitų gebėjimas sparčiai išvystyti atsparumo mechanizmus (Horn and Duraisingh, 2014). Keleto skirtingų parazitų ir jų gydymui skirtų preparatų analizė rodo, kad dažnu atveju tie patys vaistai yra naudojami keletą dešimtmečių, neretai pritaikomi jau kitoms ligoms gydyti skirti vaistai. Taip pat galima pastebėti, kad dažnai nėra žinomi tikslūs veikliųjų medžiagų veikimo mechanizmai. Kiekvienam parazitiniam organizmui būdingas unikalius gyvenimo ciklas ir infekcijos eiga, dažnai, nors ir homologiškai, jų baltymai pasižymi specifinėmis savybėmis. Tai leistų manyti, kad racionalus vaistų dizainas galėtų padėti sukurti chemines medžiagas, kurios būtų labai tiksliai nutaikytos į konkrečią parazitinio organizmo molekulę, darant kaip įmanoma mažesnę žalą žmogaus ląsteliniams procesams. Tokiu atveju, būtų galima ne apytiksliai numanyti kaip veikia vaistas, o tiksliai žinoti jo ir taikinio jungimosi mechanizmą ir jį, esant reikalui, tobulinti.

1.2 Molekuliniai šaperonai

1.2.1 Molekulinių šaperonų apžvalga

Baltymai yra struktūriškai kompleksiškos biologinės makromolekulės, dalyvaujančios bene visuose ląsteliniuose procesuose. Yra žinoma, kad teisingas baltymo erdvinės struktūros įgavimas yra reikalingas jo funkcijai. Dar septintajame dešimtmetyje buvo atlikti baltymų tyrimai (Anfinsen et al., 1961), kurių metu buvo stebima grįžtama baltymų denatūracija. Šiuose eksperimentuose parodyta, kad po denatūruojančios medžiagos pašalinimo, baltymas geba atgauti savo struktūrą bei funkcinį aktyvumą, ir tai mokslininkus įtikino, kad susilankstymo procesas yra autonomiškas ir nulemtas baltymą koduojančios DNR. Ilgą laiką manyta, kad baltymų susilankstymas yra jokių išorinių veiksnių ir papildomos energijos nereikalaujantis procesas. Visgi, eksperimentai, atlikti *in vitro*, negali visiškai tiksliai atkartoti procesų, vykstančių ląstelės viduje. Čia vyraujančios sąlygos nėra optimalios baltymams – sąlyginai dideli makromolekulių kiekiai (iki 20-30 % bendro tūrio) lemia „susigrūdimą“ (Ellis and Minton, 2006). Baltymo tretinę struktūrą palaiko keletas skirtingų nekovalentinių ryšių, iš kurių vienas svarbesnių yra hidrofobinė sąveika. Ji nusako ryšį tarp hidrofobinių molekulių, pavyzdžiui, aminorūgščių, polinėje aplinkoje. Žinoma, kad tokios aminorūgštys yra linkusios telktis sulankstyto polipeptido viduje. Visgi, ankstyvose baltymo lankstymo stadijose, susidarant tarpinėms formoms, didelė dalis hidrofobinio paviršiaus gali būti eksponuojama išorėje. Tokiu atveju, baltymai gali nespecifiškai sąveikauti tarpusavyje, ir nuo koncentracijos gali priklausyti, ar baltymas susilankstys į savo natyvią struktūrą, ar sudarys agregatus (Hartl et al., 2011). Molekulinių šaperonų valdomi procesai – tai strategija sumažinti ląstelėse vykstančią baltymų agregaciją.

Terminas „molekuliniai šaperonai“ apibūdina grupę struktūriškai nesusijusių baltymų, reikalingų naujai susintetintų ar dėl įvairių priežasčių destabilizuotų baltymų teisingam susilankstymui. Šaperonai pirmą kartą atrasti pastebėjus gerokai padidėjusią jų raišką esant atsakui į karščio šoką (Ritossa, 1996). Dėl šios priežasties jie dar vadinami karščio šoko baltymais (angl. heat-shock proteins – hsp). Visgi, karščio šokas nėra vienintelis veiksnys, išprovokuojantis padidėjusią šaperonų raišką ląstelėse. Yra parodyta karščio šoko baltymų reikšmė ląstelių atsake į šalčio šoką (Matz et al., 1995), UV apšvitinimą (Cao et al., 1999), taip pat audinių regeneracijoje ir žaizdų gijime (Laplante et al., 2016) bei kovoje su infekcinėmis ligomis (Zügel and Kaufmann, 1999). Aplinkoje padidėjęs metalų kiekis (Bauman et al., 1993), ląstelės badavimas (Spence et al., 1990), hipoksija (Hammerer-Lercher et al., 2001) ir daugelis kitų, ląstelės veiklą trikdančių ir proteostazei pavojų keliančių

veiksnių, taip pat gali paskatinti karščio šoko baltymų raišką. Dėl didelės veiksmų įvairovės, neretai šie baltymai vadinami streso baltymais.

Šaperonai geba lankstyti ir perlankstyti savo baltymus-klientus (šaperonų apdorojamus baltymus, substratus) ir dažniausiai tam reikalinga ATP energija. Viena principinių šaperonų savybių yra jų gebėjimas jungtis prie hidrofobinių aminorūgščių, dėl to šaperonai atpažįsta nenatūvias baltymines struktūras, dažnai susijusias su denatūracija arba tarpinėmis baltymų struktūromis ankstyvose lankstymo stadijose. Toks šaperonų ir dideliu hidrofobiškumu pasižyminčių baltymų susijungimas sumažina tikimybę pastariesiems agreguoti ir virsti nefunkcionaliomis makromolekulėmis. Hidrofobinės sąveikos pasižymi mažu specifiskumu, dėl to, o taip pat ir dėl tarpinių baltymų stadijų konformacinio lankstumo, šaperonai geba sąveikauti su didele įvairove skirtingų baltymų, stipriai besiskiriančių savo aminorūgščių seka bei konformacija. Šaperonai paskatina savo taikinių konformacinius pokyčius, neretai nutraukdami nenatūvius ryšius, taip palengvindami biologiškai aktyvios struktūros susidarymą. Šaperono gebėjimas prisijungti baltymus ir juos efektyviai atpalaiduoti yra susijęs su paties streso baltymo gebėjimu pereiti į skirtingas stadijas (atitinkamai mažiau ir labiau afiniškas klientui). Prisijungęs substratas stabilizuoja aukšto afiniškumo būseną, dėl to atpalaidavimui yra reikalingas energijos šaltinis, paprastai ATP (Kim et al., 2013; Walter and Buchner, 2002). Visgi yra šaperonų, dažnai mažos molekulinės masės, atliekančių savo funkciją be ATP hidrolizės. Vieni tokių – mitochondriniai Tim baltymai, padedantys kitiems polipeptidams judėti per membranas (Petraakis et al., 2009).

Karščio šoko baltymai yra susiję su baltymų-klientų tretinės struktūros palaikymu, tačiau tai gali būti pasiekama skirtingais būdais. Šaperonai gali funkcionuoti kaip foldazės, prisidedančios prie lankstymo, kaip holdazės, užkertančios kelią nesulankstytų baltymų agregacijai bei kaip translokazės, „palydinčios“ naujai susintetintus polipeptidus į reikiamus ląstelės kompartmentus. Kai kurie šaperonai turi papildomą katalitinį aktyvumą, pavyzdžiui, izomerazinį, oksidazinį ar reduktazinį (Petraakis et al., 2009). Šaperonai nėra lokalizuoti vien citozolyje, jie randami ir kitose ląstelės vietose, tokiose kaip endoplazminis tinklas, mitochondrijų tarpmembraninė erdvė ir matriksas, taip pat bakterijų periplazma. Ląstelėse randami šiluminio šoko baltymai yra klasifikuojami į keletą struktūriškai nesusijusių klasių, atsižvelgiant į apytikslių jų molekulinę masę (pvz., Hsp10 molekulinė masė yra ~10 kDa, Hsp90 – ~90 kDa ir t.t.). Pagrindinės klasės yra šios: Hsp10, Hsp20, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100. Visų klasių Hsp homologai randami tiek eukariotuose, tiek prokariotuose.

Hsp60 – molekulinis šaperonas, dažniausiai randamas mitochondrijose ir augalų chloroplastuose. Pagrindinė jo funkcija yra pagalba lankstant ir degraduojant mitochondrinius baltymus. Visgi, Hsp60 raiška stebima ir citozolyje, ląstelės membranoje, tarpląstelinėje

erdvėje bei įvairiuose biologiniuose skysčiuose, kur jis susijęs su baltymų transportu bei hormonų signaliniais keliais. Dėl to tiriamas Hsp60 vaidmuo įvairių ligų patogenezės mechanizmuose. Parodyta, kad jis geba stimuliuoti imuninį atsaką, yra siejamas su vėžiniais susirgimais (Nakamura and Minegishi, 2013). Hsp60 sudaro molekulinį kompleksą su Hsp10. Šis Hsp60/Hsp10 kompleksas yra atsakingas už nesulankstytų, dalinai ar neteisingai sulankstytų baltymų sugavimą ir padeda jiems įgauti reikiamą konformaciją. Eukariotų Hsp10 pagrindinė lokalizacija yra mitochondrijos, tačiau šis baltymas išsiskiria tuo, kad neturi tipiškos signalinės sekos, būdingos mitochondriniam baltymams. Vietoje jos, Hsp10 N galinė seka suformuoja amfipatinę alfa spiralę, su acetilintu pirmuoju alaninu, kuri leidžia šiam baltymui pereiti mitochondrijos membraną be signalinio peptido (Gupta et al., 2008). Hsp10 alternatyviai gali būti vadinamas ankstyvuuju nėštumo veiksmu (angl. early pregnancy factor – EPF), nes yra sekretuojamas ankstyvose nėštumo stadijose ir dalyvauja embriono vystymesi. Didesni nei įprasta šaperono kiekiai nustatomi vėžinėse ląstelėse, nustatytas ir Hsp10 antiuždegiminis atsakas, dėl to baltymas turi potencialo autoimuninių ligų gydyme (David et al., 2013).

Hsp70 – karščio šoko baltymas, randamas daugelyje eukariotinių ląstelių kompartmentų, taip pat membranose ir užląstelinėje erdvėje. Hsp70 yra viena pagrindinių molekulių, aptinkamų stresą patiriančiose ląstelėse. Hsp70 sudaro kompleksą su Hsp40, dar vadinamu baltymu DnaJ. Hsp40 šeimos atstovai kategorizuojami į tris skirtingas grupes, besiskiriančias savo domenine organizacija, tačiau visi jie turi charakteringą J domeną, leidžiantį prisijungti prie Hsp70. Šis kompleksas prisideda prie baltymų lankstymo, agregacijos prevencijos, baltymų susirinkimo ir ląstelinio transporto, stabilizuojant juos dalinai sulankstytoje būsenoje (Liu et al., 2020). Parodyta, kad Hsp70/Hsp40 kompleksas gali „paruošti“ substratus kitiems Hsp, t.y., atlikti pirminį atpažinimą ir lankstymą ir toliau klientus perduoti kitiems šaperonams, pavyzdžiui, Hsp90 (Clerico et al., 2015). Reikšmingas baltyminio komplekso vaidmuo vėžinių ląstelių išgyvenime – pasižymi antiapoptotiniu veikimu, stabilizuoja lizosomų membranas, taip paveikdamas autofagijos procesą, suteikia atsparumą prieš citostatinius vaistus bei radiacijos terapiją. Hsp70 taip pat siejamas su imuniniu atsaku, daugiausiai pasižymi prouždegiminiu veikimu (Radons, 2016). Yra duomenų, kad Hsp40 gali sąveikauti ir su kitais šaperonais, ar jungtis prie substratų patys, užkirdami kelią jų agregacijai (Sterrenberg et al., 2011).

Be išvardintų šaperonų klasių, ląstelėse taip pat randami Hsp20 baltymai, charakterizuojami specifinio domeno, vadinamo alfa-kristaliniu, turėjimu. Šie streso baltymai pasižymi aukšto lygio konstitutyvia raiška širdies, skeleto bei kraujagyslių lygiuosiuose raumenyse, dėl to siejami su kardioprotekcija. Be veikimo raumeninėse ląstelėse, šaperono

vaidmuo stebimas ir smegenyse bei suvėžėjusiuose audiniuose (Edwards et al., 2011). Kitas ląstelėse aptinkamas šaperonas yra Hsp100, kartu su Hsp70 sudarantis bi-šaperoninę sistemą ir veikiantis kaip baltymų disagregazė. Ši sistema pasižymi gebėjimu ištirpdyti ir reaktyvuoti platų spektrą agregavusių baltymų. Hsp100 aptinkamas bakterijose, grybuose ir augaluose, tačiau jo nėra gyvūnų ląstelėse. Baltymas labai svarbus organizmams, prisitaikiusiems gyventi nepalankiomis sąlygomis (pavyzdžiui, vienaląsčiams ir nejudriems organizmams). Yra įrodymų, kad Hsp100 yra susijęs su prionų dauginimu mielių ląstelėse (Mogk et al., 2015).

1.2.2 Hsp90

Šio tyrimo objektas – šaperonas Hsp90. Tai vienas labiausiai ląstelėse paplitusių baltymų, sudarantis iki 2 % viso ląstelės proteomo įprastomis sąlygomis, o esant streso sukeltai indukcijai, jo raiška gali padidėti dvigubai (Taipale et al., 2010). Vienintelis gyvybės domenai, kuriame iki šiol neaptikti Hsp90 baltymai yra archėjos, todėl galima spėti, kad evoliucijos eigoje genas vienu metu buvo prarastas (Chen et al., 2006). Daugumai bakterijų būdingas vienas Hsp90 homologas, žinomas kaip HtpG – aukštos temperatūros baltymas G (angl. high temperature protein G). Manoma, kad šis baltymas nėra gyvybiškai svarbus bakterijoms įprastomis sąlygomis, tačiau jo vaidmuo yra ryškus atsiradus šiluminiam stresui (Johnson, 2012).

Eukariotiniuose organizmuose paprastai randamas daugiau nei vienas Hsp90 homologas. Mielėse aptinkami du genai, koduojantys citozolinį šaperoną – Hsc82 ir Hsp82. Analogiškai ir žmogaus ląstelėse, čia citozolyje yra dvi izoformos – Hsp90 α ir Hsp90 β . Hsc82 ir Hsp90 β raiška yra nuolatinė, o Hsp82 ir Hsp90 α indukuojama karščio šoko (Schopf et al., 2017). Kai kurie augalai, tokie kaip *Oryza sativa*, gali turėti net keturias citozolinį Hsp90 koduojančių genų kopijas, o štai gyvūnai *Drosophila melanogaster* ir *Caenorhabditis elegans* – tik po vieną. Be citozolio, Hsp90 aukštesniuose eukariotuose dar randami ir kituose ląsteliniuose kompartmentuose: mitochondrijose, endoplazminiame tinkle bei chloroplastuose. Žmogaus ląstelėse mitochondrinis Hsp90 homologas dar gali būti vadinamas TRAP1– su TNF receptoriu susijęs baltymas 1 (angl. TNF receptor associated protein 1), endoplazminio tinklo homologas – GRP94, arba 94 kDa nuo gliukozės priklausomas baltymas (angl. 94 kDa glucose-regulated protein). Chloroplastuose aptinkami šio šaperono ortologai Hsp90C (Johnson, 2012).

Hsp90 pasižymi plačiu baltymų-klientų spektru (nustatyta sąveika su šimtais klientinių baltymų (Picard, 2020)), tai reiškia, kad jo vaidmuo daugelyje ląstelinių procesų yra itin ryškus. Šaperono klientas yra apibrėžiamas dviem aspektais – jis privalo fiziškai sąveikauti su streso baltymu bei pastarojo slopinimas turi lemti sutrikusį ar sumažėjusį kliento aktyvumą.

Vieni pagrindinių su Hsp90 siejami baltymai yra kinazės – manoma, kad apie 60 % ląstelės kinomo (viso vieno organizmo koduojamo kinazių rinkinio) yra priklausomi nuo šio streso baltymo. Kita pažymėtina klientų grupė – E3 ubikvitino ligazės, kurių apie 30 % yra priklausomos nuo Hsp90. Įvairūs transkripcijos faktoriai, branduoliniai hormonų receptoriai ir daugybė kitų baltymų taip pat yra glaudžiai susiję su šiuo šaperonu (Biebl and Buchner, 2019; Taipale et al., 2010). Kadangi dauguma šių sąveikaujančių baltymų turi centrinius vaidmenis svarbiausiuose ląstelių metaboliniuose tinkluose, galima teigti, kad Hsp90 yra vienas pagrindinių veiksmų ląstelės reguliacijoje. Keletas skirtingų procesų apibrėžia šio šaperono ir jo klientų sąveiką: Hsp90 palengvina aktyvios baltymo konformacijos įgavimą, prisideda prie daugiabaltyminių kompleksų susirinkimo bei palengvina sąveiką su ligandais, stabilizuodamas atvirą baltymo konformaciją, būtiną prisijungimui (Schopf et al., 2017). Hsp90 šaperono ir jo klientų sąveika nėra specifinė – nerastos nei aminorūgščių sekos nei struktūriniai elementai, kurie būtų bendri visiems šiems baltymams. Todėl daroma prielaida, kad atpažinimui reikalingas ne universalus signalas, o košaperonai ir kiti pagalbinių veiksniai. Manoma, kad prisijungiančio kliento konformacija ir struktūrinis stabilumas taip pat yra reikšmingi (Taipale et al., 2010).

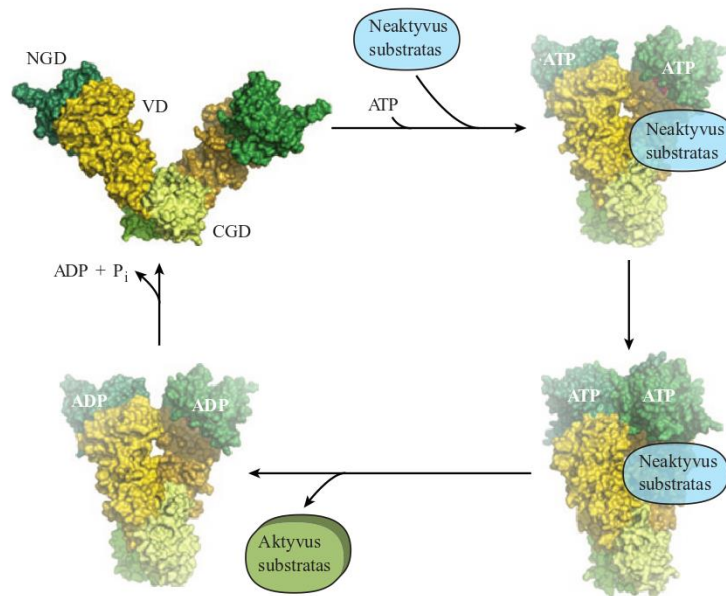
Nėra visiškai aiški Hsp90 homologų evoliucijos eiga. Manoma, kad GRP94 atsirado genų duplikacijos būdu ankstyvojoje eukariotų evoliucijoje ir vėliau buvo prarastas grybuose. Chloroplastų Hsp90C, tikėtina, atsirado duplikuotai GRP94 formai mutavus ir atsiradus chloroplasto signalinei sekai. TRAP1 atsiradimas yra mažiausiai aiškus. Tikėtina, kad keturios eukariotinės citoplazminio, endoplazminio tinklo, mitochondrinio ir chloroplastų Hsp90 linijos kilo iš vieno bakterinio HtpG geno duplikacijos. Alternatyvi versija teigia, kad keturios linijos kilo iš senovinio eukariotų protėvio, turėjusio dvi skirtingas HtpG kopijas, kurių viena evoliucionavo į mitochondrijų TRAP1, o kita – į citozolinį, endoplazminio tinklo ir chloroplastų formas (Chen et al., 2006; Johnson, 2012)

Visiems Hsp90 šeimos nariams yra būdinga ta pati domeninė organizacija – ATP prijungiantis N galo domenas (NGD), su klientais sąveikaujantis vidurio (VD) bei C galinis (CGD) domenai (2 Pav.). C galinis domenas užtikrina dimerizaciją, dėl to gali susidaryti funkcionalus V formos dimeras. Tokia struktūra yra konservatyvi ir būdinga visiems organizmams – nuo bakterijų iki žmogaus. N galo ir vidurio domenų jungia įkrautas, lankstus jungtukas (mielių atveju sudarytas iš 60 aminorūgščių), palaikantis kontaktą bei reikalingas baltymo funkcijai. Kita struktūra, būdinga Hsp90, yra C gale esantis Met-Glu-Glu-Val-Asp (MEEVD) motyvas, reikalingas sąveikai su košaperonais. Tačiau, nors ši struktūra būdinga citozoliniam Hsp90 paralogui, jos nėra, pavyzdžiui TRAP1 (Biebl and Buchner, 2019). Baltymo paviršius yra heterogeniškas, būdingos tiek hidrofobinės tiek įkrautos

aminorūgščių grupės, ir tai leidžia sąveiką su įvairaus krūvio ir hidrofobiškumo baltymais, užtikrinant didelę galimų klientų įvairovę (Ferrari and Rüdiger, 2019).

