



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Botanikos ir genetikos katedra

Aistė Lisavičiūtė

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

**Sulietų rekombinantinių citokinų konstravimas ir
aktyvumo tyrimas**

Darbas atliktas VU Chemijos ir geomokslų fakultete

Darbo vadovė doc. dr. Ieva Plikusienė

Moksliniai konsultantai dr. Gintautas Žvirblis ir dr. Milda Plečkaitytė

Vilnius, 2020

TURINYS

SANTRUMPOS	3
IVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1 Granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF).....	6
1.1.1 Funkcijos ir panaudojimas medicinoje	6
1.1.2 G-CSF taikymo problemos	8
1.2 Kamieninių ląstelių faktorius (SCF).....	9
1.3 Kombinuota G-CSF ir SCF terapija.....	12
1.4 Sulieti baltymai.....	13
1.4.1 Sulietų baltymų savybės ir sudėtis.....	13
1.4.2 Sulieti G-CSF baltymai.....	15
1.5 Visiško vidaus atspindžio elipsometrija (VVAE)	16
1.5.1 Metodo principas ir panaudojimas baltymų kinetikoms tirti	16
1.5.2 Baltymų sąveikos kinetiniai modeliai.....	18
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	20
2.1 Medžiagos	20
2.1.1 Medžiagos ir reagentai.....	20
2.1.2 Naudoti prietaisai.....	22
2.2 Metodai	22
2.2.1 Kompetentinių ląstelių paruošimas.....	22
2.2.2 GCSF/L α /SCF geno konstravimas	23
2.2.3 Rekombinantinio baltymo ekspresijos indukcija.....	26
2.2.4 Rekombinantinių baltymų renatūracija ir gryninimas	26
2.2.5 Baltymų sąveikos su receptoriais analizė naudojant VVAE.....	27
3. REZULTATAI	29
3.1 GCSF/L α /SCF geno konstravimas	29
3.2 Rekombinantinio baltymo ekspresijos indukcija.....	32
3.3 Baltymų aktyvumo analizė naudojant VVAE.....	33
4. REZULTATŲ APTARIMAS	38
IŠVADOS	41
SANTRAUKA	42
SUMMARY	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS	44

SANTRUMPOS

- 11-MUR – 11-merkaptoundekanoinė rūgštis
- APS – amonio persulfatas
- CSF3R – granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus receptorių
- CTP – karboksi-galo peptidas
- DTT – 1,4-ditiotreitolis
- EDC – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas
- G-CSF, GCSF – granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius
- G-CSFR, GCSF-R – granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus receptorių
- HAP – homoamino rūgšties polimeras
- HSA – žmogaus serumo albuminas (*angl.*, human serum albumin)
- IFN – interferonas
- IL – interleukinas
- IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktozidas
- LB – Luria-Bertani terpė
- LPS – lipopolisacharidas
- NDS – natrio dodecilsulfatas
- NHS – N-hidroksisukcinimidas
- PAS – prolino-alanino-serino polimeras
- PBS – fosfatinio buferio tirpalas (*angl.*, phosphate buffered saline)
- PEG – polietilenglikolis
- PPR – paviršiaus plazmoninis rezonansas
- SAM – savitvarkis monosluoksnis
- SCF – kamieninių ląstelių faktorius (*angl.*, stem cell factor)
- TAE – Tris-acetato-EDTA
- TEMED – tetrametiletilendiaminas
- VVAE – visiško vidaus atspindžio elipsometrija

ĮVADAS

Citokinai – tai baltymai, kurie yra labai svarbūs imuninei sistemai ir reguliuoja hemopoetinių ląstelių dauginimąsi ir diferenciaciją (Ekmekcioglu ir kt., 2014). Dėl šių savo savybių įvairūs citokinai yra naudojami medicinoje terapiniais tikslais gydant infekcines, uždegimines, autoimunines ar piktybines ligas (Vazquez-Lombardi ir kt., 2013). Vieni iš jų yra granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF) ir kartu su juo sinergetiškai veikiantis kamieninių ląstelių faktorius (SCF) (Ekmekcioglu ir kt., 2014).

G-CSF dalyvauja hemopoezėje ir geba padidinti baltųjų kraujo kūnelių skaičių, todėl jis yra plačiai naudojamas neutropenijos, kartais kitų kraujo sutrikimų atvejais bei mobilizuojant kamienines ląsteles transplantacijai (Ekmekcioglu ir kt., 2014). Ir nors šis citokinas yra pakankamai efektyvus, jis turi tokių trūkumų, kaip trumpa pusėjimo trukmė, dėl ko reikalingos dažnos šio vaisto injekcijos (Scholz ir kt., 2012), nepakankamas kamieninių ląstelių mobilizavimas transplantacijai (Hopman ir DiPersio, 2014) ar pacientų nejautrumas jam (Takami ir kt., 1999; Triot ir kt., 2014).

G-CSF poveikis hemopoetinėms ląstelėms padidėja kombinuojant jį su SCF, kuris taip pat dalyvauja hemopoezėje – stimuliuoja primityvių hemopoetinių ląstelių proliferaciją (Morstyn ir kt., 2004). Kombinuota terapija turi didesnę poveikį, tačiau neišsprendžia pusėjimo trukmės problemos. Ją prailginti galima būtų baltymus suliejant – chimerinio baltymo dydis bei masė būtų didesni ir todėl jo pašalinimas iš organizmo lėtesnis (Strohl, 2015). G-CSF jau buvo sulietas su tokiais junginiais, kaip polietilenglikolis (PEG) ar žmogaus serumo albuminas (HSA), tačiau jie turi savų trūkumų, pavyzdžiui, PEGilintas G-CSF potencialiai gali kauptis audiniuose ir ląstelėse. Dėl šios priežasties toliau yra ieškoma saugesnių ir veiksmingesnių chimerinių baltymų alternatyvų (Baumann ir kt., 2014; Kroschinsky ir kt., 2008; Zhao ir kt., 2013). Suliejus G-CSF ir SCF būtų galima tikėtis gauti efektyviau veikiantį baltymą, turintį didesnę poveikį hemopoezei bei ilgesnę pusėjimo trukmę.