Baltymas priklauso GHKL (girazių, Hsp90, histidino kinazių, MutL) ATP-azių superšeimai. Visiems šios grupės baltymams yra būdinga unikali ATP prisijungimo kišenės struktūra. Ši konformacija, vadinama Bergerat struktūra (angl. – Bergerat fold), išskiria GHKL superšėimos narius iš visų kitų ATP rišančių baltymų. Struktūrai yra būdingas vadinamasis α/β „sumuštinis“, sudarytas iš keturių β klosčių ir trijų α spiralių. Unikali savybė, charakterizuojanti Bergerat struktūrą yra ilgas, lankstus ATP dangtelis. Šio dangtelio pozicija Hsp90 šaperono ATP jungimosi kišenėje išskiria jį iš kitų GHKL superšėimos narių (Dutta and Inouye, 2000).

Kaip ir daugumai kitų šaperonų, Hsp90 būdingas nuo ATP priklausomas reakcijos ciklas, lydimas konformacinių pokyčių (2 pav.). ATP molekulės prisijungimas ATP-aziniame N gale leidžia vykti konformaciniams pokyčiams, kurių pasekmė – ATP dangtelio užsidarymas ir tarpinės stadijos susidarymas. Po to vyksta NGD dimerizacija, susidaro uždaras Hsp90 dimeras, reikalingas ATP hidrolizei. Po hidrolizės NGD disocijuoja, atsiskiria ADP molekulė ir neorganinis fosfatas, atpalaiduojamas aktyvus baltymas-klientas ir Hsp90 vėl grįžta į atvirą konformaciją (Hartl et al., 2011). ATP jungimosi būdas šaperono aktyviajame centre nėra standartiškas, lyginant su kitomis ATP-azėmis – ATP molekulė prijungiama sulenktoje konformacijoje, o kišenė priima bazę ir cukrų, kai tuo tarpu fosfato liekanos lieka išorėje (Prodromou et al., 1997). Hsp90 ATP-azinis aktyvumas yra sąlyginai žemas. Baltymo afiniškumas ATP molekulei yra labai silpnas – disociacijos konstanta (K_d) yra $\sim 400 \mu\text{M}$ (Scheibel et al., 1997). Taip pat nustatyta, kad hidrolizės reakcija yra lėta, jos greitis varijuoja tarp $0,1-1 \text{ ATP min}^{-1}$ (Panaretou et al., 1998). Šios reakcijos greitį limituojantys veiksniai yra konformaciniai pokyčiai, lemiantys uždaros baltymo dimero konformacijos susidarymą (Hessling et al., 2009).



2 pav. Hsp90 konformacijos kitimo ciklas. NGD – N galo domenai; VD – vidurio domenai; CGD – C galo domenai. Pritaikyta pagal Hartl et al., 2011.

Hsp90 savo ciklo metu sąveikauja su pagalbiniais baltymais, vadinamais košaperonais, kurie yra susiję su šaperono aktyvumo reguliacija. Košaperonai gali jungtis prie skirtingos konformacijos Hsp90 – vieni jų (Aha1, p23) teikia pirmenybę uždaros konformacijos šaperonui, kiti (Sti1, Sgt1) sąveikauja su atviru dimeru. Vieta, prie kurios jungiasi košaperonai taip pat gali būti įvairi – sąveika galima su bet kuriuo domenu. Kai kurie košaperonai konkuruoja dėl galimybės prisijungti prie Hsp90, o kai kuriais atvejais veikimas yra sinergistiškas. Reguliacinės funkcijos, kurias apima košaperonai, gali būti: ATP-azinio aktyvumo skatinimas arba slopinimas, Hsp90 ir kliento komplekso bei įvairių šaperono konformacijų stabilizavimas (Li et al., 2012; Sahasrabudhe et al., 2017). Kitas reikšmingas šaperonų aktyvumo reguliavimo būdas yra potransliacinės modifikacijos. Pagrindinės jų – fosforilinimas, acetilinimas, nitrozilinimas, metilinimas – gali padėti užtikrinti greitą atsaką į įvairius viduląstelinius ir užląstelinius signalus. Šių modifikacijų pasekmė gali būti įtaka konformaciniams šaperono pokyčiams ATP-azinio ciklo metu, taip pat jos gali būti susijusios su baltymo domenų tarpusavio sąveika (Li et al., 2012).

Itin platus šiluminio šoko baltymo Hsp90 klientų spektras ir iš to kylantis sąryšis su daugeliu metabolinių ląstelės procesų lemia, kad šis baltymas neretai siejamas su skirtingomis ligomis. Pastaraisiais metais intensyviai tiriama Hsp90 vaidmuo vėžiniuose susirgimuose. Pagrindiniai procesai, susiję su auglių formavimusi, kuriuose dalyvauja Hsp90, yra angiogenezė, apoptozės išvengimas, audinių invazija ir metastazė, adhezija, vaidmuo augimo ir proliferacijos signalų perdavime (Miyata et al., 2013). Padidėjusi šio streso baltymo raiška

stebima įvairaus tipo vėžiuose (kasos, kiaušidžių, plaučių, krūties, melanomoje, leukemijoje) ir yra naudojama kaip diagnostinis žymuo. Dėl savo svarbaus vaidmens auglių vystymesi, Hsp90 tiriamas kaip potencialus priešvėžinių vaistų taikiny. Pastaraisiais metais vykdomi įvairių slopiklių, dažniausiai nutaikytų į N galinį baltymo domeną, klinikiniai tyrimai (Wu et al., 2017). Be vėžio, Hsp90 yra siejamas ir su neurodegeneratyvinėmis ligomis. Viena iš šių ligų priežasčių yra nenatūralios struktūros baltymų agregacija ląstelėse. Tokie baltymai kaip Tau (Alzheimerio ligos indikatorius), α -sinukleinas (Parkinsono ligos indikatorius) ir huntingtininas (Huntingtono ligos indikatorius) yra Hsp90 klientai. Dėl savo vaidmens ląstelės baltymų „kokybės kontrolėje“ šaperono raiškos reguliavimas galėtų turėti įtakos neurodegeneratyvinių ligų gydyme (Pratt et al., 2015).

1.2.3 Hsp90 kaip antiparazitinių vaistų taikiny

Molekulinio šaperono Hsp90 reikšmė yra didelė visiems organizmams, įskaitant ir anksčiau aptartus parazitinius pirmuonis. Šie organizmai neretai pasižymi kompleksiškais vystymosi ciklais ir skirtingose gyvenimo stadijose turi išgyventi įvairiomis aplinkos sąlygomis. Pavyzdžiui, parazitai, į šeimininko organizmą perduodami per vabzdžio įkandimą, susiduria su reikšmingu temperatūros pokyčiu. Kiti veiksniai, tokie kaip pH pokytis ir šeimininko imuniteto gynyba, taip pat sukelia streso atsaką. Tokiomis aplinkybėmis išgyvenimui ir proliferacijai parazitams kritiškai svarbu užtikrinti ląstelių proteostazę, dėl to jie yra priklausomi nuo įvairių šaperonų (įskaitant Hsp90) (Roy et al., 2012).

Vienas iš maliarijos sukėlėjų – *Plasmodium falciparum* – yra puikus pavyzdys, kaip Hsp90 šaperonas parazitiniam organizmui padeda prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Be to, kad iš šaltakraujio vabzdžio organizmo pereina į šiltakraujį žinduolio, maliarijos atveju pirmuonis dar susiduria su ligai būdingais dideliais temperatūros svyravimais (periodinėmis karščiavimo bangomis). Tokios sąlygos išprovokuoja *P. falciparum* streso atsaką, valdomą šio parazito Hsp90 (PfHsp90). Tyrimais parodyta, kad PfHsp90 slopinimas specifiniais slopikliais (tokiais kaip geldanamycinas) sustabdo parazito augimą eritrocituose (Banumathy et al., 2003). Taip pat yra parodyta, jog pirmuonio perėjimas iš „žiedo“ stadijos į metaboliškai aktyvią tropozoito stadiją gali būti reguliuojamas temperatūriškai, todėl Hsp90 funkcija glaudžiai siejasi su parazito morfologinių formų pokyčiais (Pavithra et al., 2004). Hsp90 svarba parodyta ir *Leishmania donovani* gyvenimo ciklo progresijoje, pereinant iš judrios promastigotos į nejudrią amastigotos stadiją žmogaus organizme (Wiesgigl and Clos, 2001). Parazito *Trypanosoma cruzi* atveju, Hsp90 slopinimas lėmė sulėtėjusį augimą ir tam tikrus ląstelės morfologijos pokyčius, tačiau nebuvo siejamas su variavimu tarp skirtingų stadijų. Viena to priežasčių galėtų būti faktas, kad perėjimas iš epimastigotos į tipomastigotą vyksta

vabzdžio organizme prieš perdavimą žinduoliui, todėl nėra tiesiogiai susijęs su šiluminiu šoku. Visgi, Hsp90 vaidmuo parazito išgyvenimui yra akivaizdžiai svarbus (Graefe et al., 2002).

Yra parodyta, kad parazitiniai Hsp90 pasižymi gerokai didesniu afiniškumu ATP molekulėms bei turi apie šešis kartus didesnę ATP-azinių aktyvumą, lyginant su žmogaus šaperonu (Pallavi et al., 2010). Dėl šio fakto, o taip pat dėl nustatytos esminės Hsp90 įtakos parazitinių pirmuonių vystymuisi, šis šaperonas yra potencialus taikyns naujų vaistinių medžiagų vystymui. Anksčiau minėta, unikali aktyviojo centro konformacija leidžia surasti slopiklius, labai specifiskai slopinančius Hsp90 N galo domeną, tačiau nesijungiančius su kitais ATP surišančiais baltymais. Vieni pirmųjų ištirtų Hsp90 slopiklių yra natūralūs junginiai geldanamycinas (GA) bei radisikolis. Jie, kaip dauguma slopiklių, sąveikauja su N galiniu baltymo domenu ir jungiasi ATP kišenėje. Visgi, nors ir veiksmingi slopinant Hsp90 funkcionavimą, šie junginiai pasižymi dideliu toksiškumu žmonėms, ir nestabilumu *in vivo* (Neckers and Workman, 2012). Dėl šios priežasties kuriami pusiau sintetiniai GA analogai, tokie kaip 17-alilamino-17-demetoksigidanamycinas (17-AAG). Parodytas šio junginio veiksmingumas pelių modelyje stabdant *P. falciparum* parazitų augimą (Pallavi et al., 2010). Dauguma Hsp90 slopiklių yra vystomi kaip potencialūs priešvėžiniai vaistai, tačiau jų veiksmingumas žudant parazitinius pirmuonis tiek *in vivo* tiek *in vitro* eksperimentuose skatina atsižvelgti į jų panaudojimą šių organizmų sukeltų infekcijų gydymui.

Hsp90 šaperonas pasižymi dideliu konservatyvumu – jo homologai įvairiuose organizmuose yra struktūriškai panašūs. Tai leistų manyti, kad siekiant slopinti patogenų šaperonus, būtų daromas poveikis ir žmogaus ląstelių Hsp90. Visgi, tyrimai rodo, kad parazitiniai šaperonai turi unikalių savybių, atskiriančių juos nuo žmogaus baltymų (Faya et al., 2015). Šie skirtumai leidžia manyti, kad įmanoma sukurti junginius, selektyviau besirišančius su parazitiniiais baltymais nei su žmogaus homologais. Tokių slopiklių paieškai gali pasitarnauti kristalografinė analizė, kurios dėka būtų galima identifikuoti specifines baltymų-slopiklių sąveikas bei pritaikyti šias žinias naujų, efektyvesnių ir mažiau toksiškų vaistų prieš parazitines infekcijas kūrimui.

Pastaraisiais metais vykdomi tyrimai su įvairiais naujai sintetinamais Hsp90 ligandais suteikia trūkstamos informacijos apie parazitinių šaperonų slopinimo galimybes. Šiuo metu dalis šiame darbe aptariamų parazitų Hsp90 baltymų kristalinių struktūrų jau yra nustatytos. Tarp jų – ne viena *P. falciparum* Hsp90 N galinio domeno struktūra su prijungtomis ADP molekulėmis arba sintetiniais slopikliais (Corbett and Berger, 2009; Pizarro et al., 2009; Wernimont et al., 2010a). Pirmuonio *T. brucei* Hsp90 N domeno ir trijų skirtingų slopiklių struktūros taip pat yra publikuotos (Pizarro et al., 2013). Išspręstos, tačiau nepublikuotos ir

keturios *L. major* kompleksų su ligandais struktūros (Wernimont et al., 2009, 2010b, 2010c, 2010d). Žmogaus Hsp90 α yra tiriamas jau ilgus metus – dažniausiai kaip taikinytis priešvėžiniams vaistams – tad literatūroje galima rasti daug struktūrinės šio baltymo informacijos. Visgi, kiekvieno naujai susintetinamo ligando cheminė struktūra ir sąveika su baltymu yra unikali, todėl skirtingi junginiai aktyviajame centre užima skirtingas padėtis. Dėl šios priežasties, kristalografinė analizė yra reikalinga kiekvienam tiriamam baltymui ir specifiniam junginiam kompleksui. Taip pat, šiame darbe aptariamų organizmų *T. gondii*, *T. cruzi*, *L. donovani* bei *T. spiralis* Hsp90 struktūros (nei su slopikliais, nei be jų) dar nebuvo nustatytos jokioje mokslininkų grupėje. Šių trūkstamų žinių gavimas būtų svarbus žingsnis link preciziško ir racionalaus antiparazitinių vaistinių preparatų dizaino.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Prietaisai, priemonės, medžiagos ir tirpalai

2.1.1 Prietaisai

- Baltymų elektroforezės aparatas „BIO-RAD“;
- baltymų kristalizacijos robotas „Oryx8“;
- DNR elektroforezės aparatas „SIGMA-ALDRICH“;
- gryninimo sistema „ÄKTA purifier“;
- inkubatorius „BIOSAN Environmental Shaker Incubator ES-20“;
- laminarinis boksas „Ezermester ISZ“;
- magnetinė maišyklė „RCT basic IKA LABORTECHNIK“;
- magnetinė maišyklė „Thermolyne nuova stirrer“;
- PGR termocikleris „Eppendorf Mastercycler personal“;
- pH-metras „WTW Inolab pH 720“;
- purtyklė / minicentrifuga „BIOSAN Multi-Spin MSC-6000“;
- purtyklė „VELP SCIENTIFICA ZX3 Advanced Vortex Mixer“;
- robotizuota kristalinimo lėkštelių talpykla „RIGAKU CrystalMation Gallery DT Minstrel DT Protein Crystal Drop Imager Plate Hotel“;
- Spektrofluorimetras „Corbett Rotor-Gene 6000 (QIAGEN Rotor-Gene Q) spectrofluorimeter“;
- spektrofotometras „Agilent 8453“;
- spektrofotometras „JENWAY 6305 UV/Vis. Spectrophotometer“;
- spektrofotometras „NanoDrop“;
- svarstyklės „KERN 572“;
- svarstyklės „KERN GJ“;
- šaldoma centrifuga „Herolab HiCen SR Superspeed“;
- šaldoma mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“;
- termostatas „Eppendorf ThermoStat plus“;
- termostatuojama purtyklė „LaboChema“;
- termostatuojama purtyklė „Thermo Fisher Scientific Max Q 4000“;
- ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls“ (VS 70T antgalis);
- UV/WL šaltinis su gelių dokumentavimo sistema „MiniBis Pro“.

2.1.2 Medžiagos, priemonės ir rinkiniai

Aldrich: ANS;

Amicon: koncentratoriai „Amicon Ultra“ su 10 kDa filtru;

BioRad: TEMED, glicinas, 2–merkaptoetanolis;

Ferak Berlin: Tritonas – X100;

Fluka: bisakrilamidas, Coomassie Brilliant Blue R-250, etidžio bromidas, HCl, NaOH;

GE Healthcare: Chelating Sepharose™ Fast Flow sorbentas, Q Sepharose® Fast Flow sorbentas, PVDF filtrai;

Hampton Research: kristalinimo sąlygų paieškos tirpalų rinkiniai „Index“, „CrystalScreen“, „Natrix“, „PEGRx“, „SaltRx“;

Matheson Coleman & Bell: bromfenolio mėsis;

Molecular Dimensions: 96 šulinėlių MRC2 kristalinimo lėkštelės „Swissci“;

Riedel-de Haën: karbamidas;

Roche: glicerolis, PMSF;

Roth: agar–agaras, akrilamidas, ampicilinas, APS, DMSO, HEPES, LB terpė, BHI terpė, mielių ekstraktas, NaCl;

Serva: dializės membrana „VISKING dialysis tubing MWCO 12000 – 14000“, porų diametras – 25 Å;

Sigma: CH₃COOH, EDTA, KCl, NDS, NiCl₂, CoSO₄, agarozė, DTT;

Thermo Fisher Scientific: IPTG, imidazolas, Tris-HCl, baltymų dydžio žymuo #SM 0431 (Protein Molecular Weight Marker), DNR dydžio žymuo #SM 0331 (GeneRuler™ DNA Ladder Mix), DNR 6x mėginių dažas (6X Orange Loading Dye), restrikcijos endonukleazės (NdeI, XhoI), T4 DNR ligazė ir jos buferinis tirpalas (Rapid T4 ligase buffer), dNTP mišinys, SAP šarminė fosfatazė ir jos buferinis tirpalas, *Phusion* polimerazė ir jos buferinis tirpalas, T4 polinukleotidų kinazė ir jos buferinis tirpalas (10x reaction buffer A for T4 Polynucleotide Kinase). DNR gryninimo rinkiniai: „GeneJET™ Gel Extraction Kit“, „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“, „GeneJET™ PCR Purification Kit“.

2.1.3 Terpės ir tirpalai

Skysta LB terpė: Sausa terpė (santykiu 25 g/ 1 L) ištirpinama distiliuotame vandenyje. Terpė autoklavuojama 120 °C temperatūroje 20 min, naudojant 1 papildomos atm slėgį.

Agarizuota LB terpė: į 1 L skystos terpės pridedama 15 g agar-agaro. Autoklavuojama 120 °C temperatūroje 20 min, naudojant 1 papildomos atm slėgį.

Skysta BHI terpė: Sausa terpė (santykiu 37 g/ 1 L) ištirpinama distiliuotame vandenyje. Terpė autoklavuojama 120 °C temperatūroje 20 min, naudojant 1 papildomos atm slėgį.

Mitybinė SOC terpė: 20 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl ir 3,5 mM KCl ištirpinama dejonizuotame vandenyje (galutinis tūris 1 L). Autoklavuojama 120 °C temperatūroje 20 min, naudojant 1 papildomos atm slėgį. Atšaldžius, pridedama 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂ ir 20 mM gliukozės. Filtruojama per 0,2 μm PVDF filtrą, išpilstoma po 1 mL ir laikoma -20 °C temperatūroje.

50x TAE elektroforezės buferinis tirpalas: 242 g TRIS bazės, 57,1 mL ledinės acto rūgšties, 0,05 M EDTA. Skiedžiama distiliuotu vandeniu iki 1 L. Buferis laikomas kambario temperatūroje.

1x TAE elektroforezės buferinis tirpalas: 50x tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu.

10x baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 1 L tirpalo: 144 g glicino, 30 g TRIS-OH, 10 g NDS tirpinama dejonizuotame vandenyje.

1x baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 10x tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu.

Poliakrilamidinio gelio dažas: 45,2 % etanolio, 9,2 % acto rūgšties, 2,4 g/L Coomassie Brilliant Blue R-250. Coomassie Brilliant Blue R-250 tirpinamas nedideliame kiekyje vandens. Pilamas etanolis, acto rūgštis, maišoma, kol ištirpsta. Laikoma 22 °C temperatūroje.

Akrilamido/bis-akrilamido (AA/BAA) tirpalas (30 %): 100 mL tirpalo: 29,2 g akrilamido; 0,8 g bisakrilamido tirpinama dejonizuotame vandenyje, nufiltruojama per stiklo filtrą ir laikoma 4 °C temperatūroje.

6x baltymų elektroforezės dažas: 300 mM TRIS (pH=6,8), 600 mM DTT, 0,6 % bromfenolio mėlio, 12 % NDS, 60 % glicerolio. Išpilstoma po 0,5 mL. Laikoma -20 °C temperatūroje.

Poliakrilamidinis gelis:

Skiriamasis 12,5 % gelis (4,9 mL)		Koncentruojamasis 4 % gelis (2,5 mL)	
Distiliuotas H ₂ O	1,585 mL	Distiliuotas H ₂ O	1,5 mL
1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	1,25 mL	0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)	625 μL
30 % AA/BAA	2 mL	30 % AA/BAA	335 μL

10 % NDS	50 µL	10 % NDS	25 µL
APS	25 µL	APS	12,5 µL
TEMED	2,5 µL	TEMED	2,5 µL

***TcHsp90N* gryninimui naudoti buferiniai tirpalai:**

Tirpalas	Sudėtis
Ardymo buferinis tirpalas	0,025 M HEPES 0,2 M NaCl 0,07 M imidazolo 3 % glicerolio 0,002 M 2-merkaptioetanolio 1 % (w/v) Triton X-100 1mM PMSF pH 7,5
Afininės chromatografijos buferinis tirpalas I	0,025 M HEPES 0,2 M NaCl 0,07 M imidazolo 3 % glicerolio 0,002 M 2-merkaptioetanolio pH 7,5
Afininės chromatografijos buferinis tirpalas II	0,025 M HEPES 0,2 M NaCl 0,4 M imidazolo 3 % glicerolio 0,002 M 2-merkaptioetanolio pH 7,5
Jonų mainų chromatografijos buferinis tirpalas I	0,02 M HEPES 0,002 M 2-merkaptioetanolio 3 % glicerolio pH 7
Jonų mainų chromatografijos buferinis tirpalas II	0,02 M HEPES 1 M NaCl 0,002 M 2-merkaptioetanolio 3 % glicerolio pH 7
Saugojimo buferinis tirpalas	0,05 M HEPES 0,1 M NaCl pH 7,5

Kristalinimo buferinis tirpalas: 0,05 M HEPES, 0,1 M NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5.

Baltymų kristalinimo tirpalų rinkinys: „Morpheus“ – pagamintas VU Biotechnologijos instituto Baltymų ir nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje pagal Gorrec, 2009 protokolą.

2.1.4 Bakterijų kamienai, vektorius ir pradmenys

Kamienai:

- **DNR padauginimo kamienas:** Rekombinantinės DNR padauginimui naudotas *E. coli* XLI–blue kamienas. Jis neturi atsparumo antibiotikams, endonukleazių ir neatlieka rekombinacijos („Novagen“);

- **Baltymų raiškos kamienas:** BL21 (DE3) – IPTG indukuojamas kamienas, turintis T7 RNR polimerazę, neturi atsparumo antibiotikams („Novagen“).

Vektorius: pET 15b („Novagen“). Tai vektorius, turintis atsparumo ampicilinui geną, T7 promotorių, šešių histidinių seką, yra indukuojamas IPTG.

DNR: *T. cruzi* DNR gauta iš prof. D. Picard laboratorijos (Ženeva, Šveicarija).

Pradmenys:

Pavadinimas	Seka (5'→3' kryptimi)	Komentaras
T7–Prom	TAATACGACTCACTATAGGG	Tiesioginis pradmuo konstrukto sekvenavimui
T7–Term	GGGGTTATGCTAGTTATTGC	Atvirkštinis pradmuo konstrukto sekvenavimui
Hsp90NMut_F	GAATGGGAAGAATTAAATTA ACTCGAGGATCCGGCTGC	Tiesioginis pradmuo stabilizuojančios sekos įterpimui PGR metodu
Hsp90NMut_R	ATGTTCAACACCCCAACCCTT CTCCACCATCAGCTCAATGTC	Atvirkštinis pradmuo stabilizuojančios sekos įterpimui PGR metodu
Hsp90N-Prom	GATCGCCCATATGGATTACAA AGATGAT	Tiesioginis pradmuo Hsp90N sekų padauginimui PGR metodu
TcHsp90N-Term	CCTCCTCGAGTTACGTGCCAG CC	Atvirkštinis pradmuo TcHsp90N sekos padauginimui PGR metodu

2.2 Metodai

2.2.1 Genetinio konstrukto, koduojančio TcHsp90N, kūrimas

TcHsp90N koduojanti DNR klonuojama į pET15b vektorių naudojant pradmenis, įvedančius restrikcijos endonukleazių XhoI ir NdeI atpažinimo sekas. DNR seka padauginama PGR metodu, reakcijos mišinį sudaro: 1x „Phusion“ polimerazės HF buferis, 0,2 mM dNTP,

po 0,5 μ M tiesioginio ir atvirkštinio pradmens (žr. 2.1.4.), 1 fermento aktyvumo vienetas Phusion Hot Start II DNR polimerazės, 2,5 ng matricinės DNR ir vandens iki galutinio 50 μ L tūrio. Taikomos PGR sąlygos: 1) pradinis kaitinimas 98 °C 5 min, 2) kaitinimas 98 °C 15 s, 3) pradmens prilydymas 61 °C 2 min, 4) sintezė 72 °C 1 min, 5) sintezės pabaiga 72 °C 10 min; 2-4 žingsniai kartojami 30 kartų. PGR rezultatas analizuojamas pasitelkiant DNR elektroforezę agarozės gelyje (žr. 2.2.3.). Toliau vykdomas fragmento išskyrimas iš PGR mišinio (žr. 2.2.4.), matuojama DNR koncentracija („NanoDrop“ spektrofotometru, ties $\lambda=260$ nm). Gautas PGR produktas ir pET15b vektorius yra kerpami FD NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis (žr. 2.2.5.). Po restrikcijos reakcijos vektorius yra defosforilinamas tam, kad nesudarytų žiedinės struktūros. Tam yra naudojama šarminė fosfatazė, pašalinanti fosfato grupę nuo 5' galo. Reakcija vykdoma į restrikcijos mišinį pridėjus 1 fermentinio aktyvumo vienetą šarminės fosfatazės FastAP ir reikiamą kiekį 10x FastAP buferio. Reakcija vykdoma 15 min 37 °C temperatūroje. Inaktyvacija vykdoma 15 min 80 °C temperatūroje. Po defosforilinimo vykdoma elektroforezė (žr. 2.2.3.) – į gelį suleidžiami vektoriaus ir PGR produkto mėginiai. Tolesni žingsniai – fragmentų gryninimas iš gelio (žr. 2.2.4.) ir koncentracijos matavimas. Kitas klonavimo etapas – baltymą koduojančios DNR ir raiškos vektoriaus ligavimas (žr. 2.2.6.). Gautas genetinis konstruktas transformuojamas į *E. coli* XLI-blue kamieną (žr. 2.2.7.). Toliau vykdomas DNR skyrimas iš užaugusių bakterijų (žr. 2.2.4.). Išskirtos plazmidės karpomos klonavimo metu naudotomis NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis (žr. 2.2.5.). Restrikcijos produktai analizuojami agarozės gelyje (žr. 2.2.3.), matuojama DNR koncentracija ir vykdomas sekvenavimas VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre.

2.2.2 Genetinio konstrukto, koduojančio TcHsp90N, modifikacija

Buvo atlikta gauto genetinio konstrukto modifikacija, įterpiant DNR, koduojančią baltymą stabilizuojančią seką. Mutageninės PGR mišinio sudėtis: 1x „Phusion“ polimerazės HF buferis, 0,2 mM dNTP, po 0,5 μ M tiesioginio ir atvirkštinio pradmens (žr. 2.1.4.), 1 fermento aktyvumo vienetas Phusion Hot Start II DNR polimerazės, 8 ng matricinės DNR ir vandens iki galutinio 50 μ L tūrio. Taikomos PGR sąlygos: 1) pradinis kaitinimas 98 °C 5 min, 2) kaitinimas 98 °C 15 s, 3) pradmens prilydymas 70 °C 2 min, 4) sintezė 72 °C 4 min, 5) sintezės pabaiga 72 °C 10 min; 2-4 žingsniai kartojami 25 kartus. Rezultatas analizuojamas vykdant elektroforezę agarozės gelyje (žr. 2.2.3.), atliekamas DNR skyrimas (žr. 2.2.4.) ir matuojama koncentracija. PGR metu naudoti pradmenys nebuvo fosforilinti 5' gale, tad gauti linijiniai DNR fragmentai taip pat nėra 5' gale fosforilinti. Dėl šios priežasties, prieš liguojant reikalingas galų fosforilinimas. Reakcijos mišinį sudaro: 100 ng DNR, 1x buferis A PNK,

1 mM ATP, 2 fermento aktyvumo vienetai T4 polinukleotidų kinazės, vanduo iki galutinio 20 µL tūrio. Reakcija vykdoma 37 °C 30 min, po to atliekama inaktyvacija 75 °C 10 min. Tuomet vykdoma ligavimo reakcija: į fosforilinio mišinį pridedama 1x Rapid ligation buferio ir 5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės. Reakcija vykdoma 25 °C 10 min. Toliau vykdoma ląstelių transformacija (žr. 2.2.7.), DNR skyrimas (žr. 2.2.4.), restrikcija (žr. 2.2.5.) ir fragmentų analizė elektroforezės gelyje (žr. 2.2.3.). Išmatuojama DNR koncentracija ir vykdomas sekvenavimas VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre.

2.2.3 DNR elektroforezė

DNR mėginiai analizuojami 1,5 % agarozės gelyje. Gelis paruošiamas 0,45 g sausos agarozės ištirpinant 30 mL 1x TAE buferio. Atvėsinus, įpilama 0,5 µg/mL etidžio bromido. Gelis liejamas į formelę su šukutėmis ir stingsta 25 min. Į šulinėlius įnešamas DNR dydžio žymuo #SM 0331 ir mėginiai, nudažyti 6x DNR mėginių dažu. Elektroforezė vykdoma naudojant 1x TAE buferį su 0,25 µg/mL etidžio bromido, 6 V/cm² įtampoje. Gelis analizuojamas UV šviesoje.

2.2.4 DNR skyrimas

DNR skyrimas iš PGR mišinio: įvykus sėkmingai PGR, t.y., kai apšvietus UV šviesa yra matomas reikiamo dydžio DNR fragmentas, DNR iš mišinio yra gryninama rinkiniu „GeneJET™ PCR Purification Kit“. Gryninimo žingsniai atliekami pagal gamintojo nurodytą instrukciją.

DNR skyrimas iš agarozės gelio: jei apšvietus gelį UV šviesa be tikslios DNR yra matomi ir papildomi, nespecifiniai fragmentai, arba kai siekiama išskirti kelis skirtingus fragmentus, reikiamas mėginys yra išpjaunamas iš gelio steriliu skalpeliu ir gryninamas „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ pagal gamintojo nurodytą instrukciją.

DNR skyrimas iš bakterijų: užaugusios ląstelės centrifuguojamos 6000 aps./min greičiu 2 min kambario temperatūroje. DNR iš bakterijų yra skiriama rinkiniu „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“, laikantis gamintojo nurodymų.

2.2.5 Restrikcijos reakcija

Vektorius bei *TcHsp90N* koduojančio konstrukto kūrimui naudojamas PGR fragmentas yra kerpami FD NdeI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis. Fermentų atpažinimo sekos yra įterptos į vektorių ir PGR produktą. Reakcijos mišinys: 300 ng DNR, 1x FD Green buferio, 10 fermentinio aktyvumo vienetų XhoI, 10 fermentinio aktyvumo vienetų NdeI,

distiliuoto vandens iki 20 µl. Reakcija vykdoma 15 min 37 °C temperatūroje. Inaktyvacija vykdoma 15 min 80 °C temperatūroje.

2.2.6 Ligavimo reakcija

Prieš transformaciją į kompetentines ląsteles, vykdoma baltymą koduojančios sekos ir vektoriaus ligavimo reakcija. Reikalingas DNR kiekis paskaičiuojamas pagal formulę:

$$S \times \frac{\text{intarpo ilgis (kb)}}{\text{vektoriaus ilgis (kb)}} \times \text{vektoriaus kiekis (ng)} = \text{intarpo kiekis (ng)}$$

kur S – įterpiamos DNR ir vektoriaus moliarinis santykis (naudotas 3:1). Reakcijos mišinys: 100 ng pET15b vektoriaus, 40 ng *TcHsp90N* DNR, 1x Rapid ligation buferio, 5 fermento aktyvumo vienetai T4 DNR ligazės, 10 % PEG4000, distiliuoto vandens iki 20 µL. Reakcija vykdoma 15 min 25 °C temperatūroje.

2.2.7 Ląstelių transformacija ir auginimas

Konstruktas transformuojamas į DNR padauginimui skirtą *E. coli* kamieną XLI-blue arba raiškos kamieną BL21 (DE3). 50 µL kompetentinių ląstelių sumaišoma su 5 µL DNR. Mišinys 30 min laikomas ledo vonioje, tuomet 90 s laikomas 42 °C, tada vėl patalpinamas į ledą 2 min. Ištraukus iš ledo, įpilama 400 µL mitybinės SOC terpės ir ląstelės 45 min auginamos 37 °C temperatūroje, purtant 220 aps./min greičiu. Po 45 min ląstelės centrifuguojamos 2 min 6000 aps./min kambario temperatūroje. Nupilama perteklinė terpė ir resuspenduojama. Ląstelės užsėjamos Petri lėkštelėje su agarizuota LB terpe ir 100 µg/mL ampicilino (Amp), auginama 37 °C per naktį. Po transformacijos užaugusios kolonijos persėjamos į mėgintuvėlius su 5 mL LB terpės, turinčios 100 µg/mL Amp, auginama per naktį 37 °C temperatūroje, purtant 220 aps./min greičiu.

2.2.8 Biomasės auginimas ir *TcHsp90N* raiška

Genetinis konstruktas, koduojantis *TcHsp90N*, yra transformuojamas į *E. coli* raiškos kamieną BL21 (DE3) (žr. 2.2.7.). Po transformacijos po vieną užaugusią koloniją užsėjama į BHI terpę su pET15b vektoriui atrankiu antibiotiku (100 µg/mL Amp). Auginama per naktį 37 °C temperatūroje, purtant 220 aps./min greičiu. Po 8 mL užaugusių bakterijų persėjama į kolbas su 400 mL BHI terpės su Amp (100 µg/mL). Auginama, kol optinis tankis (OT) pasiekia 0,6 ($\lambda=600$). Vykdoma indukcija 1 mM IPTG 4 val. 30 °C. Užauginta biomasė centrifuguojama 20 min 4 °C 6000 aps./min greičiu. Iki gryninimo laikoma -20 °C. Mėginiai,

paimti prieš ir po indukcijos, centrifuguojami 2 min 6000 aps./min greičiu, nuosėdos suspenduojamos 30 μL 1x baltymų mėginių dažo, pakaitinama 95 °C 5 min. Imama 300 μL mėginio prieš indukciją, o mėginio kiekis, imamas po indukcijos, apskaičiuojamas taip, kad prieš ir po indukcijos paimtuose mėginiuose būtų toks pat ląstelių kiekis. Vykdoma poliakrilamidinio gelio elektroforezė (NDS-PAGE) (žr. 2.2.9.).

2.2.9 Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Du stikliukai sudedami lygiagrečiai ir įstatomi į stovelį, paruošiamas poliakrilamidinis gelis (žr. 2.1.3.). Supilamas skiriamasis gelis, ant viršaus užpilama distiliuoto vandens ir paliekama stingti 30 min. Geliui sustingus, vanduo nupilamas, užpilamas koncentruojamasis gelis, įstatomos šukutės ir paliekama stingti 30 min. Sumontuojamas elektroforezės aparatas, įstatomas gelis, užpilama 400 mL 1x elektroforezės buferinio tirpalo, ištraukiamos šukutės, į šulinėlius supilami mėginiai ir 1 val. vykdoma elektroforezė, esant 15 V/cm įtampai koncentruojamajame gelyje ir 25 V/cm įtampai skiriamajame gelyje. Po elektroforezės gelis išimamas ir dažomas poliakrilamidinio gelio dažu (žr. 2.1.3.), inkubuojant kambario temperatūroje 70 aps./min greičiu 20 minučių, tuomet blukinamas verdant distiliuotame vandenyje 10 min.

2.2.10 *TcHsp90N* tirpumo tikrinimas ir gryninimas

1 g biomasės homogenizuojamas, 1 val. maišoma šaltame ardymo buferiniame tirpale (visų buferinių tirpalų sudėtys pateiktos 2.1.3.). Ląstelių sienelės ardamos ultragarsiniu dezintegratoriumi 10 min, 30 s / 30 s ciklais, esant 20 % amplitudei. Ląstelės, norint išvengti perkaitimo, laikomos lede. Suardytos bakterijos centrifuguojamos 30 min 4 °C 16000 aps./min greičiu. Supernatantas 1 val. maišomas su Ni^{2+} jonais pakrauta chelatine IDA sefaroze 4 °C, o nuosėdos 1 val. tirpinamos 8 M karbamido tirpale kambario temperatūroje. Sorbentas su supernatanto baltymais pakraunamas į gravitacinę kolonėlę, visi netiksliniai baltymai, nesudarę ryšių su Ni^{2+} , išteka. Kolonėlė plaunama afininės chromatografijos buferiniu tirpalu I tol, kol nebeišteka baltymai (ištiriama Bradfordo metodu (Bradford, 1976)). Tikslinis baltymas eliuojamas didinant imidazolo koncentraciją (inkubuojant ir maišant sorbentą afininės chromatografijos buferiniame tirpale II 10 min 4 °C). Matuojama visų eliuojamųjų frakcijų koncentracija, ruošiami mėginiai elektroforezei: po 20 μL kiekvienos frakcijos sumaišoma su 4 μL 6x baltymų mėginių dažo ir 5 minutes kaitinama 95 °C. Į elektroforezės gelį užnešami mėginių tūriai, atsižvelgiant į gautą baltymų koncentraciją (galutinis kiekis – 10 μg). Vykdoma NDS-PAGE (žr. 2.2.9.) ir įvertinamas tikslinio baltymo

pasiskirstymas supernatante ir nuosėdose bei grynumas frakcijose. Remiantis elektroforezės gelio vaizdu, atrenkamos frakcijos, kuriose baltymas atrodo gryniausias ir jo koncentracija didžiausia. Šios frakcijos apjungiamos ir per pusiau pralaidžią membraną dializuojamos per naktį saugojimo buferiniame tirpale su 1 mM EDTA ir 2 val. saugojimo buferiniame tirpale.

Nustačius, kad gautas rekombinantinis baltymas yra tirpus ir gryninimas imobilizuotų metalų jonų afininės chromatografijos (IMAC) būdu yra sėkmingas, gryninima iš didesnio kiekio (~10 g) biomasės. Šiam tikslui naudojama „ÄKTA purifier“ gryninimo sistema. Biomasė homogenizuojama kaip aprašyta anksčiau. Ląstelių sienelės ardamos ultragarsu 13 min, esant 50 % amplitudei su 30 s / 30 s intervalais. Suardytos bakterijos centrifuguojamos 30 min 4 °C 16000 aps./min greičiu. Gautas supernatantas filtruojamas per 0,2 µm PVDF filtrą. Baltymo tirpalas leidžiamas per kolonėlę, užpildytą 10 mL chelatinės IDA sefarozės su Co²⁺ jonais, užtikrinančiais didesnę metodo jautrumą nei prieš tai naudoti Ni²⁺ jonai. Prieš leidžiant baltymą kolonėlė pusiausvyrinama plaunant 10 tūrių afininės chromatografijos buferinio tirpalo I. Netiksliniai baltymai eliuojami tuo pačiu buferiniu tirpalu. Tikslinis baltymas eliuojamas afininės chromatografijos buferinių tirpalų I/II gradientu, didinant imidazolo koncentraciją. Matuojama visų frakcijų koncentracija, vykdoma elektroforezė, mėginiai analizuojami gelyje.

Norint pasiekti kuo didesnę tikslinio baltymo grynumą, vykdomas antras gryninimas jonų mainų chromatografijos (IEXC) būdu. Šiam metodui kolonėlė užpildoma Q sefaroze. Prieš gryninimą baltymas dializuojamas jonų mainų chromatografijos buferiniame tirpale I. Prieš leidžiant baltymą kolonėlė pusiausvyrinama plaunant 10 tūrių jonų mainų chromatografijos buferiniu tirpalu I. Netiksliniai baltymai eliuojami tuo pačiu buferiniu tirpalu I. Iš kolonėlės tikslinis baltymas eliuojamas didinant joninę jėgą (I/II buferinių tirpalų gradientu). Surenkami mėginiai ir vykdoma baltymų elektroforezė (žr. 2.2.9.). Apjungiamos parinktos frakcijos ir vykdoma dializė saugojimo buferiniame tirpale, matuojama koncentracija, baltymas steriliai filtruojamas per 0,2 µM PVDF filtrą, laikoma -80 °C.

2.2.11 Fluorescencinis terminio poslinkio tyrimas

Fluorescencinis terminio poslinkio metodas (FTSA) yra skirtas baltymų stabilumui tirti. Solvatochrominis dažas ANS (8-anilinonaftalen-1-sulfoninė rūgštis) fluorescuoja sąveikoje su denatūravusiais hidrofobiniais baltymo regionais. Pagal fluorescencijos pokyčius stebimas nuo temperatūros priklausomas baltymo denatūravimas. FTSA metodu galima nustatyti baltymo lydymosi temperatūrą, jos pokytį skirtingose sąlygose, įvertinti rišimosi su skirtingais junginiais stiprumą. Saugojimo buferiniame tirpale paruošiamas baltymo tirpalas

su 20 μM TcHsp90 ir 200 μM ANS dažo. Eksperimente naudojami slopikliai yra ištirpinami DMSO, gaunamas 20 mM tirpalas. Tuomet vykdomi serijiniai skiedimai: į mėgintuvėlius, kuriuose yra po 20 μL DMSO (išskyrus pirmą mėgintuvėlį, kuriame paliekamas neskiestas slopiklio tirpalas), paeiliui (iš pirmo į antrą, iš antro į trečią ir t.t. iki aštunto mėgintuvėlio) perkeliama po 20 μL ligando tirpalo (prieš tai gerai išmaišius). Taigi, kiekviename mėgintuvėlyje ligandas praskiedžiamas dvigubai. Toliau kiekvieno mėgintuvėlio turinys skiedžiamas 1:50 (po 4 μL tirpalo perkeliant į 196 μL saugojimo buferinio tirpalo). PGR mėgintuvėliuose baltymo ir skirtingų koncentracijų ligandų tirpalai sumaišomi santykiu 1:1, taigi, galutinė baltymo koncentracija tirpale yra 10 μM , DMSO – 2 %, o ligandų koncentracijos nurodytos 1 lentelėje. Kaip kontrolė naudojamas baltymo mėginys be ligando (9-tasis mėgintuvėlis), eksperimentas kartojamas tris kartus.