Vienas iš baltymų aktyvumo tyrimams tinkamų metodų yra visiško vidaus atspindžio elipsometrijos (VVAE) metodas. Sukonstravus optinį imuninį jutiklį, paremtą šiuo metodu, galima stebėti sąveiką tarp analizuojamo baltymo ir jo receptoriaus realiu laiku, o pagal matavimų duomenis apskaičiuoti asociacijos konstantas (Balevicius ir kt., 2014). Šis metodas gerai tinka baltymų sąveikos tyrimams, kadangi jis pasižymi dideliu jautriu, yra neardantis, nereikalauja molekulių žymėjimo todėl analizuojami baltymai neturi būti pažymėti jokiais žymėmis, kurios gali paveikti jo aktyvumą (Wang ir kt., 2019). VVAE metodu išanalizavus

chimerinių baltymų jungimosi su receptoriais kinetiką ir apskaičiuvus asociacijos konstantas, galima juos palyginti su monomeriniais baltymais. Tokia informacija gali būti panaudojama baltymų aktyvo įvertinimui ir sąveikos tarp biomolekulių mechanizmų išaiškinimui.

Darbo tikslas:

Sukonstruoti naują sulietą rekombinantinį GCSF/L α /SCF baltymą ir ištirti jo bei SCF/L α /GCSF baltymo aktyvumą ir sąveiką su receptoriais.

Darbo uždaviniai:

1. Iš turimų GCSF/L α /GCSF ir SCF/L α /GCSF genų sukonstruoti GCSF/L α /SCF baltymo geną.
2. Sukurti imuninį jutiklį receptoriaus-ligando sąveikos tyrimui VVAE metodu.
3. VVAE metodu išmatuoti SCF/L α /GCSF ir GCSF/L α /SCF baltymų sąveikos su G-CSF ir SCF receptoriais kinetiką, o SCF – tik su SCF receptoriumi ir GCSF/L α /GCSF – tik su GCSF receptoriumi, pritaikyti matematinius modelius asociacijos ir disociacijos greičio konstantų apskaičiavimui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Citokinai G-CSF ir SCF yra baltymai, kurie veikia sinergetiškai ir gali reguliuoti įvairius atsakus žmogaus organizme, tokius kaip hemopoezė, todėl juos galima pritaikyti medicinoje. Vienas iš taikomų metodų, skirtų tokių baltymų terapinių savybių patobulinimui, yra sulietų baltymų kūrimas. Dėl to yra svarbu apžvelgti G-CSF ir SCF funkcijas bei jų panaudojimą medicinoje ir tam tikras problemas, išskylančias vartojant G-CSF. Taip pat aptarti sulietų baltymų kūrimą ir strategijas bei VVAE tyrimo metodo principą, kuriuo galima matuoti baltymų sąveikos kinetikas ir taip įvertinti jų aktyvumą.

1.1 Granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF)

1.1.1 Funkcijos ir panaudojimas medicinoje

Granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF arba GCSF, *angl.* granulocyte-colony stimulating factor) – tai citokinas, sudarytas iš 174 aminorūgščių, kurio molekulinė masė yra 18,8 kDa. Natūraliai žmogaus organizme gaminamo šio baltymo molekulinė masė dėl glikozilavimo yra 19,6 kDa (Geissler ir kt., 2018). G-CSF yra gaminamas endotelinų ląstelių, fibroblastų, monocitų ir makrofagų (Root ir Dale, 1999). Jis aptinkamas įvairiuose audiniuose, tačiau daugiausia reguliuoja neutrofilų funkcijas, kurios yra svarbūs įgimtai imuninei sistemai ginantis nuo patogenų (Beekman ir Touw, 2010). Jis atlieka tokias funkcijas kaip neutrofilų mobilizavimas iš kaulų čiulpu, dalijimosi, diferenciacijos ir brendimo indukcija, išgyvenimo užtikrinimas (Cetean ir kt., 2015; Metcalf, 2008).

G-CSF funkcionuoja sąveikaudamas su homodimeriniu, ant ląstelių paviršiaus lokalizuotu receptoriu, vadinamu G-CSFR. Kai jis prisijungia prie receptoriaus, vyksta dimerizacija ir susidaro kompleksas iš dviejų G-CSF ir dviejų G-CSFR molekulių. Po to iš karto yra indukuojamas ląstelinis atsakas, kuris gali trukti tiek kelias minutes, tiek turėti ilgalaikį poveikį, kuris yra efektyvus kelias dienas. G-CSF receptorių randamas ant įvairių ląstelių, bet dažniausiai ant hemopoetinių kamieninių ląstelių ir mieloidinių progenitorinių ląstelių (Geissler ir kt., 2018). Jis labiausiai yra ekspresuojamas ant bręstančių neutrofilų – kuo labiau subrendęs neutrofilas yra, tuo G-CSFR skaičius ant jo didesnis (Root ir Dale, 1999). Taip pat mažesniais kiekiais receptorių randama ant neuronų galvos ir nugaros smegenyse. Jie indukuoja neurogenezę, padidina neuroplastiškumą ir sumažina apoptozę. Dar G-CSFR randamas ant endotelinų ląstelių, kardiomiocitų ir placentinio audinio (Liongue ir Ward, 2016).

Įprastai G-CSF koncentracija kraujo plazmoje būna nedidelė, tačiau ji padidėja infekcijos metu. Jo sintezę gali indukuoti įvairūs uždegimo mediatoriai: bakterijų lipopolisacharidas (LPS), interferonas (IFN)- β , interleukinas (IL)-17 ir kt. G-CSF prisijungus prie receptoriaus aktyvuojami tokie signalinimo mechanizmai, kaip Janus tirozino kinazių (JAK) ir traskripcijos (STAT) baltymų aktyvacija, ras-MAP kinazės kelio aktyvacija ir kt., lemiantys granulocitų funkcijų reguliaciją (Bendall ir Bradstock, 2014; Cetean ir kt., 2015). In vitro paveikus neutrofilus su G-CSF, stebimi tokie pokyčiai, kaip padidėjęs receptorių, reikalingų adhezijai ir fagocitozei, kiekis, taip pat sustiprėjęs chemotaktinis atsakas ir didesnis mikrobicidinis aktyvumas bei nuo antikūnų priklausomas ląstelinis citotoksiškumas (Root ir Dale, 1999).