1 lentelė. Naudotos Hsp90 slopiklių koncentracijos.

Mėgintuvėlis	1	2	3	4	5	6	7	8
Konc. (μM)	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56

Paruošti mėginiai dedami į rotorių ir perkeliama į spektrofluorimetą. Eksperimento metu temperatūra keliama 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ greičiu, nuo 25 $^{\circ}\text{C}$ iki 80 $^{\circ}\text{C}$. Stebimi ANS dažo fluorescencijos pokyčiai. ANS fluorescencija sužadinama $\lambda = 365 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ šviesa ir registruojama $\lambda = 460 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$ emisija. Stebimi fluorescencijos pokyčiai, priklausomi nuo temperatūros. Gauti eksperimentiniai duomenys modeliuojami kaip aprašyta literatūroje (Matulis et al., 2005). Gautų lydymosi kreivių vidurio taškai atitinka baltymo lydymosi temperatūrą (T_m). Atlikus eksperimentus su skirtingomis ligandų koncentracijomis, priklausomai nuo sąveikos stiprumo, matomas baltymo T_m pokytis. Pagal slopiklių koncentracijos įtaką baltymo T_m , nustatomos jų jungimosi konstantų (K_b) vertės, taikant skaičiavimus, aprašytus Cimperman et al., 2008 ir Matulis et al., 2005.

2.2.12 Baltymų paruošimas kristalinimui

Kristalografiniams tyrimams naudoti VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje (BTI BVTS) išgryninti Hsp90N baltymai (gryninimo eksperimentus atlikau aš, A. Mickevičiūtė ir dokt. M. Gedgaudas). Mėginiai atšildomi ir centrifuguojami 14000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, siekiant išvengti didelių baltymų agregatų tirpale. Į baltymų mėginius pridedama 1 mM redukuojančio agento DTT (ditiotreitolo). Siekiant užtikrinti kristalizacijos procesui palankias sąlygas, baltymai koncentruojami naudojant 0,5 mL tūrio koncentratorius su 10 kDa filtru, centrifuguojant 14000 g 4 $^{\circ}\text{C}$

(centrifugavimo laikas nustatomas atsižvelgiant į pradinę mėginio koncentraciją). Baltymų koncentracija matuojama „NanoDrop“ spektrofotometru, ties $\lambda=280$ nm. Mėginių skiedimui ir kaip kontrolė koncentracijos matavime naudojamas kristalinimo buferinis tirpalas.

2.2.13 Baltymų kristalinimas

Baltymų kristalinimas vykdomas taikant garų difuzijos „sėdinčio lašo“ (angl. sitting drop) metodą. Šis metodas pagrįstas garų difuzijos pusiausvyra. Sumaišytas baltymo mėginio ir kristalinimo tirpalo lašas yra „pasodinamas“ šalia rezervuaro su kur kas didesniu kristalinimo tirpalo tūriu. Laše yra mažesnė kristalinimo reagento koncentracija, todėl vandens garai palieka lašą. Šio proceso metu keičiasi įsotinimas, laše didėja tiek baltymo, tiek kristalinimo reagento koncentracija. Pusiausvyra pasiekama, kai reagento koncentracija laše ir rezervuare susivienodina.

Baltymų kristalinimas atliekamas 96 šulinėlių lėkštelėse, kristalinimo tirpalo rezervuaro tūris yra 70 μL , lašų tūris – 0,6-1 μL . Mėginių užnešimas ant šalia rezervuaro esančio tiltelio atliekamas pasinaudojant kristalinimo robotu Oryx8, maišant baltymo mėginius su kristalinimo tirpalais santykiais: 1:1 ir 2:1. Lėkštelės saugomos robotizuotose lėkštelių talpyklose kambario arba 4 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, lašai periodiškai fotografuojami, naudojant monochromatinę arba UV šviesą.

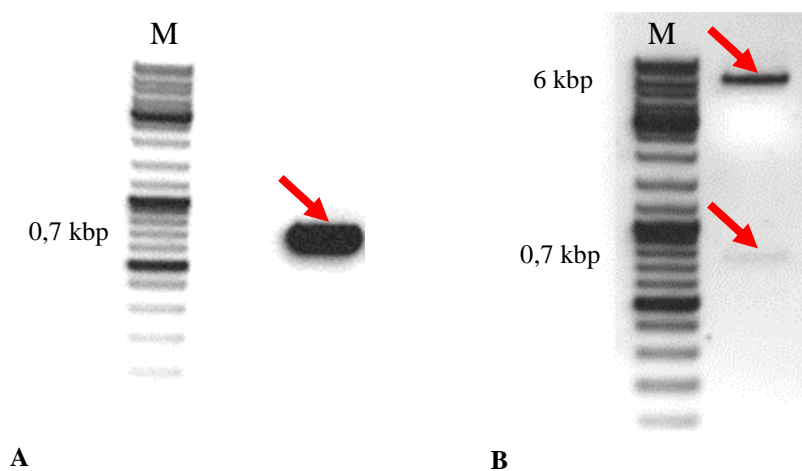
Siekiant gauti baltymų kristalus, pirmiausiai atliekama pirminė kristalizacijos sąlygų paieška – siekiama surasti tinkamą baltymo koncentraciją bei kristalinimo tirpalo sudėtį. Šiuo tikslu išbandoma keletas skirtingų komercinių kristalinimo sąlygų paieškos tirpalų rinkinių, taip pat „Morpheus“ rinkinys (žr. 2.1.2.). Po pirminės sąlygų paieškos, jei pavyksta gauti kristalinius darinius (tokius kaip mikrokristalai, adatos, netaisyklingos formos kristalai), vykdomas tolesnis proceso optimizavimas. Tai atliekama vykdant tirpalų, kuriuose gauti kristaliniai dariniai, sudėties variaciją, keičiant komponentus ir jų koncentraciją. Siekiant gauti baltymų su prisijungusiais slopikliais kristalus, vykdomas arba kokristalinimas (700 μM slopiklio tirpalą sumaišant su baltymo tirpalu dar prieš lašinant ant lėkštelės) arba susidariusių kristalų mirkymas slopiklio tirpale, tikintis, kad junginys difunduos į kristalo vidų. Vykdomi mirkymo eksperimentai, naudotos 467 μM ir 933 μM slopiklių koncentracijos (užpilant atitinkamai 700 μM ir 1,4 mM koncentracijos slopiklių tirpalus ant lašų su kristalais, taip pasiekiant 2:1 santykio skiedimą).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

BTI BVTS atliekami eksperimentai su skirtingų parazitinių organizmų Hsp90 šaperonais, siekiant surasti cheminius junginius, efektyviai slopinančius jų veikimą. Tiriama slopikliai jungiasi Hsp90 aktyviajame centre, esančiame N domene, todėl, vardan eksperimentų supaprastinimo, nutarta dirbti ne su pilno ilgio baltymais, o tik šiuo domenu. Darbo metu planuota atlikti kristalinimo eksperimentus su skyriuje išgrynintais ir tiriamais parazitinių organizmų ir žmogaus Hsp90N, siekiant gauti reikšmingos informacijos apie jų jungimąsi su slopikliais. Parazito *Trypanosoma cruzi* šaperonas taip pat yra dominantis tyrimų objektas, tačiau iki šiol stabilus, eksperimentams tinkamo baltymo laboratorijoje dar nepavyko gauti. Dėl šios priežasties, nutarta pagaminti *T. cruzi* Hsp90 N domeną (*TcHsp90N*) koduojantį genetinį konstruktą, atlikti raišką, baltymą išgryninti ir patikrinti jo stabilumą. Gautas baltymas kartu su kitais Hsp90N toliau būtų tiriamas termodinaminiais ir kristalografiniais metodais.

3.1 Genetinio konstrukto, koduojančio *TcHsp90N*, kūrimas

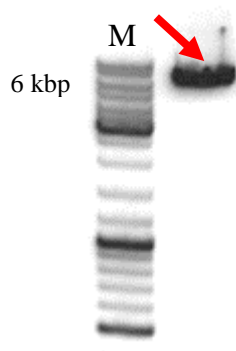
Pirmas darbo etapas buvo genetinio konstrukto, koduojančio *TcHsp90N*, N gale sulieto su šešių histidinių gryninimo seka, kūrimas. PGR būdu atliktas klonavimas nuo *TcHsp90* koduojančios DNR, konstrukto kūrimui naudotas pET15b vektorius. Po PGR gautas rezultatas analizuotas elektroforezės gelyje, tikintis pamatyti ~700 bp fragmentą (3 pav. A). Ar domeno seka į vektorių įsiterpė teisingai, tikrinta pasitelkiant restrikcinę analizę *NdeI* ir *XhoI* fermentais. Agarozės gelyje tikėtasi pamatyti iškirptą baltymą koduojančios DNR sekos fragmentą ties ~0,7 kbp ir pET vektoriaus seką ties ~6 kbp žyme (3 pav. B).



3 pav. Klonavimo rezultatų analizė 1,5 % agarozės gelyje. **A** – *TcHsp90N* sekos, padaugintos PGR būdu, vaizdas. **M** – DNR dydžio žymuo #SM 0331; Rodyklė – padauginta *TcHsp90N* koduojanti

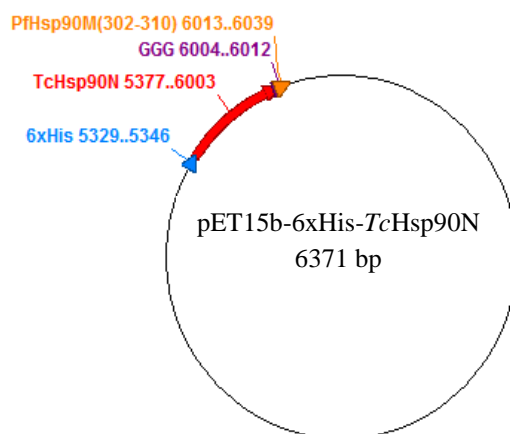
seka. **B** – Genetinio konstrukto karpymo restrikcijos endonukleazėmis XhoI ir NdeI vaizdas. **M** – DNR dydžio žymuo #SM 0331; Rodyklės – vektorius ties ~6 kbp ir *TcHsp90N* koduojanti seka ties ~0,7 kbp žyme.

Atsižvelgiant į ankstesnius nesėkmingus bandymus gauti *TcHsp90N*, sukurtą genetinį konstruklą nutarta modifikuoti, įterpiant papildomą seką Hsp90 N domeno C gale. BTI BVTS bei kitose mokslinėse grupėse (Corbett and Berger, 2010) atlikti eksperimentai parodė, kad rekombinantinių Hsp90N baltymų stabilumą galima pagerinti jų C gale įterpiant seką, sudarytą iš lankstaus trijų glicinų jungtuko (GGG) ir devynių aminorūgščių, adaptuotų iš kito pirmuonio *P. falciparum* Hsp90 (*PfHsp90*) vidurio domeno. Šios aminorūgštys suformuoja β klostę, kurios sąveika su natyvaus N domeno struktūroje esančia β klaste gali prisidėti prie teisingo baltymo susilankstymo. Seka, koduojanti glicinus bei 302-310 aminorūgštis iš *PfHsp90* įterpta pasitelkiant PGR. Mutagenizės rezultatai analizuoti agarozės gelyje, stebimas fragmentas ties ~6 kbp žyme (4 pav.). Gautas konstruktas nusekvenuotas.



4 pav. Mutageninės PGR rezultato analizė 1,5 % agarozės gelyje. Matomas PGR, skirtos įvesti mutaciją, produkto vaizdas. **M** – DNR dydžio žymuo (#SM 0331); rodyklė – mutaciją turintis genetinis konstruktas.

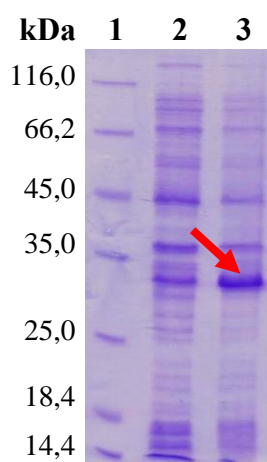
Darbo metu buvo sukurtas genetinis konstruktas pET15b-6xHis-*TcHsp90*, koduojantis *TcHsp90N* seką nuo 1 iki 209 aminorūgšties, kurios C gale yra prijungtas trijų glicinų jungtukas ir dalis *PfHsp90* vidurio domeno sekos, o N gale – šešių histidinių gryninimo žymė (5 pav.).



5 pav. Genetinio raiškos konstrukto pET15b-6xHis-*TcHsp90N* schematinis vaizdas. *TcHsp90N* – tikslinis baltymas; 6xHis – šešių histidinių gryninimo seka; GGG – trijų glicinų jungtukas; *PfHsp90M*(302-310) – modifikacija, adaptuota iš *P. falciparum*.

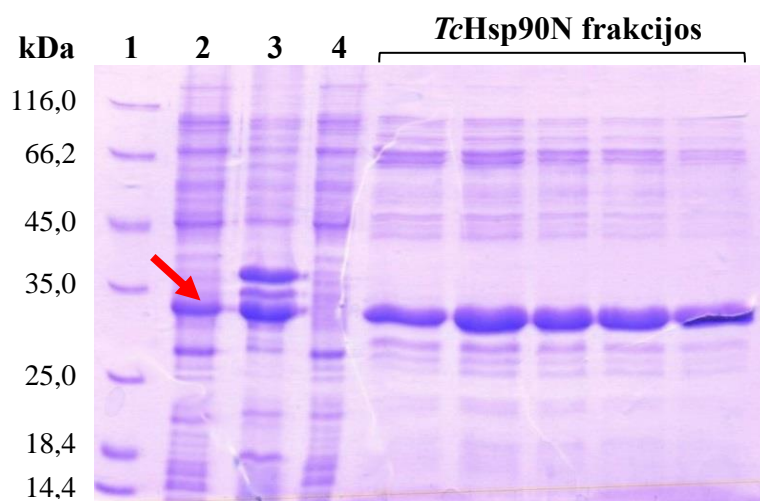
3.2 Rekombinantinio *TcHsp90N* gavimas

Sukurtas genetinis konstruktas transformuotas į *E. coli* raiškos kamieną BL21 (DE3), vykdyta indukcija IPTG ir genų raiška įvertinta poliakrilamidiniame gelyje (6 pav.). Juostelė ties ~27 kDa nurodo tikslinio baltymo raiškos padidėjimą po indukcijos IPTG.



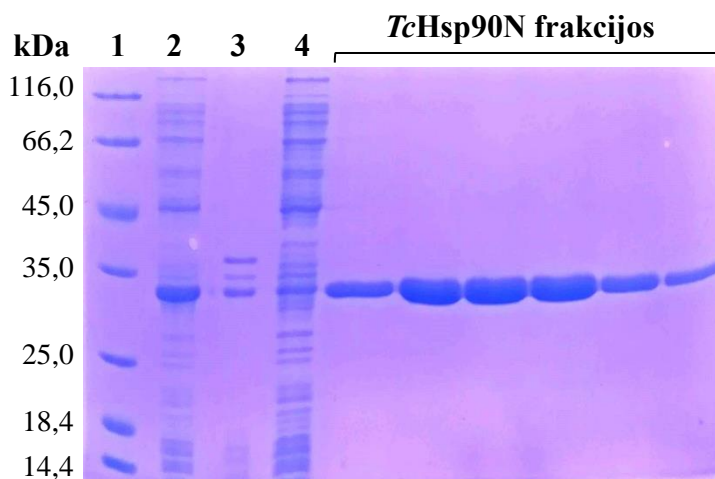
6 pav. pET15b-6xHis-*TcHsp90N* raiška *E. coli* BL21 (DE3) kamiene. 1 – baltymų dydžio žymuo #SM0431; 2 – ląstelės baltymų raiška prieš indukciją IPTG; 3 – ląstelės baltymų raiška po indukcijos IPTG. Rodyklė – padidėjusi *TcHsp90N* raiška.

Po raiškos tyrimo tikrintas baltymo tirpumas ir atliktas gryninimas gravitacinėje kolonėlėje, užpildytoje IDA sefaroze su imobilizuotais Ni^{2+} jonais. Atlikta baltymų NDS-PAGE elektroforezė, iš kurios rezultatų matoma, kad *TcHsp90N* yra tirpus, tačiau nemaža baltymo dalis lieka nuosėdose (7 pav.). Visgi, atlikus tirpios frakcijos gryninimą imobilizuotų metalų jonų chromatografijos būdu, įvertinta, kad gaunamas pakankamas kiekis tikslinio baltymo (7 pav.).



7 pav. *TcHsp90N* tirpumo nustatymas ir bandomasis gryninimas imobilizuotų metalo jonų afininės chromatografijos būdu. *TcHsp90N* frakcijos gautos po eliucijos imidazolo gradientu. 1 – baltymų dydžio žymuo #SM0431; 2 – ląstelių lizato supernatanto baltymai; 3 – ląstelių lizato netirpūs baltymai nuosėdose; 4 – nesorbuoti baltymai; rodyklė – *TcHsp90N* tirpioje baltymų frakcijoje.

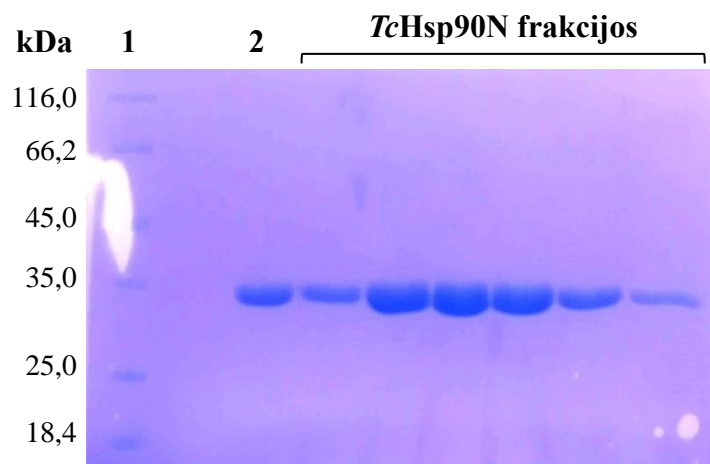
Nuspręsta *TcHsp90N* išgryninti iš didesnio kiekio (9 g) biomasės, kad būtų gauta pakankamai tikslinio baltymo tolesniems eksperimentams. Atliekant optimalių gryninimo sąlygų paiešką, pastebėta, kad prieš tai naudotus Ni^{2+} jonus pakeitus Co^{2+} jonais, bei į gryninimo buferinį tirpalą pridėjus glicerolio ir redukuojančios medžiagos 2-merkaptoetanolio, pasiekiamas didesnis baltymo grynumas. Remiantis chromatograma, nustatytos desorbuoto baltymo frakcijos, toliau jos analizuotos poliakrilamidiniame gelyje NDS-PAGE metodu (8 pav.).



8 pav. *TcHsp90N* gryninimo imobilizuotų metalų jonų afininės chromatografijos būdu rezultatų analizė poliakrilamidiniame gelyje. *TcHsp90N* frakcijos gautos po eliucijos imidazolo gradientu. 1 – baltymų dydžio žymuo #SM0431; 2 – ląstelių lizato supernatanto baltymai; 3 – ląstelių lizato netirpūs baltymai nuosėdose; 4 – nesorbuoti baltymai.

Atrinktos tikslinio baltymo frakcijos apjungtos, dializuotos jonų mainų chromatografijos buferiniame tirpale I ir toliau grynintos jonų mainų chromatografijos būdu,

naudojant Q sefarozę siekiant pašalinti likusius netikslinius baltymus ir *TcHsp90N* sukonzentruoti. Rezultatas analizuotas NDS-PAGE metodu (9 pav.).

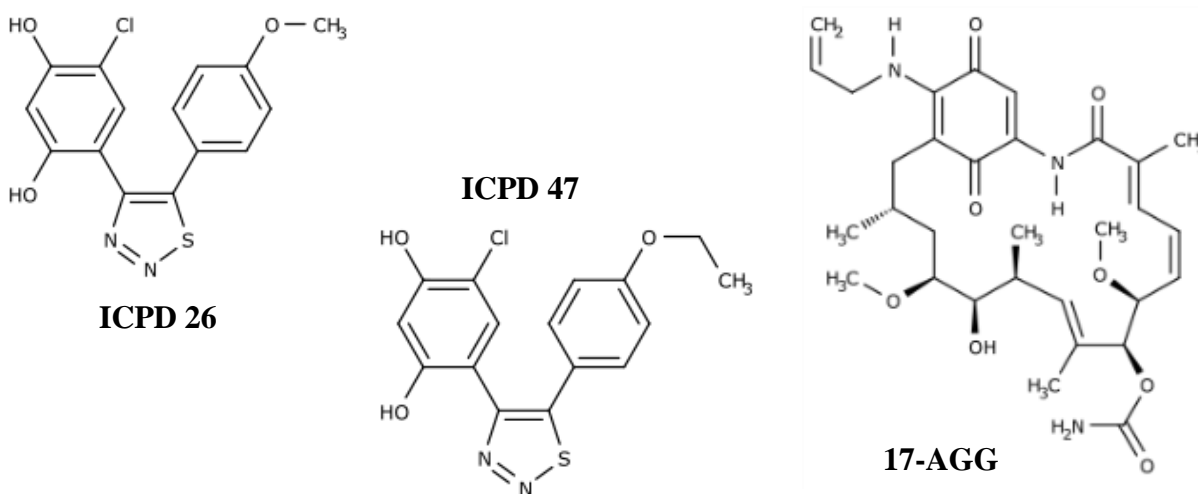


9 pav. *TcHsp90N* gryninimo jonų mainų chromatografijos būdu rezultatų analizė poliakrilamidiniame gelyje. *TcHsp90N* frakcijos gautos po elucijos NaCl gradientu. 1 – baltymų dydžio žymuo #SM0431; 2 – baltymo mėginys iki gryninimo.

Atrinktos frakcijos su aukščiausia *TcHsp90N* koncentracija apjungtos ir dializuotos saugojimo buferiniame tirpale. Iš 9 g biomasės gauta 5,8 mg rekombinantinio baltymo.

3.3 Rekombinantinio *TcHsp90N* jungimosi su slopikliais tyrimas

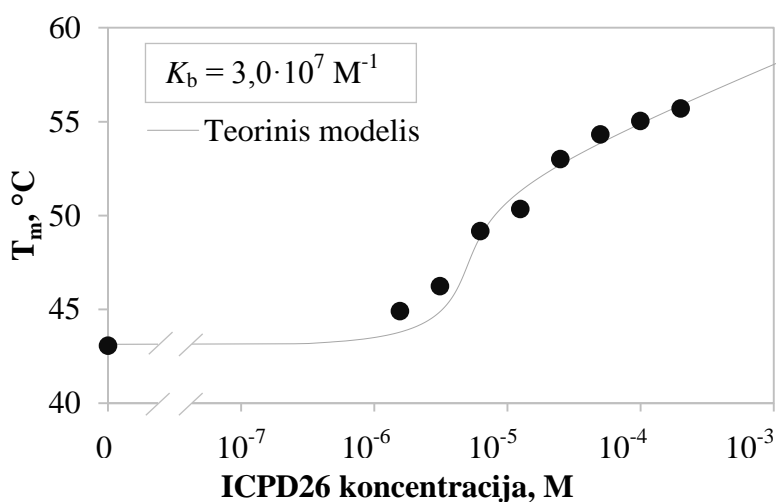
Fluorescencinis terminio poslinkio metodas (FTSA) leidžia įvertinti baltymo stabilumą ir tirti jungimąsi su slopikliais. Eksperimentams naudoti trys junginiai, sąveikaujantys su Hsp90 N domenu – VU BTI susintetinti tiadiazolo dariniai ICPD26 ir ICPD47 bei komerciškai prieinamas geldanamicino darinys 17-AAG (10 pav.).



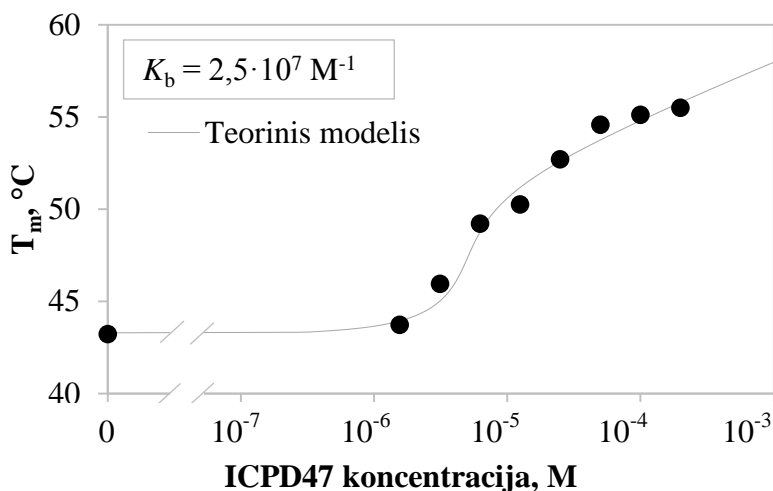
10 pav. Slopiklių ICPD26, ICPD47 ir 17-AAG struktūrinės formulės.

Taikant FTSA yra stebimas nuo temperatūros priklausomas baltymo denatūravimas. Detekcijai naudojamas ANS dažas fluorescuoja sąveikoje su hidrofobiniais paviršiais.

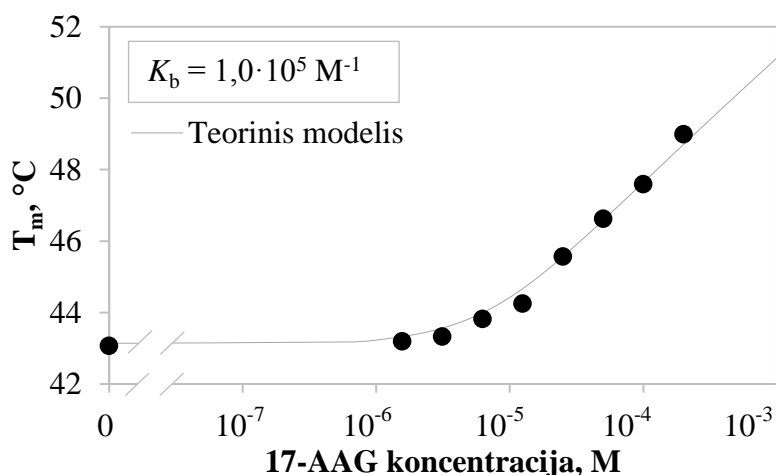
Palapsniui kylant temperatūrai, baltymo grandinės išsivynioja ir įprastai viduje esančios hidrofobinės sritys atsiduria išorėje. Prie tokių denatūravusių grandinių prisijungęs ANS fluorescuoja, ir pagal registruojamą šviesos emisijos intensyvumą gaunama baltymo lydymosi kreivė. Šios kreivės vidurio taškas atitinka temperatūrą, kurioje pusė baltymo yra denatūravęs (lydymosi temperatūrą, T_m). Buvo stebimas $TcHsp90N$ jungimasis su slopikliais ICPD26, ICPD47 ir 17-AAG. Atlikus eksperimentus su skirtingomis junginių koncentracijomis, matomas T_m poslinkis, t.y., dėl sąveikos su slopikliais, baltymas buvo stabilizuojamas ir denatūravo aukštesnėje temperatūroje (11-13 pav.). Sumodeliavus T_m priklausomybę nuo pridėto slopiklio koncentracijos, kiekvienam junginiui buvo nustatytos jungimosi konstantos (K_b) vertės. Visiems tirtiems junginiams yra būdingas stiprus rišimasis su $TcHsp90N$, ir gauti rezultatai rodo, kad rekombinantinis baltymas yra stabilus ir geras modelis tolesniems slopiklių sąveikos eksperimentams.



11 pav. $TcHsp90$ lydymosi temperatūros (T_m) priklausomybė nuo slopiklio ICPD26 koncentracijos. K_b – jungimosi konstanta.



12 pav.1 $TcHsp90$ lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slopiklio ICPD47 koncentracijos. K_b – jungimosi konstanta.



13 pav. *TcHsp90* lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slopiklio 17-AAG koncentracijos. K_b – jungimosi konstanta.

3.4 Parazitinių organizmų ir žmogaus Hsp90N kristalinimas

VU BTI BVTS yra išgryninti ir termodinaminiais metodais tiriami rekombinantiniai įvairių organizmų Hsp90N (2 lentelė). Visų šių baltymų ir jų kompleksų su tiriamais cheminiais junginiais struktūriniai duomenys pasitarnautų atrankių slopiklių kūrimui. Dėl to nutarta atlikti jų kristalinimo sąlygų paiešką ir, gavus kristalus, panaudoti juos rentgenostruktūrinėje analizėje bei, sėkmės atveju, struktūros nustatymui. Be parazitinių organizmų šaperonų, tirtas ir citozolinis žmogaus Hsp90 α . Šio baltymo su prisijungusiais potencialiais antiparazitiniais slopikliais struktūra pasitarnautų kaip kontrolė, stebint sąveikos skirtumus ir siekiant gerinti tiriamų junginių afiniškumą ir atrankumą parazitiniams baltymams.

2 lentelė. Tyrime naudoti Hsp90 baltymai.

Organizmas	Baltymas
<i>Leishmania major</i>	<i>LmHsp90N</i>
<i>Leishmania donovani</i>	<i>LdHsp90N</i>
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>PfHsp90N</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>TgHsp90N</i>
<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>TbHsp90N</i>
<i>Trichinella spiralis</i>	<i>TsHsp90N</i>
<i>Homo sapiens</i>	Hsp90 α N

Galimiems kristalinimo sąlygų dėšningumams surasti atlikta literatūros bei PDB duomenų bazės (<https://www.rcsb.org/>) analizė. Dalies baltymų (*LdHsp90N*, *TgHsp90N*, *TsHsp90N*) kristalai iki šiol dar nėra gauti jokioje laboratorijoje, o kai kurių esamų struktūrų publikacijos dar nėra išspausdintos. Visgi, remiantis ribota informacija apie *LmHsp90N*, *TbHsp90N* bei *Hsp90αN* kristalinimą (Casale et al., 2014; Pizarro et al., 2013; Tassone et al., 2018), nustatytos procesui galimai palankios baltymų koncentracijos ir pirmiausiai parinkti kristalinimo rinkiniai su tirpalų sudėtimis, artimomis literatūros šaltiniuose nurodytoms. Kristalinimo eksperimentai buvo atliekami BTI Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje (BNRSTS), taikant garų difuzijos „sėdinčio lašo“ metodą. Pirmiausia buvo išbandyti literatūrinės analizės metu atrinkti rinkiniai, o vėliau naudoti kiti, ankstesniuose eksperimentuose sėkmingi, rinkiniai. Jei buvo stebimas kristalinių darinių susidarymas, buvo atliekama šių palankių sąlygų optimizacija, varijuojant tirpalų sudedamųjų dalių (nusodinančios medžiagos, druskų, metalų jonų, įvairių organinių ir neorganinių junginių) koncentraciją, taip pat keistas baltymo ir kristalinimo tirpalo santykis laše (3:1, 2:1 ir 1:1). Kristalizacija vykdyta skirtingose temperatūrose (kambario bei 4 °C). Darbo metu kiekvieno baltymo kristalizacijai buvo išbandyta nuo kelių šimtų iki kelių tūkstančių sąlygų (3 lentelė).

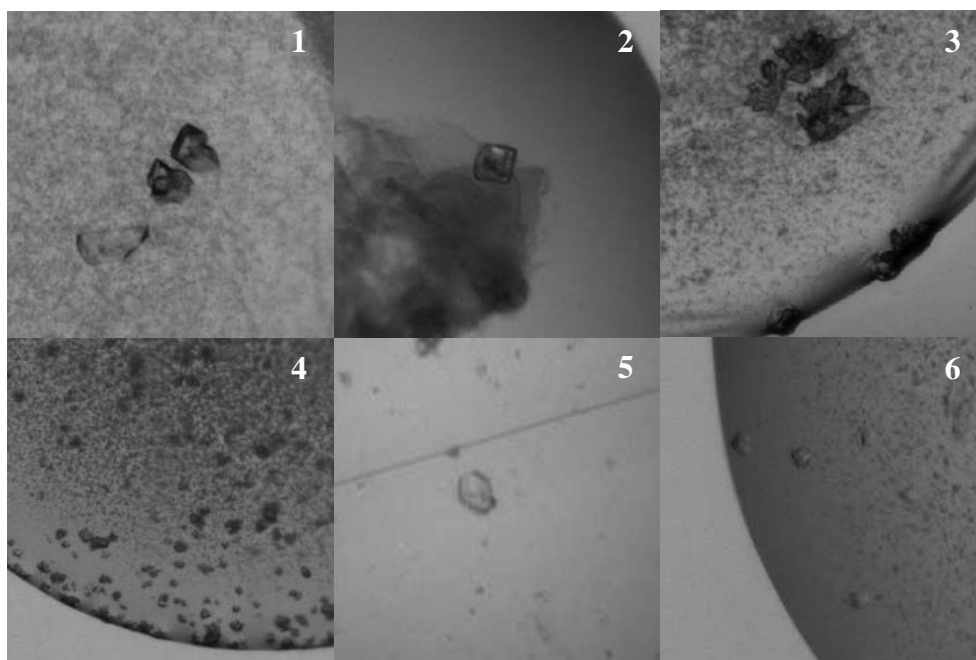
3 lentelė. Hsp90 kristalinimo sąlygų paieška.

Baltymas	Pirminė sąlygų paieška		Optimizavimas		Iš viso sąlygų
	Rinkiniai	Sąlygų sk.	Rinkinių sk.	Sąlygų sk.	
<i>LmHsp90N</i>		864	2	1008	1872
<i>LdHsp90N</i>		576	0	0	576
<i>PfHsp90N</i>	„Crystal Screen“, „Index“, „Natrix“	1344	4	1536	2880
<i>TgHsp90N</i>	„SaltRx“, „PEGRx“	1344	0	0	1344
<i>TbHsp90N</i>	„Morpheus“	2400	4	2304	4704
<i>TsHsp90N</i>		1536	3	2112	3646
<i>Hsp90αN</i>		960	2	864	1824

3.4.1 *LmHsp90N* kristalinimas

LmHsp90N buvo kristalintas garų difuzijos „sėdinčio lašo“ metodu. Remiantis sėkmingais kitų mokslinių grupių Hsp90N kristalinimo eksperimentais, nutarta kristalinimą atlikti naudojant 8 ir 12 mg/mL baltymo koncentraciją ir pirmiausiai išbandyti komercinius sąlygų paieškos rinkinius (žr. 3 lentelę). Naudoti 1:1 bei 2:1 baltymo ir tirpalo santykiai laše.

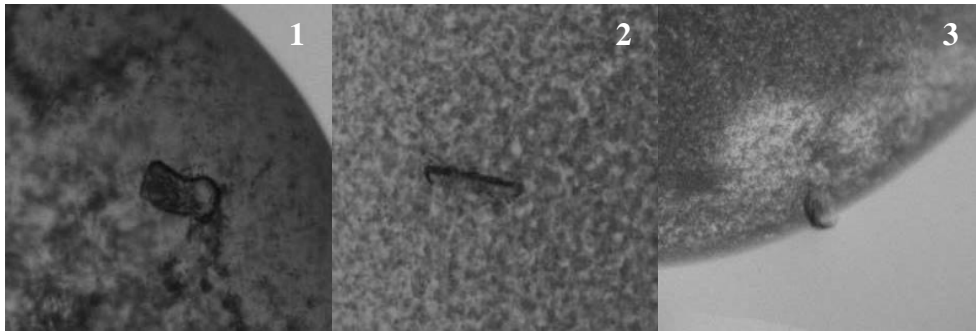
Tos sąlygos, kurioms esant lašuose susidarė kristaliniai dariniai, pavyzdžiui, mikrokristalai, sferulitai, netaisyklingos kristalinės plokštelės (14 pav. 1-4), buvo toliau optimizuojamos, siekiant gauti taisyklingos formos, rentgenostruktūrinei analizei tinkamus kristalus. Optimizacijos metu buvo bandyta didinti baltymo mėginio koncentraciją iki 20 mg/mL, tačiau tokia strategija nepasiteisino – baltymas ilgai iškristdavo į nuosėdas. Iš viso buvo išbandytos 1872 skirtingos sąlygos, tačiau rentgenostruktūrinei analizei tinkami *LmHsp90N* kristalai kol kas nebuvo gauti. Siekiant gauti 3D kristalus, reikėtų testuoti kristalinimo tirpalų sudėties optimizavimą, bei varijuoti kitomis sąlygomis, pavyzdžiui, temperatūra.



24 pav. *LmHsp90N* kristaliniai dariniai. 1-4 – pirminių kristalizacijos sąlygų paieškos etape gauti dariniai (1,3 – netaisyklingos kristalinės plokštelės; 2 – sferulitas; 4 – mikrokristalai); 5-6 – mikrokristalai, gauti iš optimizacijos tirpalų.

3.4.2 *LdHsp90N* kristalinimas

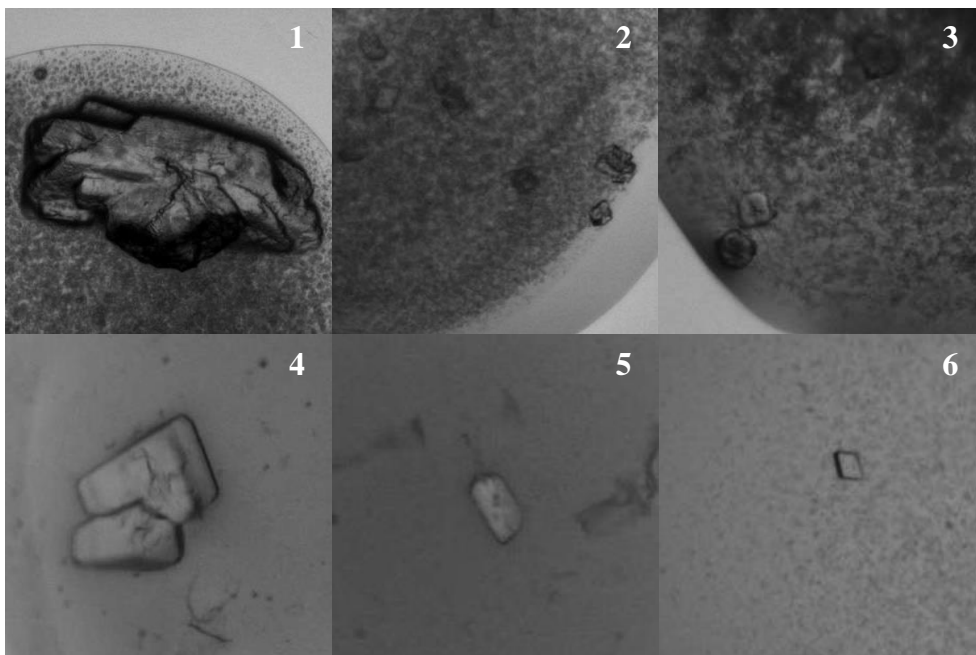
LdHsp90N atveju buvo išmėgintos 567 pirminės kristalizacijos sąlygos. Eksperimentų metu nustatyta palanki kristalizacijai baltymo koncentracija – 20 mg/mL. Buvo gauta keletas kristalinių darinių – netaisyklingos formos plokštelė, adata bei nedidelis 3D kristalas (15 pav.). Visgi, dėl netaisyklingos struktūros ir mažo dydžio, jie nėra tinkami rentgenostruktūrinei analizei, tad būtina sąlygų optimizacija.



3 *LdHsp90N* kristaliniai dariniai. 1 – netaisyklingos formos plokštelė; 2 – adata; 3 – mažas 3D kristalas.

3.4.3 *PfHsp90N* kristalinimas

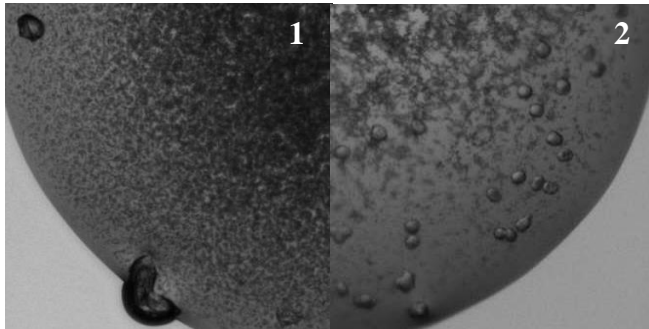
Siekiant gauti *PfHsp90* kristalus, išmėginta 2880 kristalinimo sąlygų. Eksperimentų metu nustatyta, kad 20 mg/mL baltymo koncentracija ir žema (4 °C) temperatūra yra palankios kristalizacijos procesui (16 pav.) Naudojant komercinius kristalinimo tirpalus, susidarė arba nedideli sferulitai, arba dideli netaisyklingi kristaliniai dariniai. Buvo vykdoma optimizacija, kurios metu buvo nustatytos sąlygos, kuriose susidarė nedidelis taisyklingos formos kristalas (16 pav. 6). Tolesnė sąlygų optimizacija galėtų padėti gauti didesnius kristalus.



46 pav. *PfHsp90N* kristaliniai dariniai. 1-3 – pirminių kristalizacijos sąlygų paieškos etape gauti dariniai (1 – didelė kristalinė plokštelė; 2,3 – sferulitai). 4-6 – dariniai, gauti po optimizacijos (4 – kristalinė plokštelė; 5 – nedidelis kristalas; 6 – nedidelis taisyklingas kristalas).