G-CSF medicinoje daugiausiai naudojamas įvairių tipų neutropenijos gydymui, kuri pasižymi neutrofilų skaičiaus sumažėjimu ir tokių komplikacijų kaip aukšta temperatūra, infekcijos, bakteremija, sepsis, atsiradimu (Dale, 2009). Pirmasis G-CSF pritaikymo būdas buvo vėžio pacientams – chemoterapijos indukuotos neutropenijos ir atsirandančių infekcijų sumažinimui. Kadangi chemoterapija slopina neutrofilų gamybą (Vanz ir kt., 2008), pacientams išsivysto sunki 3 arba 4 lygio neutropenija arba fibrilinė neutropenija, dėl kurios ypač padidėja imlumas įvairioms infekcijoms. G-CSF padeda sušvelninti neutropenijos lygį bei sutrumpinti trukmę, todėl sumažinamas antibiotikų vartojimas ir hospitalizacijos trukmė (Almenar ir kt., 2009; Bendall ir Bradstock, 2014) bei mirties dėl infekcijų rizika (Cetean ir kt., 2015), kadangi neutrofilų skaičiaus atsistatymas prasideda anksčiau ir greičiau negu tai įvyktų natūraliai (Morstyn ir kt., 2004). Taip pat G-CSF yra naudojamas įgimtos, įgytos, ciklinės ir idiopatinės neutropenijos gydymui (Bendall ir Bradstock, 2014). Sunki įgimta ir ciklinė neutropenijos yra sukeltos tam tikrų mutacijų genome ir todėl išlieka visą gyvenimą. Kol nebuvo atrastas G-CSF, ciklinės neutropenijos diagnozė reiškė nuolatinį infekcijų pavojų, o sunkios įgimtos – ankstyvą mirtį (Donadieu ir kt., 2011), tačiau dabar vartojant G-CSF galima išlaikyti normalų neutrofilų kiekį (Bendall ir Bradstock, 2014).

G-CSF gali būti pritaikytas ne tik neutropenijos gydymo atvejais. Jis kartais gali būti naudojamas kitiems hemopoezės sutrikimams gydyti: aplastinė anemija bei mielodisplazinis sindromas. Aplastinė anemija gydoma tik sunkiais atvejais ir tik truputį sušvelninant simptomus. Be to, G-CSF yra pritaikomas hemopoetinių kamieninių ląstelių mobilizacijai prieš chemoterapiją tam, kad būtų atlikta jų autologinė (savų ląstelių) transplantacija pacientams, sergantiems daugybine mieloma ir ne Hodžkino limfoma, po gydymo arba lygiai taip pat atliekama alogeninė (kito žmogaus) ląstelių transplantacija. Tradiciškai ląstelės transplantacijai surenkamos iš dubens kaulo, tačiau naudojant G-CSF tai galima padaryti daug

paprasciau – tiesiog paimant kraujo (Bendall ir Bradstock, 2014). Dar vienas G-CSF pritaikymas chemoterapijos metu yra tam, kad būtų padidintas vėžinių ląstelių chemojautrumas (Cetean ir kt., 2015).

Taip pat yra tiriami G-CSF panaudojimo būdai ir kitose srityse. Yra pastebėtas teigiamas jo poveikis jį pritaikius reprodukciniėje medicinoje – moterims, kurios negali pastoti arba visada patiria persileidimus (Rahmati ir kt., 2015). Jis taip pat turi potencialo būti naudojamas ūmaus miokardo infarkto atveju, kadangi yra nustatytas apsauginis efektas nuo ląstelių apoptozės pažeistame miokarde (Cetean ir kt., 2015). Kitas poveikis – raumenų regeneracija. Parodyta, jog G-CSF yra ekspresuojamas ant mioblastų, todėl G-CSF geba stimuliuoti skeletinių raumenų bei miokardo miocitų atsistatymą po pažeidimo (Hara ir kt., 2011; Liongue ir Ward, 2016). Šis citokinas taip pat turi aktyvuojantį efektą kai kuriems nervų sistemą apsaugantiems keliams – angiogenezės iniciacijai, priešūždegiminiui ir priešapoptotiniui efektams (Cetean ir kt., 2015). G-CSF pasižymi savybe stimuliuoti neuroninių kamieninių ląstelių išgyvenimą, proliferaciją ir vystymąsi (Liongue ir Ward, 2016). Dėl to jis potencialiai galėtų būti naudojamas neurologinių sutrikimų terapijai, pavyzdžiui, insulto, neuronų pažeidimų ar net Parkinsono ligos atvejais, jeigu jis būtų vartojamas ankstyvoje sutrikimų stadijoje. Taip pat yra ištirtas jo poveikis infekcijoms, kurios atsiradusios neutropenijos neturintiems pacientams: pneumonijai, diabetinėms kojų infekcijoms, žaizdoms ir grybinėms infekcijoms (Cetean ir kt., 2015).

Šiuo metu yra naudojami keli rekombinantinio G-CSF pagrindu gaminami vaistai, naudojami neutropenijos gydymui tokie, kaip filgrastimas, lenograstimas, nartograstimas, pegfilgrastimas ir kt. (Kroschinsky ir kt., 2008). Šie junginiai skiriasi savo struktūra, pavyzdžiui, lenograstimas yra visiškai identiškas žmogaus organizme gaminamui G-CSF, o filgrastimas yra beveik toks pats, tik jis N-gale turi metioniną ir yra neglikozilintas (Vanz ir kt., 2008). Pegfilgrastimo atveju, prie G-CSF yra kovalentiškai prijungtas polietilenglikolis (PEG) ir dėl to pailgėja jo pusėjimo trukmė lyginant su anksčiau minėtais vaistais. Kiekvienas iš jų yra veiksmingas, bet turi savo trūkumų, todėl yra ieškoma, kaip galima būtų pagerinti G-CSF biologines ir terapines savybes (Molineux, 2004).