3.4.4 *TgHsp90N* kristalinimas

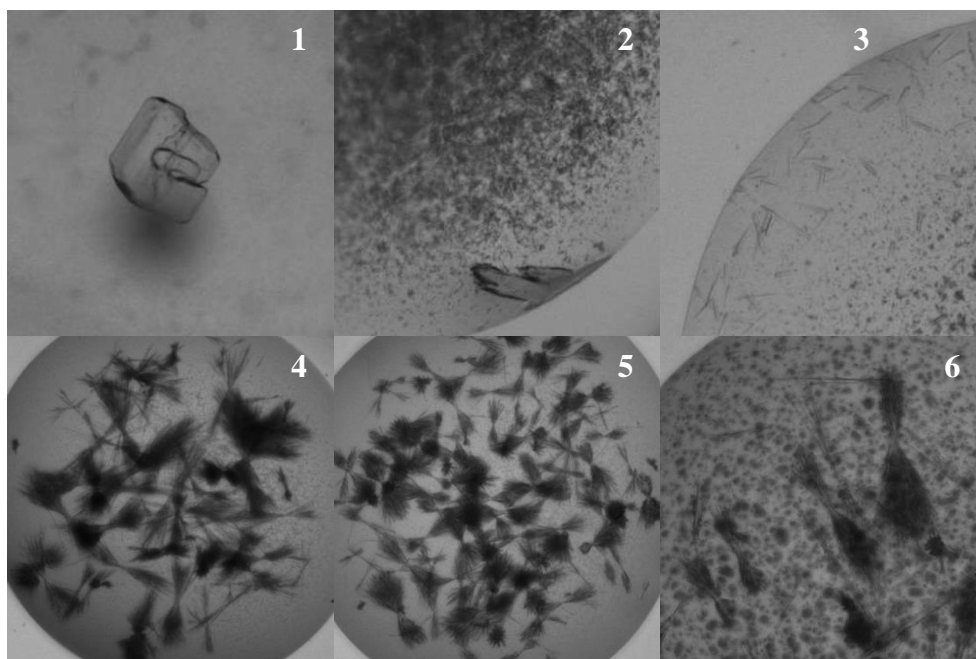
TgHsp90N kristalinimo eksperimentuose išbandytos 1344 pradinės kristalizacijos sąlygos. Remiantis sėkmingais kitų parazitinių šaperonų kristalinimo rezultatais, naudota 20 mg/mL baltymo mėginio koncentracija. Kaip ir dalies kitų baltymų atveju, kristaliniams dariniams susidaryti buvo palankesnė žema temperatūra (4 °C). Eksperimentų metu pavyko gauti sferulitų ir mikrokristalų (pav. 17), tačiau rentgenostruktūrinei analizei tinkamų kristalų gavimui privaloma tolesnė sąlygų paieška.



57 pav. *TgHsp90N* kristaliniai dariniai, gauti pirminės sąlygų paieškos metu. 1 – sferulitai; 2 – mikrokristalai.

3.4.5 *TbHsp90N* kristalinimas

Vykdamas *TbHsp90N* kristalinimo eksperimentus, buvo išbandytos 4704 skirtingos sąlygos. Atliekant pradinę sąlygų paiešką, buvo išmėgintas platus baltymo koncentracijų spektras – nuo 6 iki 20 mg/mL. Naudojant 8 mg/mL *TbHsp90N*, pavyko gauti nedidelių netaisyklingų kristalų bei plokštelių (18 pav. 1-2), padidinus koncentraciją iki 12 mg/mL, stebėtas smulkių adatėlių susidarymas (18 pav. 3). Optimizuojant procesą, pasirinkta dirbti su aukštesnės koncentracijos (20 mg/mL) baltymo mėginiu. Buvo gauta įvairaus dydžio, pavienių ir sudarančių sankaupas adatų (18 pav. 4-6). Taip pat pamėginta kristalinti kartu su ADP (į baltymo tirpalą pridėta 1 mM ADP ir 5 mM MgCl₂), kuris, remiantis tyrimais (Corbett and Berger, 2010), gali pagerinti kristalizacijos procesą. Visgi, ši strategija nepasiteisino – naudojant ADP, negauti jokie kristaliniai dariniai.

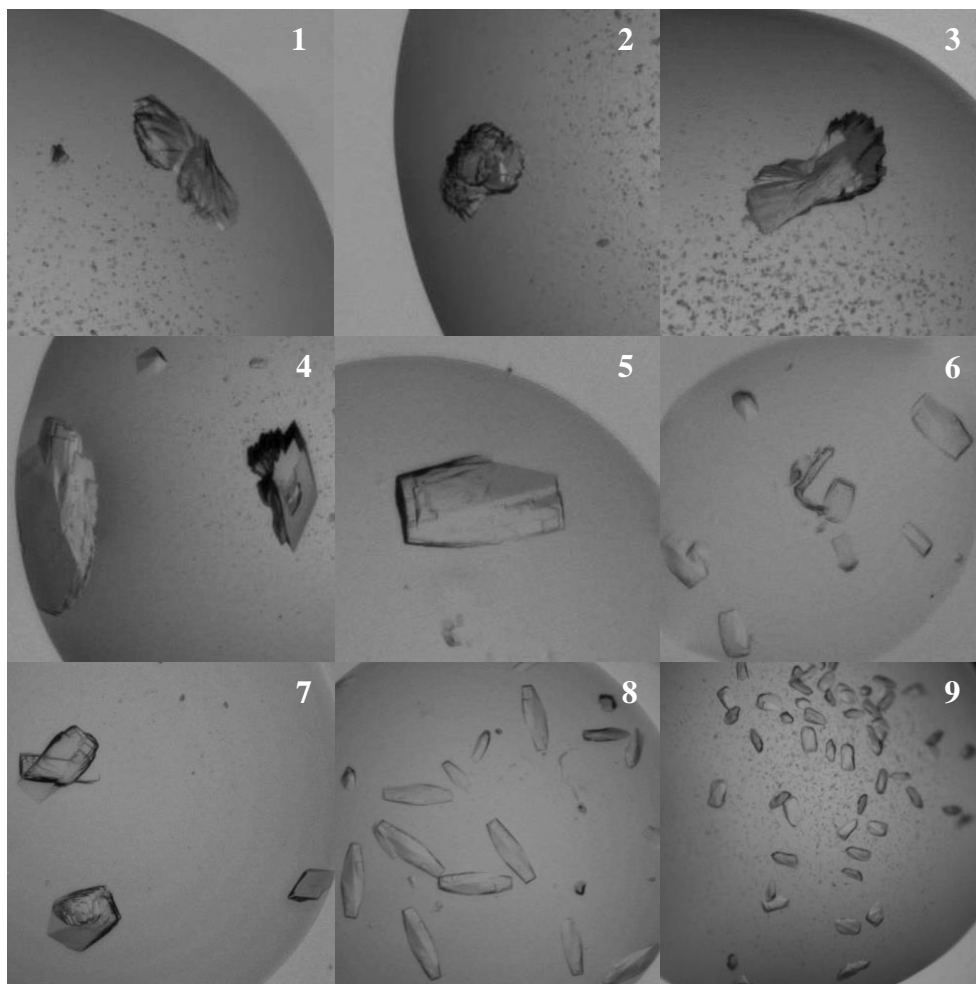


68 pav. *TbHsp90N* kristaliniai dariniai. 1-3 – pirminių kristalizacijos sąlygų paieškos etape gauti dariniai (1 – sferulitas; 2 – kristalinė plokštelė; 3 – smulkios adatėlės). 4-6 – adatų sankaupos, gautos kristalinant su optimizacijos tirpalais.

3.4.6 *TsHsp90N* kristalinimas

TsHsp90N kristalinimui buvo išbandytos 3646 skirtingos sąlygos. 20 mg/mL baltymo koncentracija pasirodė tinkamiausia šiems eksperimentams. Pirminės sąlygų paieškos metu susidarė dideli netaisyklingi kristaliniai dariniai (19 pav. 1-3). Atlikus optimizaciją, pavyko gauti įvairios morfologijos kristalų (19 pav. 4-8). Nustatytos palankios sąlygos kristalizacijai: 0,2-0,3 M NaCl arba $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$; 0,1 M TrisHCl pH 8,5; 24-29 % w/v PEG3350. Tikintis, kad gauti kristalai galėtų difraguoti rentgeno spindulius, atrinktomis sąlygomis buvo ruošta daugiau mėginių. Norint gauti didesnius kristalus, didintas lašo tūris (nuo 0,6 μL iki 1 μL). Nuspręsta pamėginti gauti *TsHsp90N* kompleksų su aktyviajame centre prisijungusiais slopikliais kristalus. Parinkti skyriuje tiriami Hsp90 slopikliai ICPD26 (10 pav.), Pk-11 bei Pk-16 (21 pav.) (susintetinti vadovaujant dr. A. Brukštui VU Chemijos ir geomokslų fakultete). Bandytos dvi strategijos: mirkyti gautus kristalus slopiklių tirpaluose arba baltymus kristalinti kartu su junginiais. Kristalinant kartu su slopikliais (naudota 700 μM junginių koncentracija), gauti panašūs dariniai, kaip ir apo (be prisijungusių ligandų) baltymų atveju (19 pav. 9). Vykdamt mirkymo eksperimentus, naudotos 467 μM ir 933 μM slopiklių koncentracijos. Atrinktų kristalų rentgeno spindulių difrakcija tirta EMBL/DESY sinchrotrone PetraIII P14 spindulių linijoje, Hamburge (Vokietija) (tyrimus atliko dokt. D. Tuminauskaitė, BTI BNRSTS). Visgi, tiek apo baltymų, tiek ko-kristalintų kompleksų, tiek mirkinių rentgeno spindulių difrakcijos skiriamoji geba buvo žema (5-10 Å).

Išbandyta dar viena kristalinimo strategija – užsėjimas (angl. seeding), suskaldant kristalą ir nuolaužas lašinant kartu su baltymu, tikintis, kad bus paskatintas kristalizacijos centrų atsiradimo procesas. Taip pat pirminiai kristalinimo eksperimentai atlikti panaudojant *TsHsp90N* su nukirpta polihistidinine gryninimo uodega (konstrukta klonavo ir baltymą išgrynino dokt. M. Gedgaudas, BTI BVTS). Dėl ilgo kristalų formavimosi laiko (nuo keleto savaičių iki keleto mėnesių), vis dar laukiama šių eksperimentų rezultatų.

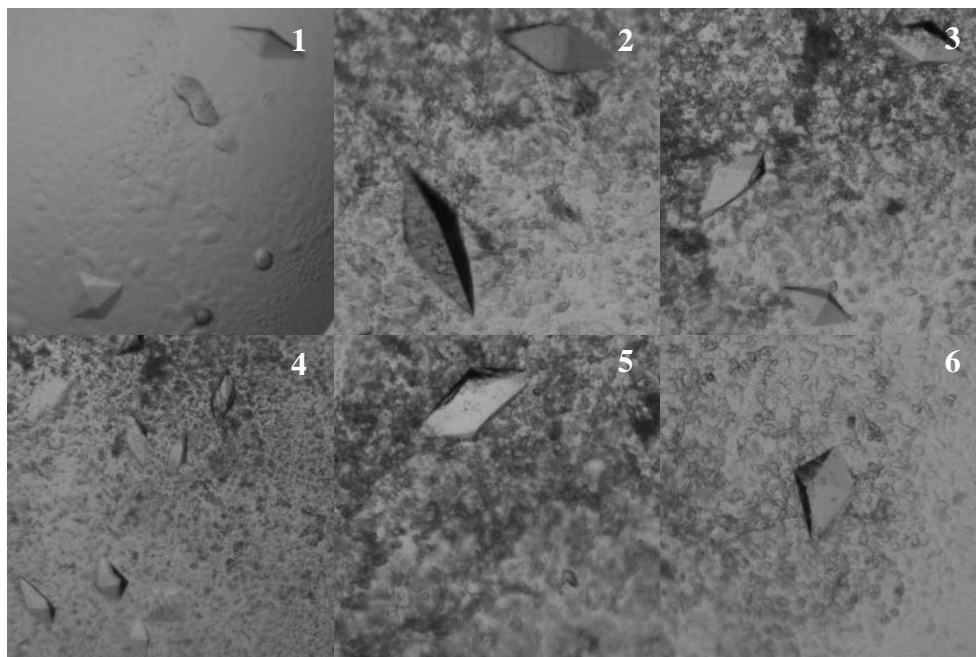


7 *TsHsp90N* kristalai. 1-3 – pirminių kristalizacijos sąlygų paieškos etape gautos kristalinės plokštelės. 4-8 – po optimizacijos gauti kristalai; 9 – *TsHsp90N*, ko-kristalinto su slopikliu ICPD26, kristalai.

3.4.7 Hsp90 α N kristalinimas

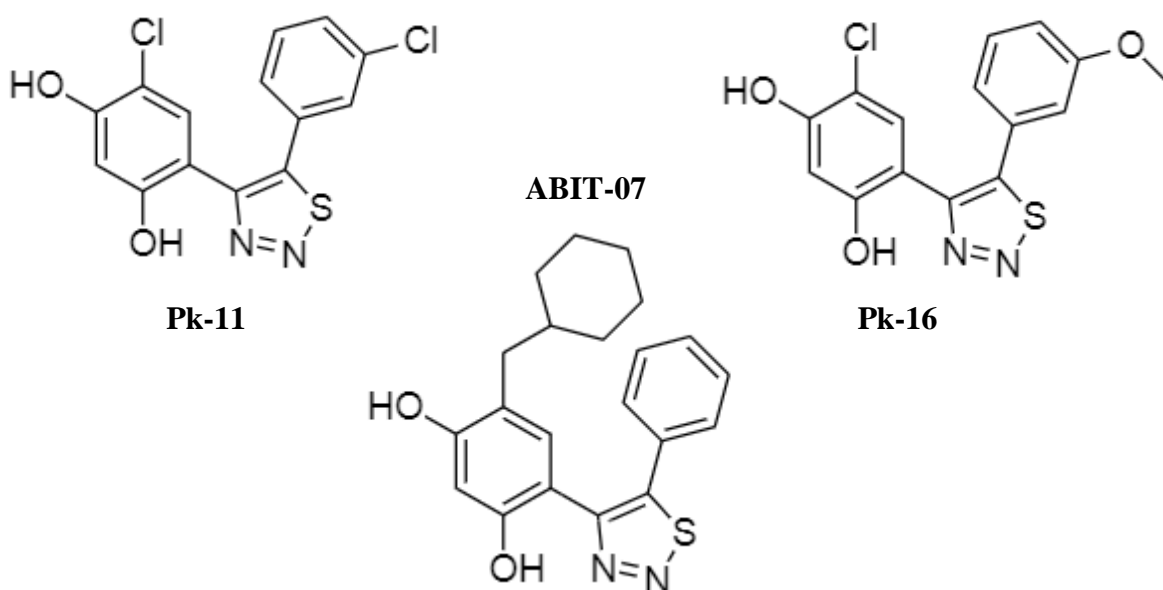
Žmogaus Hsp90N kristalams gauti buvo išbandytos 1824 skirtingos sąlygos. Kaip ir daugumos Hsp90N atveju, 20 mg/mL baltymo koncentracija buvo palanki kristalizacijos procesui. Taip pat, eksperimentų vykdymas žemoje temperatūroje (4 °C) buvo privaloma sąlyga kristalinių darinių atsiradimui. Surastos pirminės sąlygos, kuriomis gauti ne tik nedideli dariniai, tokie kaip sferulitai, tačiau ir taisyklingos formos 3D kristalai (20 pav. 1). Toliau optimizuojant palankiausias kristalizacijai sąlygas, pavyko gauti didesnius taisyklingus

kristalus (20 pav. 2-6), tinkamus rentgenostruktūrinei analizei bei mirkymui su parinktais Hsp90 slopikliais. Bandytas kristalinti kartu su ADP, kaip ir *TbHsp90N* atveju, nepasiteisino.



8 Hsp90 α N kristalai. 1 – pirminių kristalizacijos sąlygų paieškos etape gauti kristalai; 2-6 – po optimizacijos gauti kristalai.

Buvo nustatytos optimalios sąlygos Hsp90 α N kristalizacijai: 0,1 M TrisHCl pH 8,5; 25-27 % w/v PEG3350; 0,3 M MgCl₂, 20 mg/mL koncentracijos baltymą maišant su kristalinimo tirpalu 1:1 arba 2:1 santykiu, lėkštėles laikant 4 °C. Nustatytomis sąlygomis mėginta atlikti ko-kristalinimą su ICPD26 (10 pav.), Pk-11 bei Pk-16 slopikliais (21 pav.), tačiau kristalų gauti nepavyko. Nepasiteisinus ko-kristalinimui, atliktas kristalų mirkymas su minėtų slopiklių tirpalais, taip pat su mažiau stabiliu junginiu ABIT-07 (21 pav.) (susintetintas vadovaujant dr. A. Brukštui VU Chemijos ir geomokslų fakultete), eksperimentas atliktas taip pat kaip *TsHsp90N* atveju (žr. 3.4.6 skyrių). Kristalai tirti EMBL/DESY sinchrotrone (atliko dokt. D. Tuminauskaitė, BTI BNRSTS), jų rentgeno spindulių difrakcijos skiriamoji geba varijavo nuo 1,6 Å iki 3,1 Å (žr. 4 lentelę). Tyrimo metu buvo indeksuojami difrakcijos paveikslėliai, nustatyta, kad Hsp90 α N sudaro ortorombinę I222 kristalinę gardelę (parametrai pateikti 4 lentelėje).

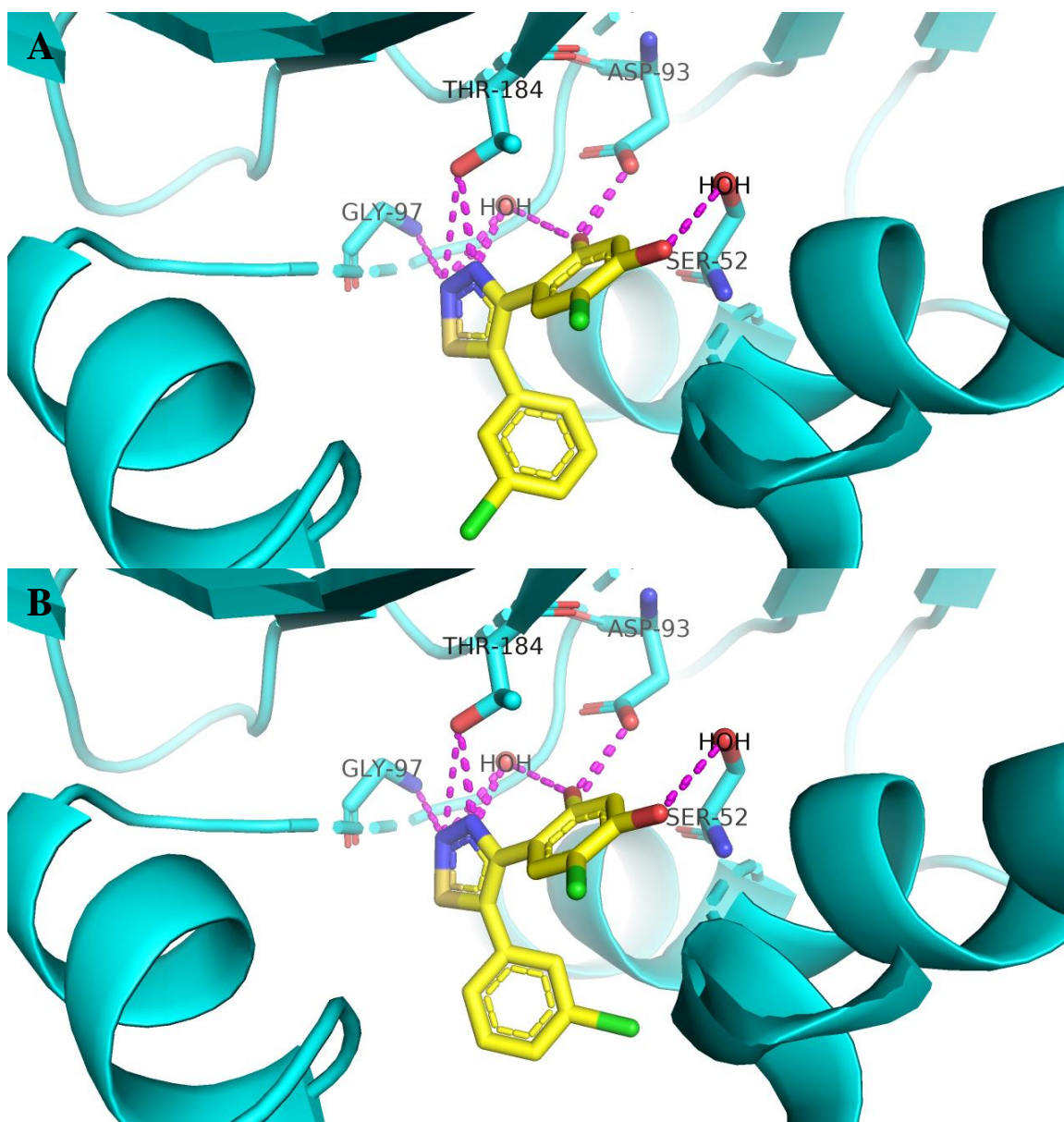


29 pav. Hsp90 slopiklių Pk-11, Pk-16 ir ABIT-07 struktūrinės formulės.

4 lentelė. Hsp90 α N kompleksų su įvairiais slopikliais kristalų rentgeno spindulių difrakcijos tyrimo metu surinkti duomenys. a, b, c – elementariojo narvelio (angl. unit cell) kraštinių ilgiai, α , β , γ – kampai tarp kraštinių.

Kompleksas	Hsp90 α N su ICPD26	Hsp90 α N su Pk-11	Hsp90 α N su Pk-16	Hsp90 α N su ABIT-07
Skiriamoji geba	2,7-2,8 Å	1,6-1,9 Å	1,9-2,5 Å	1,9-3,1 Å
Gardelės tipas	I222	I222	I222	I222
Gardelės parametrai	a = 65,36 Å b = 87,1 Å c = 97,16 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 67,56 Å b = 88,49 Å c = 99,27 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 67,22 Å b = 89,03 Å c = 98,76 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 65,09 Å b = 88,48 Å c = 99,08 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Hsp90 α N komplekso su Pk-11 (21 pav.) struktūros modelis buvo gautas molekulinio pakeitimo būdu (modeliavimą atliko dr. G. Sasnauskas, BTI BNRSTS). Slopiklis Pk-11 šaperono aktyviajame centre sudaro tiesioginius vandenilinius ryšius su aminorūgštimis Gly97, Thr184 ir Asp93 ir su dviem vandens molekulėmis, taip pat per vandens molekulę vyksta sąveika su Ser52. Junginio chlorbenzeno žiedas erdvėje galimai užima dvi skirtingas orientacijas (22 pav. A ir B).