1.1.2 G-CSF taikymo problemos

Nors ir jau turimi iš G-CSF sukurti vaistai geba gana efektyviai gydyti neutropeniją, jie turi tam tikrų trūkumų. Filgrastimas iš organizmo pašalinamas tiek išfiltruojant per inkstus, tiek specifinės degradacijos būdu (Scholz ir kt., 2012). Dėl to jo pusėjimo trukmė yra labai

trumpa ir pacientams yra reikalingos kasdieninės injekcijos. Tai yra gana nepatogu, be to, jos gali būti sunkiau prieinamos žmonėms gyvenantiems toliau nuo gydymo įstaigų arba savaitgaliais, todėl pacientai injekcijas turi atlikti patys arba jas praleisti (Molineux, 2004). Modifikuota filgrastimo versija – pegfilgrastimas – išlieka organizme ilgiau, kadangi prijungtas PEG sumažina jo pašalinimą per inkstus, todėl injekcijų prireikia mažiau (Scholz ir kt., 2012). Tačiau, nors pegfilgrastimas veikia ilgiau, jį vartojantys pacientai patiria sunkesnius šalutinius poveikius, negu vartojantys filgrastimą (Kroschinsky ir kt., 2008). Taip pat manoma, jog baltymai, turintys PEG, turi potencialą kauptis audiniuose ir ląstelėse, kadangi lizosominiai fermentai geba efektyviai suskaldyti baltymą, tačiau PEG – daug skaido daug sunkiau (Baumann ir kt., 2014).

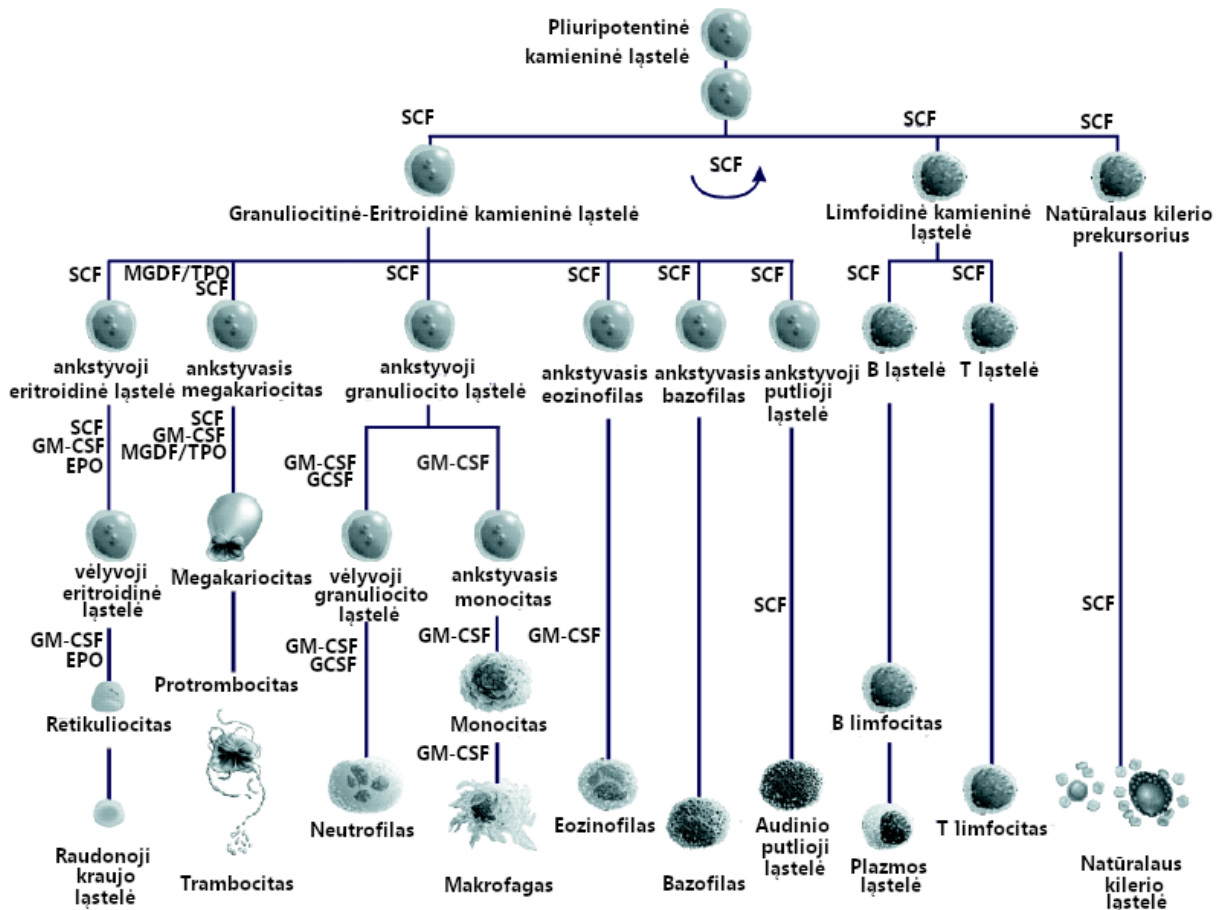
Dar viena problema, su kuria susiduriama gydant neutropeniją, naudojant G-CSF yra ta, kad kai kurie žmonės yra jam nejautrūs, todėl šis gydymo būdas būna neveiksmingas. Nejautrumas G-CSF dažniausiai pasireiškia sunkia įgimtą neutropeniją turintiems pacientams. 90 % žmonių, segančių šia liga, toks gydymas būna tinkamas (Germeshausen ir kt., 2008), tačiau tie, kurie turi kai kurias mutacijas, esančias G-CSF receptoriaus gene *CSF3R*, yra nejautrūs G-CSF (Sinha ir kt., 2003; Triot ir kt., 2014). Vienintelis šiuo metu esantis tokių pacientų gydymo būdas yra hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija (Germeshausen ir kt., 2008). Kai kuriais atvejais žmonių atsakas į G-CSF būna ne visiškai sutrikęs, tačiau nepakankamai efektyvus, todėl jiems reikia milžiniškų G-CSF dozių, kad būtų padidintas neutrofilų skaičius. Dėl šios priežasties įprastas neutropenijos gydymas naudojant G-CSF gali būti neveiksmingas (Takami ir kt., 1999).