22 pav. Slopiklio Pk-11 (geltona) orientacija Hsp90αN (žydra) aktyviajame centre. Vandeniliniai ryšiai – atvaizduoti rožiniais brūkšneliais. A ir B nurodo skirtingas slopiklio chlorbenzeno žiedo orientacijas.

3.5 Rezultatų aptarimas

Kuriant efektyviai veikiančius baltymų slopiklius, galinčius tapti potencialių naujų vaistų veikliąja medžiaga, yra reikšmingi keletas aspektų. Visų pirma, svarbu gauti grynus ir stabilus baltymų preparatus, galinčius pasitarnauti kaip modeliai slopinimo eksperimentuose. Taip pat svarbu nustatyti potencialių slopiklių jungimosi termodinaminius parametrus, taip įvertinant įvairių junginių afiniškumą ir specifiškumą baltymams. Apie specifines sąveikas bei potencialias tiriamų junginių modifikavimo strategijas daug informacijos suteikia struktūriniai baltymų-ligandų sąveikos duomenys, kuriuos leidžia gauti rentgenostruktūrinė analizė. Šio magistrinio darbo metu siekta gauti parazito *T. cruzi* Hsp90 baltymo N domeną,

įvertinti jo stabilumą bei jungimąsi su parinktais slopikliais bei atlikti BTI BVTS tiriamų parazitinių baltymų ir jų kompleksų su aktualiais junginiais kristalografine analize.

Pirmiausia, darbo metu sukurtas genetinis konstruktas, koduojantis modifikuotą *T. cruzi* Hsp90 N galo domeną (žr. 3.1). Atlikta jo raiška *E. coli* bakterijų BL21 (DE3) kamieno (žr. 3.2). Po ląstelių lizės matoma, kad dalis *TcHsp90N* lieka netirpiose nuosėdose (7 pav.). Kadangi rekombinantinis baltymas yra ne pilno ilgio, o tik vienas domenas, tikėtina, kad natyvios tretinės struktūros įgavimas yra apsunkintas. Šią baltymų agregacijos problemą galima būtų spręsti, pavyzdžiui, ląsteles auginant ir raišką atliekant žemesnėje temperatūroje ilgesnį laiką bei sumažinant induktoriaus koncentraciją, taip sulėtinant transliacijos greitį ir baltymų susilankstymo procesą (Dyson et al., 2004). BTI BVTS anksčiau jau buvo išgrynintas *TcHsp90N* baltymas, tačiau jis buvo nestabilus ir silpnai sąveikavo su Hsp90 slopikliais (A. Dagtės duomenys). Vienas iš problemos sprendimo būdų, aprašytas keleto mokslinių grupių (Corbett and Berger, 2010; Immormino et al., 2004), yra modifikacija, C gale pridodant papildomą seką, sudarytą iš trijų glicinų jungtuko ir aminorūgščių, suformuojančių β klostę. Ši strategija pasiteisino su dalimi kitų skyriuje tiriamų parazitinių baltymų (*PfHsp90N*, *TsHsp90N*, *LdHsp90N* ir *TgHsp90N*), todėl buvo pritaikyta ir *TcHsp90N* (žr. 3.1). FTSA tyrimas parodė, kad gautas modifikuotas rekombinantinis baltymas yra kur kas stabilesnis nei anksčiau tirtas *TcHsp90N* be papildomos sekos, bei jungiasi su tiriamais slopikliais charakteringai homologiškiems parazitiniams baltymams (žr. 3.3). Taigi, gauti rezultatai patvirtina, kad stabilizuojančios sekos pridėjimas yra reikalingas teisingos baltymo konformacijos įgijimui.

TcHsp90N buvo išgrynintas, taikant du chromatografijos metodus – imobilizuotų metalo jonų afininę (IMAC) bei jonų mainų (IEXC) (žr. 3.2). Palankių gryninimui IMAC sąlygų paieškos metu buvo mėginta naudoti Ni^{2+} jonus. Visgi, metodas nebuvo pakankamai jautrus – po gryninimo preparate būdavo daug nespecifinių baltymų priemaišų. Be tikslinio baltymo, histidinių savo paviršiuje gali turėti ir kiti ląstelės baltymai. Sudarydami sąveikas su metalų jonais, jie konkuruoja su tiksliu baltymu ir gali būti išgryninami kartu su juo. Ši problema buvo sprendžiama Ni^{2+} jonus keičiant Co^{2+} jonais. Abu šie metalų jonai, imobilizuoti chelatinėje IDA sefarozėje, sudaro koordinacinius ryšius su baltymo gryninimo sekos histidiniais, tačiau skiriasi jų afiniškumas. Kobaltas pasižymi žemesniu afiniškumu polihistidino sekai ir, nors tai gali lemti mažesnę bendrą tikslinio baltymo išėigą, yra užtikrinamos silpnesnės sąveikos su kitais (su metalų jonais gebančiais sąveikauti) baltymais. Dėl to po eliucijos gaunama mažiau pašalinių baltymų (Cheung et al., 2012). Rekombinantinio baltymo eliucija vykdoma buferiniu tirpalu su imidazolu – histidino analogu, konkuruojančiu dėl prisijungimo prie metalo jonų. Vykdamas IMAC su Co^{2+} , dėl

silpnesnės sąveikos, eiliucijai reikalinga mažesnė imidazolo koncentracija. Siekiant atskirti nespecifinius baltymus, likusius po IMAC etapo, taikytas IEXC metodas, pagrįstas sąveika tarp priešingai įkrautų molekulių.

Kadangi buvo siekiama išgryninti *TcHsp90N*, tinkamą kristalinimo eksperimentams, kuriems reikalingas itin aukštas mėginio grynumas (95-98 %), be Ni^{2+} pakeitimo į Co^{2+} , ieškota ir kitų būdų, galinčių padidinti preparato grynumą. Rekombinantinis *TcHsp90N* turi dvi cisteino aminorūgštis, kurios gali sudaryti disulfidinius tiltelius su kitais baltymais ir taip apsunkinti gryninimo procesą. Redukuojančio junginio 2-merkaptoetanolio (2 mM) pridėjimas į visus gryninimo eigoje naudojamus buferinius tirpalus gali užkirsti kelią šių pašalinių ryšių susidarymui. Nespecifinės hidrofobinės sąveikos taip pat gali lemti nepageidaujamų baltymų priemaišas po eliuacijos. Sąveikos mažinamos į gryninimo buferinį tirpalą pridėjus glicerolio (3 %) bei nedidelius kiekius (iki 1 %) nejoninio detergento Triton X-100 (Bornhorst and Falke, 2000). Šių komponentų pridėjimas į abiem gryninimo etapais naudotus buferinius tirpalus žymiai pagerino *TcHsp90N* mėginių švarumą (žr. 3.2).

Gavus gryną rekombinantinį baltymą, buvo atlikti termodinaminiai tyrimai, pasitelkiant FTSA metodą. *TcHsp90N* jungimosi su slopikliais ICPD26, ICPD47 ir 17-AAG tyrimo rezultatai (žr. 3.3) buvo tendencingi kitiems tiriamiems parazitų Hsp90N, o gautos jungimosi konstantos (ICPD26 – $3,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, ICPD47 – $2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, 17-AAG – $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) nurodo sąlyginai stiprią junginių sąveiką su baltymu. Nustatytos K_b vertės buvo palygintos su tų pačių slopiklių jungimosi su Hsp90 α N (šiuose tyrimuose naudojamo kaip kontrolė) duomenimis. Šio šaperono ir slopiklių jungimosi konstantos (ICPD26 – $7,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, ICPD47 – $8,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, 17-AAG – $4,27 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (dokt. M. Gedgaudo duomenys)) yra ~3-4 kartus didesnės už *TcHsp90N*. Ligando 17-AAG jungimosi K_b vertės yra kur kas mažesnės nei tirtų tiadiazolo darinių (tiek sąveikoje su parazito, tiek su žmogaus baltymais). Šis junginys yra natūraliai gamtoje randamo geldanamicino darinys, kaip Hsp90 slopiklis jis naudojamas jau daugelį metų, kai, tuo tarpu, tiadiazolai yra naujos kartos slopikliai. Skirtingą šių junginių afiniškumą šaperonui galima paaiškinti besiskiriančia cheminių junginių struktūra. Taip pat, nors ir stebimas 3-4 kartus silpnesnis ligandų jungimasis su *TcHsp90N*, lyginant su Hsp90 α N, vertėtų atkreipti dėmesį, kad parazitiniuose organizmuose šio šaperono ATP-azinis aktyvumas yra šešis kartus didesnis, lyginant su žmogaus homologu (Pallavi et al., 2010). Tai leistų manyti, kad parazitinio Hsp90 slopinimas *in vivo* galėtų turėti reikšmingesnes pasekmes ląsteliniams procesams, lyginant su žmogaus organizmu. Siekiant patvirtinti šias hipotezes, yra reikalingi tyrimai gyvose sistemose. Nors nebuvo stebimas tirtų junginių atrankumas parazitiniam baltymui, darbo metu parodyta, kad gautas modifikuotas rekombinantinis

TcHsp90N yra stabilus, stipriai sąveikauja su parinktais junginiais ir dėl to yra geras modelis naujų vaistinių medžiagų paieškoje.

Be *TcHsp90N*, mūsų skyriuje dirbama su įvairių kitų organizmų Hsp90N (2 lentelė). Atliekama atrankių slopiklių, kurie galėtų būti potencialių naujų antiparazitinių vaistų veiklioji medžiaga, paieška. Šiems tyrimams yra itin vertinga informacija, gauta rentgenostruktūrinės analizės pagalba. Iškristalintų baltymų su prisijungusiomis slopiklių molekulėmis struktūros leidžia įvertinti tikslią junginių orientaciją aktyviajame centre, nustatyti ryšius sudarančias aminorūgštis. Šio darbo metu vykdyta septynių baltymų (*LmHsp90N*, *LdHsp90N*, *PfHsp90N*, *TgHsp90N*, *TbHsp90N*, *TsHsp90N* ir *Hsp90αN*) kristalizacijos sąlygų paieška (žr. 3.4). Stebėta visiems baltymams bendra tendencija – kristalizacijos procesui reikalinga aukšta (iki 20 mg/mL) baltymo koncentracija. Visų baltymų atveju pavyko gauti kristalinius darinius, o sąlygos, kuriomis gauti 3D kristalai surastos dviems baltymams – *TsHsp90N* bei *Hsp90αN*. Baltymų kristalai buvo gauti esant aukštai nusodinančios medžiagos PEG3350 koncentracijai (24-29 % w/v), pH 8,5 ir papildomoms druskoms (0,2-0,3 M $MgCl_2$, NaCl arba $NH_4CH_3CO_2$). Visgi, tik gauti *Hsp90αN* kristalai difragavo rentgeno spindulius aukšta skiriamąja geba (1,6-3,1 Å).

Literatūroje (Corbett and Berger, 2010) nurodoma, kad *Hsp90N* sėkmingai kristalinasi komplekse su ADP molekulėmis. Šis metodas buvo pritaikytas *Hsp90αN* ir *TbHsp90N* baltymų kristalinimui, tačiau iš tokių mėginių nepavyko gauti jokių kristalinių darinių. Kitų mokslinių grupių rezultatai (Brasca et al., 2013; Casale et al., 2014; Tassone et al., 2018) rodo, jog siekiant gauti *Hsp90N* su slopikliais kompleksų kristalus, pasiteisinanti strategija yra ko-kristalinimas. Šio darbo metu taip pat buvo atlikti ko-kristalinimo su slopikliais eksperimentai, tačiau išbandytas ir natyvaus baltymo kristalų mirkymas slopiklių tirpaluose. *TsHsp90* atveju abiem metodais gauti kristalai (žr. 3.4.6), tačiau jie prastai difragavo rentgeno spindulius, o *Hsp90αN* tik mirkymo eksperimentai buvo sėkmingi (žr. 3.4.7).

Buvo surinkti (atliko dokt. D. Tuminauskaitė) *Hsp90αN* ir keleto skirtingų slopiklių kompleksų rentgeno spindulių difrakcijos duomenų rinkiniai (3 lentelė), pasižymintys aukšta difrakcijos skiriamąja geba (nuo 1,6 Å iki 3,1 Å). *Hsp90αN* ir vieno iš tirtų slopiklių Pk-11 komplekso struktūra (skiriamoji geba – 1,8 Å) buvo išspręsta (22 pav.). Matoma, jog trys aminorūgštys (Gly97, Thr184 ir Asp93) ir dvi vandens molekulės sudaro vandenilinius ryšius ir yra atsakingos už junginio orientavimą šaperono N domeno aktyviajame centre. Taip pat egzistuoja vandenilinis ryšys per vandens molekulę su netoliese esančia Ser52 aminorūgštimi. Pastaraisiais metais tiriami perspektyvūs mažos molekulinės masės *Hsp90N* slopikliai dažniausiai pasižymi sąveika su aktyviojo centro aminorūgštimis Asp93, Gly97, Gly135, Ser52, Lys58 (Brasca et al., 2013; Casale et al., 2014b; Jiang et al., 2016; Ren et al., 2014;

Sharp et al., 2007). Itin dažnai stebima junginių (įskaitant ir Pk-11) sąveika su Asp93 leidžia teigti, kad ji yra viena esminių aminorūgščių Hsp90αN aktyviajame centre. Atlikus kitų kompleksų struktūros modeliavimą, bus gauta daugiau naudingos informacijos apie specifines baltymo aktyviojo centro sąveikas su įvairiais junginiais. Šios kristalinės struktūros pasitarnaus kaip kontrolė, lyginant jas su ateityje planuojamomis gauti parazitinių Hsp90N ir slopiklių kompleksų struktūromis. Ieškant naujų vaistinių medžiagų, svarbu, kad jų afiniškumas žmogaus šaperonui būtų mažesnis nei parazito šaperonui. Atsižvelgiant į konkretaus junginio sąveikos su skirtingais baltymais kristalografinius duomenis, būtų galima modifikuoti jo struktūrą, užtikrinant stiprų jungimąsi ir atrankumą pageidaujama baltymui. Todėl šio magistrinio darbo metu gauti duomenys yra reikšmingi ir suteikia trūkstančių žinių potencialios naujų slopiklių bibliotekos sukūrimui.

IŠVADOS

- Efektyviai darbo metu sukurto genetinio konstrukto, koduojančio *TcHsp90N*, raiškai yra tinkamas *E. coli* BL21 (DE3) kamienas po indukcijos 1 mM IPTG auginant 4 h 30 °C.
- Rekombinantinis *TcHsp90N* stipriai jungiasi su slopikliais ICPD26, ICPD47 ir 17-AAG, nustatytos jungimosi konstantos yra atitinkamai $3,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, $2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ir $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.
- Atsižvelgiant į jo stabilumą ir patvirtintą sąveiką su specifiniais junginiais, gautas *TcHsp90N* yra tinkamas modelis tolesniems slopiklių jungimosi tyrimams.
- Gauti *LmHsp90N*, *LdHsp90N*, *PfHsp90N*, *TgHsp90N* ir *TbHsp90N* kristaliniai dariniai nėra tinkami rentgenostruktūrinei analizei.
- Esant sąlygoms, pasižyminčioms aukšta nusodinančios medžiagos PEG3350 koncentracija, pH 8,5 ir papildomų druskų (MgCl_2 , NaCl arba $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) buvimu, formuojasi *TsHsp90N* ir *Hsp90 α N* kristalai:
 - *TsHsp90N* kristalų rentgeno spindulių difrakcijos skiriamoji geba yra per maža struktūros nustatymui;
 - *Hsp90 α N* kristalų rentgeno spindulių difrakcijos skiriamoji geba (1,6-3,1 Å) yra pakankama struktūros nustatymui.
- Iš gautos *Hsp90 α N* su prisijungusiu ligandu Pk-11 struktūros matoma, kad junginys sąveikauja su aktyviojo centro aminorūgštimis Gly97, Thr184 ir Asp93 bei erdvėje gali užimti dvi skirtingas konformacijas.

REZULTATŲ SKLAIDA

Pranešimai darbo tema:

1. **Dovilė Daunoraitė**, Marius Gedgaudas, Aurelija Mickevičiūtė, Egidijus Kazlauskas, Daumantas Matulis. *Trypanosima cruzi* Chaperone Hsp90 as a Target for Chagas Disease Treatment. Konferencija „Open Readings 2020“. Vilnius, Lietuva, 2020.03. Stendinis pranešimas. Atšaukta dėl COVID-19.

2. **Dovilė Daunoraitė**, Marius Gedgaudas, Aurelija Mickevičiūtė, Egidijus Kazlauskas, Daumantas Matulis. Targeting *Trypanosoma cruzi* Chaperone Hsp90 in Chagas Disease. Konferencija „The Coins 2020“. Vilnius, Lietuva. 2020.02. Stendinis pranešimas.

Kiti pranešimai:

1. Egidijus Kazlauskas, Marius Gedgaudas, **Dovilė Daunoraitė**, Aurelija Mickevičiūtė, Algirdas Brukštus, Daumantas Matulis. Anti–protozoan Thiadiazole–based Hsp90 Inhibitors. Konferencija „Baltic Biophysics Conference“. Kaunas, Lietuva, 2018.10. Stendinis pranešimas.

2. Egidijus Kazlauskas, Marius Gedgaudas, **Dovilė Daunoraitė**, Aurelija Mickevičiūtė, Algirdas Brukštus, Daumantas Matulis. Thiadiazole–based Hsp90 Inhibitors as Anti–protozoan Lead Compounds. Konferencija „Life Science Baltics 2018“. Vilnius, Lietuva, 2018.09. Stendinis pranešimas.

3. **Dovilė Daunoraitė**, Marius Gedgaudas, Aurelija Mickevičiūtė, Daumantas Matulis, Egidijus Kazlauskas. Cloning, Expression and Purification of *Toxoplasma gondii* Hsp90 N Domain. Konferencija „Open Readings 2018“. Vilnius, Lietuva, 2018.03. Stendinis pranešimas.

4. Marius Gedgaudas, Aurelija Mickevičiūtė, Algirdas Brukštus, **Dovilė Daunoraitė**, Daumantas Matulis, Egidijus Kazlauskas. Heat Shock Protein 90 Inhibitors as Therapeutic Agents Against Protozoan Diseases. Konferencija „Vita Scientia '18“. Vilnius, Lietuva, 2018.01. Stendinis pranešimas.



Kuriame
Lietuvos ateitį

2014–2020 metų
Europos Sąjungos
fondų investicijų
veiksmų programa

FINANSINĖ PARAMA

Baigiamasis darbas dalinai finansuotas Europos socialinio fondo lėšomis pagal priemonę Nr. 09.3.3-LMT-K-712 „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“ įgyvendinant projektą 09.3.3-LMT-K-712-16-0126.

PADĖKA

Dėkoju savo darbo vadovui dr. Egidijui Kazlauskui už visą magistro studijų metu suteiktą pagalbą planuojant ir įgyvendinant eksperimentus, rašant baigiamąjį darbą, taip pat už kantrybę ir nuoširdų rūpestį. Dėkoju savo darbo mokslinėms konsultantėms Aurelijai Mickevičiūtei ir dokt. Donatai Tuminauskaitei už visą jų skirtą laiką, suteiktas žinias ir mano laboratorinių įgūdžių formavimą. Taip pat esu dėkinga dokt. Mariui Gedgaudui už kasdienes patarimus bei bendradarbiavimą ir j. m. d. Vilmai Michailovienei už pagalbą atliekant baltymų gryninimo eksperimentus. Galiausiai, esu dėkinga prof. Daumantui Matuliui už suteiktą galimybę dirbti jo vadovaujame skyriuje ir BTI BVTS bei BNRSTS darbuotojams bei studentams už profesionalią ir draugišką atmosferą.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Dovilė Daunoraitė
Magistro baigiamasis darbas

**Hsp90, kaip antiparazitinių slopiklių taikinio, termodinaminiai ir
kristalografiniai tyrimai**

SANTRAUKA

Šio magistrinio darbo metu buvo atliekami įvairių organizmų Hsp90N termodinaminiai ir kristalografiniai tyrimai, siekiant gauti informacijos, reikalingos naujų antiparazitinių vaistų dizainui. Darbo metu buvo sukurtas genetinis konstruktas, koduojantis modifikuotą *TcHsp90N*, įvykdyta jo raiška *E. coli* BL(DE3) kamiene. Pavykus gauti raišką, baltymas sėkmingai išgrynintas. Fluorescencinio terminio poslinkio metodu įvertintas šaperono stabilumas ir jungimasis su Hsp90 slopikliais ICPD26, ICPD47 ir 17-AAG. Taip pat buvo atlikta BTI BVTS tiriamų baltymų *LmHsp90N*, *LdHsp90N*, *PfHsp90N*, *TgHsp90N*, *TbHsp90N*, *TsHsp90N* ir Hsp90 α N kristalizacijos sąlygų paieška, siekiant gauti rentgenostruktūrinei analizei tinkamus kristalus. Šių tyrimų metu pavyko rasti optimalias sąlygas Hsp90 α N kristalų susidarymui. Radus kristalizacijos sąlygas, buvo gauti Hsp90 α N ir slopiklių ICPD26, Pk-11, Pk-16 ir ABIT-07 kompleksų kristalai. Surinkti šių kompleksų rentgeno spindulių difrakcijos rinkiniai, pasižymintys aukšta skiriamąja geba (nuo 1,6 Å iki 3,1 Å).