Taip pat kartais iškyla problema, kuomet norima atlikti autologinę arba alogeninę hemopoetinių ląstelių transplantaciją. Apie 35 % pacientų organizmuose nebūna pasiekiamas pakankamas ląstelių kiekis, reikalingas transplantacijai, naudojant vien tik G-CSF. Todėl yra ieškoma efektyvių citokinų kombinacijų, kad būtų išspręsta ši problema (Hopman ir DiPersio, 2014).

1.2 Kamieninių ląstelių faktorius (SCF)

Kamieninių ląstelių faktorius (SCF, *angl.* stem-cell factor), dar vadinamas putliųjų ląstelių augimo faktoriumi, kit ligandu arba c-kit ligandu, yra citokinas, svarbus hemopoezei, ypač ankstyvosiose stadijose (**1.2.1 pav.**), ir taip pat melanocitų bei gametocitų gamybai (Dehbashi ir kt., 2017). SCF ekspresuojamas fibroblastų ir endotelinių ląstelių visame

organizme. Jis stimuliuoja hemopoetinių ir lytinių ląstelių bei melanocitų išgyvenimą, migraciją, proliferaciją ir diferenciaciją (Lennartsson ir Rönnstrand, 2012).



1.2.1 pav. Schema, vaizduojanti SCF ir G-CSF bei kai kurių kitų citokinių poveikį skirtingų kraujo ląstelių susidarymui (Morstyn ir kt., 2004)

SCF organizme egzistuoja dvejomis izoformomis – membranine (mSCF) ir tirpia (sSCF) (Zhang ir kt., 2000). Membraninis SCF yra 45 kDa molekulinės masės ir 248 aminorūgščių glikoproteinas, kuris lokalizuotas ląstelės membranoje. Kai jis yra perskeliamas proteazių, susidaro sSCF, kuris yra 31 kDa molekulinės masės ir sudarytas iš 163 aminorūgščių (Dehbashi ir kt., 2017). Abi šios izoformos geba jungtis prie c-Kit (SCF receptoriaus) ir aktyvuoti jo tirozino kinazinį aktyvumą, skiriasi tik jų kokybinis ir kiekybinis signalo perdavimas (Lennartsson ir Rönnstrand, 2012). Tirpi SCF forma funkcionuoja kaip nekovalentinis homodimeras, sudarytas iš dviejų protomerų. Fiziologinėmis sąlygomis jis dažniausiai būna monomeras, o jo dimerizacija reguliuoja jungimosi prie receptoriaus afiniškumą ir pačio receptoriaus dimerizaciją bei aktyvavimą (Zhang ir kt., 2000), kuris yra

ekspresuojamas ant putliųjų ląstelių, melanocitų, lytinių ląstelių, neuronų ir ankstyvų hemopoetinių ląstelių (Costa, 1998).

Kadangi c-Kit receptorius randamas ant kelių ląstelių tipų, SCF turi įtaką įvairiems organizme vykstantiems procesams. Ankstyvųjų hemopoetinių ląstelių išgyvenimas ir diferenciacija priklauso nuo SCF, todėl sutrikus jo ekspresijai stebimi eritrocitų, megakariocitų ir putliųjų ląstelių vystymosi defektai ir neutrofilų bei kitų linijų kraujo ląstelių skaičiaus sumažėjimas. Gyvūnams suleidus SCF jų kraujyje stebimas padidėjęs baltųjų kraujo kūnelių ir trombocitų pagausėjimas (Morstyn ir kt., 2004). Taip pat, dėl jo įtakos melanocitams, jis reikalingas normaliam epidermio pigmentacijos susidarymui. Dar SCF ekspresijos sutrikimas pelėse sukelia joms sumažėjusį vaisingumą ar visišką nevaisingumą, kadangi jis įprastai dalyvauja oogenezeje, folikogenezeje ir spermatogenezeje bei apsaugo ląsteles nuo apoptozės. Taip pat SCF yra svarbus neuroninėms kamieninėms ir progenitorinėms ląstelėms. Jis turi įtakos jų proliferacijai bei jų migracijai į pažeistas smegenų vietas. SCF dar atlieka kelias funkcijas širdies ir kraujagyslių sistemoje. Gyvūnų modeliai rodo, jog jis yra reikalingas kaulų čiulpų progenitorinių ląstelių mobilizavimui po išeminio širdies pažeidimo. Taip pat jis svarbus kardialinių kamieninių ląstelių diferenciacijai ir kardiomiocitų galutinės diferenciacijos reguliavimui. Ir dar yra duomenų, jog SCF gali būti reikalingas plaučių audinio vientisumui palaikyti. Šią funkciją jis galėtų atlikti reguliuodamas epitelinių progenitorinių ląstelių dalijimąsi ir taip apsaugodamas plaučių audinį nuo sunykimo (Lennartsson ir Rönstrand, 2012).

Klinikine prasme SCF gali būti naudingas dėl savo ypatingos savybės sinergetiškai veikti su kitais hemopoetiniais augimo faktoriais ir taip stimuliuoti primityvias ir nediferencijuotas ląsteles. Atlikti tyrimai rodo, jog SCF ir kitų hemopoetinių augimo faktorių (pvz., IL-6, G-CSF) kombinacija padidina kolonijų ir ląstelių skaičių kolonijose labiau, negu naudojant kiekvieną iš faktorių atskirai (Costa, 1998). Vienas iš pavyzdžių yra IL-2 reguliuojamas NK ląstelių dalijimasis blužnyje, kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje, kurį SCF sinergetiškai padidina (Morstyn ir kt., 2004). Daugiausia SCF sinergetinis poveikis yra ištirtas rekombinantinį SCF – ancestorinę – naudojant su filgrastimu tam, kad būtų mobilizuotos hemopoetinės kamieninės ląstelės transplantacijai ir yra parodyta, jog jis efektyviau padidina ląstelių kiekį, negu naudojant tik G-CSF (Hopman ir DiPersio, 2014). Taip pat, yra tikėtina, kad in vivo SCF galėtų palaikyti granuliopoezę be G-CSF per granuliopoezės kelius, dalinai reguliuojamus kitų citokinų (pvz., GM-CSF) (Molineux ir kt., 2012).

1.3 Kombinuota G-CSF ir SCF terapija

G-CSF ir SCF sinergetiškai reguliuoja gana daug svarbių biologinių atsakų. Kaip jau buvo minėta, kartu šie citokinai labiau padidina hemopoetinių ląstelių mobilizavimą, negu juos naudojant atskirai. Ancestimo ir filgrastimo kombinacija gali nuo dviejų iki trijų kartų padidinti ląstelių, kurias galima surinkti transplantacijai, skaičių (Morstyn ir kt., 2004). Tai yra ypač svarbu kalbant apie žmones, kurie yra „prasti mobilizuotojai“ ir kuriems reikia atlikti šių ląstelių transplantaciją. Teigiamas G-CSF ir SCF kombinacijos rezultatas matomas viename tyrime, kuriame dalyvavo pacientai, sergantys mieloma, ne Hodžkino ir Hodžkino limfoma, lėtine limfocistine leukemija ir keli, turintys kietų auglių - jiems visiems, naudojant tik G-CSF, nesukėlė pakankamo kamieninių ląstelių mobilizavimo. Panaudojus G-CSF ir SCF kombinaciją 31 % šių pacientų pasiekė reikalingą ląstelių kiekį transplantacijai (Hopman ir DiPersio, 2014). Šis efektas taip pat matomas ir krūties vėžio bei daugybinės mielomos pacientų atveju (Duarte ir Frank, 2002). Teigiamą jų sinergetinį poveikį rodo ir tyrimai graužikuose. Stebimas periferinio kraujo neutrofilų ir progenitorinių ląstelių skaičiaus padidėjimas, taip pat aktyvesnė blužnies granuliopezė, eritropoezė ir megakariocitopoezė. Taip pat pelėse G-CSF ir SCF kombinacija pagreitina granulocitų kiekio atsistatymą po poveikio chemoterapiniu vaistu ciklofosfomidu (Morstyn ir kt., 2004).

G-CSF ir SCF taip pat yra svarbūs centrinei nervų sistemai ir yra susiję su neuroniniu plastiškumu ir neurogeneze. Tyrimai su pelėmis rodo, jog G-CSF ir SCF naudojimas ūminio arba poūminio smegenų išėmijos (insulto) atveju efektyviai pagerina organizmo motorines ir smegenų funkcijas. Taip pat sumažinamas insulto lygis bei indukuojama didesnė neuronų regeneracija (Kawada ir kt., 2006). Šis kombinuotas gydymas taip pat gali būti tinkamas chroniško insulto atveju. Nustatyta, jog žiurkėse SCF+G-CSF suteikia stabilų ir ilgai trunkantį funkcinį pagerėjimą, kuomet atskirai juos naudojant šis efektas nėra matomas (Piao ir kt., 2012). Taip pat parodyta, jog smegenų ir motorikos atkūrimas naudojant G-CSF ir SCF matomas praėjus net 6 mėnesiams po insulto, kuomet fiziologinė reabilitacija laikoma jau nebeveiksminga (Cui ir kt., 2016). Dar ši kombinacija gali potencialiai būti pritaikyta hipoksinės išėmijos atveju, kuri sukelia labai didelius smegenų pažeidimus naujagimiams. Tyrime su žiurkėmis parodyta, jog tokia terapija padeda išvengti smegenų atrofijos ir pagerina neurologines funkcijas, kadangi sumažinamas smegenų audinio praradimas (Doycheva ir kt., 2013).

Kombinuota G-CSF ir SCF terapija potencialiai gali būti pritaikyta Alzheimerio ligos progresavimo sulėtinimui. Transgeniniuose šios ligos pelių modeliuose naudojant G-CSF ir

SCF matomas sumažintas β -amiloidų kiekis, kuris kaupiasi esant Alzheimerio ligai.

Smegenyse stebimas iš kaulų čiulpų kilusių mikroglijų ląstelių padidėjimas, kurios efektyviai fagocituoja ir pašalina β -amiloidų sankaupas (Li ir kt., 2011).

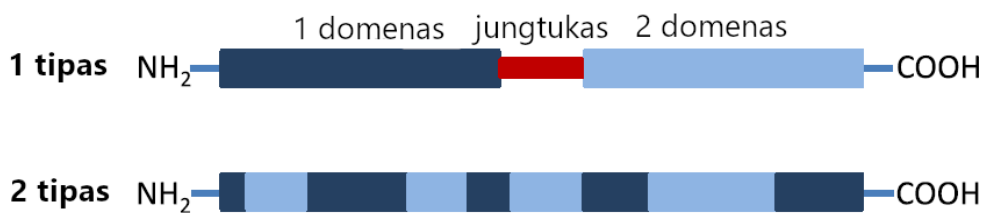
G-CSF ir SCF taip pat galėtų daryti teigiamą įtaką miokardui atsistatant po infarkto. Nustatyta, jog jų naudojimas du kartus padidina iš kaulų čiulpų kilusių ląstelių migraciją į pažeistą miokardą. Taip pat stebima padidėjusi kardiomiocitų hipertrofija pažeidimo kraštų zonoje. Dar toje vietoje G-CSF/SCF padidina arteriogenezę, dėl kurios deguonies ir maistinių medžiagų tiekimas tampa didesnis ir galimai todėl pagerėja kardialinė veikla. Taip pat nustatyta, jog G-CSF ir SCF turi apsauginį efektą, padedantį išvengti skilvelių aritmijos. (Kuhlmann ir kt., 2006)

1.4 Sulieti baltymai

1.4.1 Sulietų baltymų savybės ir sudėtis

Sulieti baltymai, dar vadinami chimeriniais, yra konstruojami in vitro genetinės inžinerijos pagalba suliejant dviejų arba daugiau baltymų genus ir juos įterpiant į tinkamus raiškos vektorius (Strohl, 2017).