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Dovilė Daunoraitė

Master thesis

**Thermodynamic and Crystallographic Investigation of Hsp90 as an Antiparasitic
Drug Target**

SUMMARY

In this master's research project thermodynamic and crystallographic investigation of Hsp90 proteins from different organisms was performed. The goal was to gain insight into protein-ligand binding interactions that would be beneficial for the design of new anti-parasitic drugs. In this study the DNA construct encoding *TcHsp90N* was constructed, successfully expressed in *E. coli* BL(DE3) strain and then the protein was purified. Fluorescence thermal shift assay was carried out to determine the stability of recombinant protein and binding parameters of select Hsp90 inhibitors ICPD26, ICPD47 and 17-AAG. In addition, optimal crystallization condition screens were performed for several Hsp90N proteins of interest: *LmHsp90N*, *LdHsp90N*, *PfHsp90N*, *TgHsp90N*, *TbHsp90N*, *TsHsp90N* and Hsp90 α N. The aim was to obtain crystals that are suitable for structural X-ray analysis. Optimal conditions for Hsp90 α N crystallization were achieved and 3D crystals of this protein in complex with inhibitors ICPD26, Pk-11, Pk-16 and ABIT-07 were grown. The data of high resolution (1,6-3,1 Å) X-ray diffraction was acquired for these protein-ligand complexes.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Alday, P.H., and Doggett, J.S. (2017). Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Des Devel Ther* 11, 273–293.
2. Alemayehu, B., and Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal* 11.
3. Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., and White, F.H. (1961). THE KINETICS OF FORMATION OF NATIVE RIBONUCLEASE DURING OXIDATION OF THE REDUCED POLYPEPTIDE CHAIN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47, 1309–1314.
4. Bacchi, C.J., Nathan, H.C., Hutner, S.H., McCann, P.P., and Sjoerdsma, A. (1980). Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science* 210, 332–334.
5. Banumathy, G., Singh, V., Pavithra, S.R., and Tatu, U. (2003). Heat shock protein 90 function is essential for Plasmodium falciparum growth in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 18336–18345.
6. Bauman, J.W., Liu, J., and Klaassen, C.D. (1993). Production of Metallothionein and Heat-Shock Proteins in Response to Metals. *Toxicol Sci* 21, 15–22.
7. Biebl, M.M., and Buchner, J. (2019). Structure, Function, and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, a034017.
8. Bornhorst, J.A., and Falke, J.J. (2000). [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol* 326, 245–254.
9. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
10. Brasca, M.G., Mantegani, S., Amboldi, N., Bindi, S., Caronni, D., Casale, E., Ceccarelli, W., Colombo, N., De Ponti, A., Donati, D., et al. (2013). Discovery of NMS-E973 as novel, selective and potent inhibitor of heat shock protein 90 (Hsp90). *Bioorg. Med. Chem.* 21, 7047–7063.
11. Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V., and Priotto, G. (2017). Human African trypanosomiasis. *The Lancet* 390, 2397–2409.
12. Cao, Y., Ohwatari, N., Matsumoto, T., Kosaka, M., Ohtsuru, A., and Yamashita, S. (1999). TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts. *Pflugers Arch.* 438, 239–244.
13. Casale, E., Amboldi, N., Brasca, M.G., Caronni, D., Colombo, N., Dalvit, C., Felder, E.R., Fogliatto, G., Galvani, A., Isacchi, A., et al. (2014a). Fragment-based hit discovery and structure-based optimization of aminotriazoloquinazolines as novel Hsp90 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22, 4135–4150.
14. Centers for Disease Control and Prevention (2019). CDC - Parasites - About Parasites [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-25]. Adresas: <https://www.cdc.gov/parasites/about.html>.
15. Centers for Disease Control and Prevention (2019). CDC - Toxoplasmosis - Resources for Health Professionals. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-04-02]. Adresas: https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/health_professionals/index.html.
16. Centers for Disease Control and Prevention (2019). CDC - Trichinellosis - Resources for Health Professionals. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-28]. Adresas: https://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis/health_professionals/index.html.

17. Chen, B., Zhong, D., and Monteiro, A. (2006). Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7, 156.
18. Cheung, R.C.F., Wong, J.H., and Ng, T.B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1411–1420.
19. Cimperman, P., Baranauskienė, L., Jachimovičiūtė, S., Jachno, J., Torresan, J., Michailovienė, V., Matulienė, J., Sereikaitė, J., Bumelis, V., and Matulis, D. (2008). A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands. *Biophys J* 95, 3222–3231.
20. Clerico, E.M., Tilitsky, J.M., Meng, W., and Gierasch, L.M. (2015). How Hsp70 Molecular Machines Interact with Their Substrates to Mediate Diverse Physiological Functions. *J Mol Biol* 427, 1575–1588.
21. Corbett, K.D., and Berger, J.M. (2009). Crystal structure of N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* Hsp90 (PF07_0029) bound to ADP.
22. Corbett, K.D., and Berger, J.M. (2010). Structure of the ATP-binding domain of *Plasmodium falciparum* Hsp90. *Proteins* 78, 2738–2744.
23. David, S., Bucchieri, F., Corrao, S., Czarnecka, A.M., Campanella, C., Farina, F., Peri, G., Tomasello, G., Sciumè, C., Modica, G., et al. (2013). Hsp10: anatomic distribution, functions, and involvement in human disease. *Front Biosci (Elite Ed)* 5, 768–778.
24. Dutta, R., and Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 25, 24–28.
25. Dyson, M.R., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Perera, R.L., and McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol* 4, 32.
26. Edwards, H.V., Cameron, R.T., and Baillie, G.S. (2011). The emerging role of HSP20 as a multifunctional protective agent. *Cellular Signalling* 23, 1447–1454.
27. Ellis, R.J., and Minton, A.P. (2006). Protein aggregation in crowded environments. *Biological Chemistry* 387, 485–497.
28. Fairlamb, A.H., Henderson, G.B., and Cerami, A. (1989). Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2607–2611.
29. Faya, N., Penkler, D.L., and Tastan Bishop, Ö. (2015). Human, vector and parasite Hsp90 proteins: A comparative bioinformatics analysis. *FEBS Open Bio* 5, 916–927.
30. Ferrari, L., and Rüdiger, S.G.D. (2019). Hsp90 Chaperone in Disease. In *Heat Shock Protein 90 in Human Diseases and Disorders*, A.A.A. Asea, and P. Kaur, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 473–491.
31. Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J., and Ellis, J. (2012). Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. *Clinical Microbiology Reviews* 25, 420–449.
32. Ghorbani, M., and Farhoudi, R. (2017). Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther* 12, 25–40.
33. Gorrec, F. (2009). The MORPHEUS protein crystallization screen. *J Appl Crystallogr* 42, 1035–1042.
34. Gottstein, B., Pozio, E., and Nöckler, K. (2009). Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin Microbiol Rev* 22, 127–145.

35. Graefe, S.E.B., Wiesgigl, M., Gaworski, I., Macdonald, A., and Clos, J. (2002). Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* Induces a Stress Response but No Stage Differentiation. *Eukaryot Cell* 1, 936–943.
36. Graf, F.E., Ludin, P., Wenzler, T., Kaiser, M., Brun, R., Pyana, P.P., Büscher, P., de Koning, H.P., Horn, D., and Mäser, P. (2013). Aquaporin 2 mutations in *Trypanosoma brucei* gambiense field isolates correlate with decreased susceptibility to pentamidine and melarsoprol. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2475.
37. Guhl, F. (2017). 5 - Geographical distribution of Chagas disease. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*, J. Telleria, and M. Tibayrenc, eds. (London: Elsevier), pp. 89–112.
38. Gupta, R.S., Ramachandra, N.B., Bowes, T., and Singh, B. (2008). Unusual cellular disposition of the mitochondrial molecular chaperones Hsp60, Hsp70 and Hsp10. *Novartis Found. Symp.* 291, 59–68; discussion 69-73, 137–140.
39. Haldar, A.K., Sen, P., and Roy, S. (2011). Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions (Hindawi).
40. Hall, B.S., Bot, C., and Wilkinson, S.R. (2011). Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *J Biol Chem* 286, 13088–13095.
41. Hammerer-Lercher, A., Mair, J., Bonatti, J., Watzka, S.B.C., Puschendorf, B., and Dirnhofer, S. (2001). Hypoxia induces heat shock protein expression in human coronary artery bypass grafts. *Cardiovasc Res* 50, 115–124.
42. Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332.
43. Hessling, M., Richter, K., and Buchner, J. (2009). Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 287–293.
44. Hofstraat, K., and van Brakel, W.H. (2016). Social stigma towards neglected tropical diseases: a systematic review. *Int Health* 8, i53–i70.
45. Horn, D., and Duraisingh, M.T. (2014). Antiparasitic Chemotherapy: From Genomes to Mechanisms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54, 71–94.
46. Hotez, P.J. (2015). Vaccine Science Diplomacy: Expanding Capacity to Prevent Emerging and Neglected Tropical Diseases Arising from Islamic State (IS)–Held Territories. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9, e0003852.
47. Hotez, P.J. (2016). Southern Europe’s Coming Plagues: Vector-Borne Neglected Tropical Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10, e0004243.
48. Hotez, P.J. (2018). Chapter Two - Human Parasitology and Parasitic Diseases: Heading Towards 2050. In *Advances in Parasitology*, D. Rollinson, and J.R. Stothard, eds. (Academic Press), pp. 29–38.
49. Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S.E., Sachs, J.D., and Savioli, L. (2007). Control of neglected tropical diseases. *N. Engl. J. Med.* 357, 1018–1027.
50. Hotez, P.J., Pecoul, B., Rijal, S., Boehme, C., Aksoy, S., Malecela, M., Tapia-Conyer, R., and Reeder, J.C. (2016). Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. *PLoS Negl Trop Dis* 10.

51. Immormino, R.M., Dollins, D.E., Shaffer, P.L., Soldano, K.L., Walker, M.A., and Gewirth, D.T. (2004). Ligand-induced Conformational Shift in the N-terminal Domain of GRP94, an Hsp90 Chaperone. *Journal of Biological Chemistry* 279, 46162–46171.
52. Jiang, F., Wang, H.-J., Jin, Y.-H., Zhang, Q., Wang, Z.-H., Jia, J.-M., Liu, F., Wang, L., Bao, Q.-C., Li, D.-D., et al. (2016). Novel Tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidines as Potent Inhibitors of Chaperone Heat Shock Protein 90. *J. Med. Chem.* 59, 10498–10519.
53. Johnson, J.L. (2012). Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 607–613.
54. Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* 82, 323–355.
55. Lanteri, C.A., Tidwell, R.R., and Meshnick, S.R. (2008). The Mitochondrion Is a Site of Trypanocidal Action of the Aromatic Diamidine DB75 in Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 875–882.
56. Laplante, A.F., Moulin, V., Auger, F.A., Landry, J., Li, H., Morrow, G., Tanguay, R.M., and Germain, L. (2016). Expression of Heat Shock Proteins in Mouse Skin During Wound Healing: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*.
57. Li, J., Qian, X., and Sha, B. (2009). Heat shock protein 40: structural studies and their functional implications. *Protein Pept. Lett.* 16, 606–612.
58. Li, J., Soroka, J., and Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 624–635.
59. Lindner, A.K., Lejon, V., Chappuis, F., Seixas, J., Kazumba, L., Barrett, M.P., Mwamba, E., Erphas, O., Akl, E.A., Villanueva, G., et al. (2020). New WHO guidelines for treatment of gambiense human African trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice. *The Lancet Infectious Diseases* 20, e38–e46.
60. Liu, Q., Liang, C., and Zhou, L. (2020). Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system. *Protein Science* 29, 378–390.
61. Matulis, D., Kranz, J.K., Salemme, F.R., and Todd, M.J. (2005). Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry* 44, 5258–5266.
62. Matz, J.M., Blake, M.J., Tatelman, H.M., Lavoie, K.P., and Holbrook, N.J. (1995). Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 269, R38–R47.
63. Mitra, A.K., and Mawson, A.R. (2017). Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 2, 36.
64. Miyata, Y., Nakamoto, H., and Neckers, L. (2013). *The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks* (Bentham Science Publishers).
65. Mogk, A., Kummer, E., and Bukau, B. (2015). Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Front. Mol. Biosci.* 2.
66. Molyneux, D.H., Savioli, L., and Engels, D. (2017). Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *The Lancet* 389, 312–325.

67. Morgan, H.P., McNae, I.W., Nowicki, M.W., Zhong, W., Michels, P.A.M., Auld, D.S., Fothergill-Gilmore, L.A., and Walkinshaw, M.D. (2011). The Trypanocidal Drug Suramin and Other Trypan Blue Mimetics Are Inhibitors of Pyruvate Kinases and Bind to the Adenosine Site. *J Biol Chem* 286, 31232–31240.
68. Nakamura, H., and Minegishi, H. (2013). *HSP60 as a Drug Target* (Bentham Science Publishers).
69. Naucke, T.J., Menn, B., Massberg, D., and Lorentz, S. (2008). Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol. Res. 103 Suppl 1*, S65-68.
70. Neckers, L., and Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clin Cancer Res* 18, 64–76.
71. Pallavi, R., Roy, N., Nageshan, R.K., Talukdar, P., Pavithra, S.R., Reddy, R., Venketesh, S., Kumar, R., Gupta, A.K., Singh, R.K., et al. (2010a). Heat Shock Protein 90 as a Drug Target against Protozoan Infections. *J Biol Chem* 285, 37964–37975.
72. Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *The EMBO Journal* 17, 4829–4836.
73. Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M.E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology* 39, 1385–1394.
74. Pavithra, S.R., Banumathy, G., Joy, O., Singh, V., and Tatu, U. (2004). Recurrent Fever Promotes *Plasmodium falciparum* Development in Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 46692–46699.
75. Pérez-Molina, J.A., and Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet* 391, 82–94.
76. Petrakis, N., Alcock, F., and Tokatlidis, K. (2009). Mitochondrial ATP-independent chaperones. *IUBMB Life* 61, 909–914.
77. Picard, D. (2020). Hsp90 Interactions [interaktyvus] [žiūrėta 2020-05-29]. Adresas: <https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>.
78. Pizarro, J.C., Wernimont, A.K., Lew, A.K., Hutchinson, A., Amaya, M.F., Plotnikova, M.F., Vedadi, O., and Kozieradzki, M. (2009). Crystal structure of N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* Hsp90 (PF14_0417) in complex with AMPPN.
79. Pizarro, J.C., Hills, T., Senisterra, G., Wernimont, A.K., Mackenzie, C., Norcross, N.R., Ferguson, M.A.J., Wyatt, P.G., Gilbert, I.H., and Hui, R. (2013). Exploring the *Trypanosoma brucei* Hsp83 Potential as a Target for Structure Guided Drug Design. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2492.
80. Pratt, W.B., Gestwicki, J.E., Osawa, Y., and Lieberman, A.P. (2015). Targeting Hsp90/Hsp70-Based Protein Quality Control for Treatment of Adult Onset Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 55, 353–371.
81. Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1997). Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone. *Cell* 90, 65–75.
82. Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress and Chaperones* 21, 379–404.
83. Ready, P.D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 15, 19505.

84. Ren, J., Li, J., Wang, Y., Chen, W., Shen, A., Liu, H., Chen, D., Cao, D., Li, Y., Zhang, N., et al. (2014). Identification of a new series of potent diphenol HSP90 inhibitors by fragment merging and structure-based optimization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 2525–2529.
85. Ribeiro, V., Dias, N., Paiva, T., Hagström-Bex, L., Nitz, N., Pratesi, R., and Hecht, M. (2019). Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 12, 7–17.
86. Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1, 97–98.
87. Roy, N., Nageshan, R.K., Ranade, S., and Tatu, U. (2012). Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 707–711.
88. Sahasrabudhe, P., Rohrberg, J., Biebl, M.M., Rutz, D.A., and Buchner, J. (2017). The Plasticity of the Hsp90 Co-chaperone System. *Molecular Cell* 67, 947-961.e5.
89. Scheibel, T., Neuhofen, S., Weikl, T., Mayr, C., Reinstein, J., Vogel, P.D., and Buchner, J. (1997). ATP-binding Properties of Human Hsp90. *J. Biol. Chem.* 272, 18608–18613.
90. Schopf, F.H., Biebl, M.M., and Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 345.
91. Sharp, S.Y., Prodromou, C., Boxall, K., Powers, M.V., Holmes, J.L., Box, G., Matthews, T.P., Cheung, K.-M.J., Kalusa, A., James, K., et al. (2007). Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinolic pyrazole/isoxazole amide analogues. *Mol Cancer Ther* 6, 1198–1211.
92. Sönmez, S., Wiitala, J., and Apostolopoulos, Y. (2019). How complex travel, tourism, and transportation networks influence infectious disease movement in a borderless world. *Handbook of Globalisation and Tourism*.
93. Spence, J., Cegielska, A., and Georgopoulos, C. (1990). Role of Escherichia coli heat shock proteins DnaK and HtpG (C62.5) in response to nutritional deprivation. *Journal of Bacteriology* 172, 7157–7166.
94. Sterrenberg, J.N., Blatch, G.L., and Edkins, A.L. (2011). Human DNAJ in cancer and stem cells. *Cancer Letters* 312, 129–142.
95. Taipale, M., Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010a). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 515–528.
96. Tassone, G., Mangani, S., Botta, M., and Pozzi, C. (2018a). Probing the role of Arg97 in Heat shock protein 90 N-terminal domain from the parasite Leishmania braziliensis through site-directed mutagenesis on the human counterpart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1866, 1190–1198.
97. Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N.F., Ralph, S.A., and Fidock, D.A. (2016). Artemisinin Action and Resistance in Plasmodium falciparum. *Trends in Parasitology* 32, 682–696.
98. Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M.A., and Pécou, B. (2010). Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 4.
99. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras [interaktyvus] [žiūrėta 2020-04-13]. Adresas: <http://www.ulac.lt/>.

100. Walter, S., and Buchner, J. (2002). Molecular Chaperones—Cellular Machines for Protein Folding. *Angewandte Chemie International Edition* 41, 1098–1113.
101. Wang, Y. (2017). Introduction to Parasitic Disease. In *Radiology of Parasitic Diseases: A Practical Approach*, H. LI, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 3–3.
102. Wernimont, A.K., Tempel, W., Lin, Y.H., and Hutchinson, A. (2009). Crystal structure of the amino-terminal domain of HSP90 from *Leishmania major*, LmjF33.0312:M1-K213.
103. Wernimont, A.K., Tempel, A.K., and Hutchinson, A. (2010a). Crystal Structure of the N-terminal domain of an HSP90 from *Plasmodium Falciparum*, PFL1070c in the presence of a thienopyrimidine derivative.
104. Wernimont, A.K., Tempel, A.K., Lin, Y.H., and Hutchinson, A. (2010b). Crystal structure of the amino-terminal domain of HSP90 from *Leishmania major*, LMJF33.0312:M1-K 213 in the presence of 17-AEP-geldanamycin.
105. Wernimont, A.K., Tempel, A.K., and Lin, Y.H. (2010c). Crystal structure of the amino-terminal domain of HSP90 from *Leishmania major*, LMJF33.0312:M1-K213 in the presence of 17-DMAP-geldanamycin.
106. Wernimont, A.K., Tempel, A.K., Lin, Y.H., and Hutchinson, A. (2010d). Crystal structure of the amino-terminal domain of HSP90 from *Leishmania major*, LMJF33.0312:M1-K213 in the presence of an inhibitor.
107. WHO | World Health Organization (2020). Neglected tropical diseases. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-25]. Adresas: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.
108. WHO | World Health Organization (2019). Dracunculiasis (guinea-worm disease). [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-30]. Adresas: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dracunculiasis-\(guinea-worm-disease\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dracunculiasis-(guinea-worm-disease)).
109. WHO | World Health Organization (2020). Leishmaniasis. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-30]. Adresas: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
110. WHO | World Health Organization (2020). Fact sheet about Malaria. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-30]. Adresas: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
111. WHO | World Health Organization (2018). Overview of malaria treatment. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-03-30]. Adresas: <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/>.
112. WHO | World Health Organization (2015). Toxoplasmosis Factsheet. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-04-03]. Adresas: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/294599/Factsheet-Toxoplasmosis-en.pdf?ua=1.
113. WHO | World Health Organization (2020). Human African trypanosomiasis. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-04-05]. Adresas: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)).
114. WHO | World Health Organization (2020). Chagas disease. [interaktyvus] [žiūrėta 2020-04-09]. Adresas: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
115. Wiesgigl, M., and Clos, J. (2001). Heat Shock Protein 90 Homeostasis Controls Stage Differentiation in *Leishmania donovani*. *MBoC* 12, 3307–3316.
116. Wu, J., Liu, T., Rios, Z., Mei, Q., Lin, X., and Cao, S. (2017). Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 38, 226–256.

117. Zügel, U., and Kaufmann, S.H.E. (1999). Role of Heat Shock Proteins in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 19–39.