Sulieti baltymai gali būti kuriami dviem būdais (**1.4.1.1 pav.**). Pirmasis tipas konstruojamas iš dviejų genų, iš kurių pirmojo 3' galo panaikinamas transkripcijos terminatorius, o iš antrojo 5' galo – promotorius (Strohl, 2017). Kuriant tokį baltymą kartais yra svarbi genų orientacija. Prie vieno baltymo galima prijungti kitą iš amino arba karboksilo grupių galo. Kai kuriais atvejais kažkuris specifinis galas gali būti reikalingas laisvas tam, kad būtų geras baltymo aktyvumas, ekspresija ir išgryninimas, todėl reikia atsižvelgti į konstruojamų genų tvarką (Schmidt, 2013). Taip pat kuriant sulietus baltymus, tarp suliejamų genų galima įterpti arba neįterpti jungtuko. Jeigu nusprendžiama jungtuką įterpti, svarbu gerai apgalvoti jo aminorūgščių sudėtį. Jis neturėtų susilankstyti taip, kad sulietų baltymų domenai trukdytų vienas kito aktyvumui. Įprastai tam yra naudojamas jungtukas, esantis spiralės sulinkusios formos. Taip pat jame neturi būti vietų, kurios yra jautrios proteolitiniam skaldymui (Fredriksson ir Bülow, 2001). Antrojo chimerinių baltymų tipo atveju yra pasirenkami du panašūs baltymai. Jie yra sujungiami kiekvieno iš jų fragmentus sumaišant tarpusavyje ir nesujungiant jungtuku (Strohl, 2017).



1.4.1.1 pav. Dviejų tipų sulietų baltymų struktūros (Strohl, 2017)

Šių genų raiška atliekama įvairiose ląstelėse. Tam dažniausiai naudojamos bakterijos, pvz., *Escherichia coli*, bei žinduolinių ląstelių linijos, pvz., CHO (Kininio žiurkėno kiaušidžių). Ekspresijos raiškos sistemos pasirinkimas labai priklauso nuo reikalingų baltymui savybių. Pavyzdžiui, glikozilinimas arba disulfidinių tiltelių sudarymas gali būti pasiekiamas tik eukariotinėse ląstelėse. Taip pat jose gaminami didesni nei 100 kDa baltymai. Jeigu baltymo funkcionalumui potransliacinės modifikacijos yra nebūtinės ir pats baltymas nėra labai didelis, galima rinktis pigesnę, greitesnę ir paprastesnę ekspresiją, kuri vyksta bakterijose (Schmidt, 2013). Pasirinktos ląstelės pirmojo tipo baltymų atveju pagamina vieną polipeptidinę grandinę, kuri turi abiejų genų produktus, todėl tokie baltymai būna daugiafunkciniai (Strohl, 2017). Dažniausiai viena iš sukurto baltymo dalių atlieka molekulinį atpažinimą arba jungimąsi, o kita suteikia papildomų savybių, tokių kaip prailginta pusėjimo trukmė, citotoksiškumas ir kt. (Schmidt, 2013). Antruoju būdu gaunamas baltymas turi vieną naują aktyvumą, o ne du, kaip pirmo tipo baltymas. Šis metodas gali būti pritaikytas kuriant fermentus, kurių katalitiniai centrai išdėstyti arčiau vienas kito pagal tai, kokia tvarka vyksta jų fermentinis procesas, tam, kad būtų pagerinta bendra kinetika (Strohl, 2017).

Chimeriniai baltymai, skirti farmakoterapijai, gali būti kuriami dėl įvairių priežasčių, tačiau yra išskiriamos trys svarbiausios. Pirmoji iš jų – baltymo pusėjimo trukmės prailginimas tam, kad būtų padidintas vaisto veikimo laikas (Strohl, 2017). Daug terapinių baltymų yra nedideli, todėl jie greitai išfiltruojami per inkstus, kurie geba pašalinti iki 70 kDa dydžio baltymus, arba jie yra suskaidomi peptidazių (Strohl, 2015). Tokiu atveju prie greitai pašalinamo farmakologiškai aktyvaus peptido yra prijungiamas kitas peptidas, dėl kurio pusėjimo trukmė pailgėja. Jis turi atitikti tokius reikalavimus, kaip žemas imunogeniškumas ir proteolizės lygis serume, prastas filtravimas per inkstų glomerules ir taip pat turėtų daryti kuo mažesnę neigiamą įtaką baltymui, prie kurio jis yra prijungtas, aktyvumui. Kitas sulietų baltymų kūrimo tikslas yra vaistų, turinčių poveikį tam tikroms specifinėms ląstelėms arba audiniams, gavimas. Kad būtų pasiektas šis efektas, domenas, kuris geba sąveikauti su taikininėmis ląstelėmis arba audiniu, jungiamas su farmakologiškai aktyviu baltymu arba

toksinu, jeigu siekiama taikinį sunaikinti. Trečioji priežastis yra daugiafunkcinių baltymų sukūrimas. Tam yra sujungiami du arba keli baltymai arba jų domenai, turintys skirtingus farmakologinius aktyvumus (Strohl, 2017). Taip pat, jie būna paskirstomi organizme vienodai, kuomet atskirų molekulių paskirstymas galėtų būti visiškai skirtingas (Schmidt, 2013).

Dažniausiai baltymų suliejimu sprendžiama pusėjimo trukmės problema. Tam yra naudojamos kelios strategijos. Pusėjimo trukmė gali būti prailginta genetiškai suliejant farmakologiškai aktyvų peptidą su baltymu arba jo domenu, kuris natūraliai turi ilgą pusėjimo trukmę, pvz. antikūnų Fc dalis arba albuminas. Taip pat galima genetiškai prijungti inertišką polipeptidą, pvz. homoamino rūgšties polimerą (HAP) arba prolino-alanino-serino polimerą (PAS). Baltymų pusėjimo trukmę taip pat gali pailginti neigiamo krūvio ir labai sializuoti peptidai, pvz. karboksi-galo peptidas (CTP; iš choriono gonadotropino (CG) β -grandinės). Baltymus galima sulieti ne tik genetiniu, bet ir cheminiu būdu – cheminės konjugacijos metodu prie peptidų galima prijungti ilgą pusėjimo trukmę turinčius baltymus, tokius, kaip IgG arba žmogaus serumo albuminas (HSA). Galima jungti ir tokius nebaltyminius junginius, kaip polietilenglikolis (PEG), kadangi padidinamas molekulės dydis, todėl pailgėja pusėjimo trukmė (Strohl, 2015).

1.4.2 Sulieti G-CSF baltymai

Įvairūs citokinai taip pat tobulinami konstruojant sulietus baltymus, tarp jų ir G-CSF. Kad būtų prailginta jo pusėjimo trukmė arba padidintas poveikis hemopoezei, jis buvo sulietas su HSA III domenu (Zhao ir kt., 2013), IgG1 Fc domenu (Cox ir kt., 2004; Do ir kt., 2017), PEG (Zamboni, 2003). Dar vienas G-CSF patobulinimo būdas buvo sujungiant jo monomerus ir taip sukonstruojant homodimerą (Mickiene ir kt., 2017). Taip pat jis yra buvęs sulietas su kitu citokinu – granulocitų ir makrofagų kolonijas stimuliuojančiu faktoriumi (GM-CSF), siekiant labiau padidinti jo efektyvumą stimuliuojant kaulų čiulpų ląsteles tikintis sinergetinio poveikio (Lee ir kt., 2013). Taip G-CSF buvo sulietas su žmogaus transferinu, kad būtų sukurtas mielopoetinis terapinis baltymas, kurį būtų galima vartoti per burną (Bai ir kt., 2005).

Su G-CSF sulieti baltymai geba efektyviai prailginti jo cirkuliavimo organizme pusėjimo laiką. Dėl prijungto HSA III domeno, pusėjimo trukmė padidėja gana nedaug – apie 1,6 karto palyginus su monomeriniu G-CSF. O tiriant šio sulieto baltymo poveikį baltųjų kraujo kūnelių skaičiui nustatyta, jog jis nesiskiria nuo paprasto G-CSF (Zhao ir kt., 2013). Didesnę įtaką jo farmakokinetinėms savybėms turi prijungtas Fc domenas ir PEG. G-

CSF/IgG1-Fc cirkuliavimo pusėjimo trukmė yra net nuo 5 iki 8 kartų ilgesnė. Taip pat in vivo tyrimuose žiurkėse stebimas didesnis baltųjų kraujo kūnelių bei neutrofilų skaičius nei suleidus G-CSF ir jis išsilaiko ilgiau (Cox ir kt., 2004). Tiriant pegfilgrastimo poveikį vėžiu sergantiems pacientams, nustatyta, kad jo vidutinis pusėjimo laikas yra apie 10 kartų didesnis nei G-CSF (Zamboni, 2003). Be to, neutropeniją turinčiose žiurkėse nustatyta, jog pegfilgrastimas padidina neutrofilų skaičių apie 2 kartus (Do ir kt., 2017).

Iš kelių citokinų sulieti baltymai taip pat rodo gerus rezultatus. Chimerinis G-CSF ir GM-CSF baltymas rodo padidėjusį teigiamą poveikį kaulų čiulpų ląstelėms. Nustatyta, jog jis geba padidinti ląstelių kolonijų skaičių iki 2 kartų (Lee ir kt., 2013). Taip pat, yra sukurti keli G-CSF homodimerai su skirtingais jungtukais, jungiančiais monomerus. Tinkamiausiu iš jų gryninimo ir aktyvumo in vitro (ląstelių kultūrose) prasme yra nustatytas $\text{L}\alpha$ (aminorūgščių seka: GLEA-(EAAAK)₄-ALEA-(EAAAK)₄-ALEGS) jungtuką turintis homodimeras. Jo pusėjimo trukmė yra virš 7 kartų didesnė negu monomerinio G-CSF ir tiek pat kartų lėčiau jis yra pašalinamas iš organizmo. Taip pat, žiurkėse 24 val. po homodimero įleidimo stebimas apie 1,8 karto didesnis neutrofilų kiekis negu monomero atveju (Mickiene ir kt., 2017). Ištyrus dimerinio G-CSF sąveiką su receptoriais nustatyta, jog jo asociacijos greičio konstanta yra 1,75 karto didesnė nei monomero, todėl jis jungiasi greičiau (Balevicius ir kt., 2014).

1.5 Visiško vidaus atspindžio elipsometrija (VVAE)

1.5.1 Metodo principas ir panaudojimas baltymų kinetikoms tirti

Baltymų sąveikos kinetikos tyrimui gali būti pritaikyta visiško vidaus atspindžio elipsometrija (VVAE). Tai yra optinis metodas, kuris gerai tinkama baltymų sąveikos kinetikos tyrimams, kadangi analizuojamų molekulių nereikia žymėti (Balevicius ir kt., 2014; Zigmantas Balevicius ir kt., 2019; Plikusiene ir kt., 2020). Kai kurie kiti baltymų analizės metodai reikalauja fluorescencinių, fermentinių arba radioaktyvių žymių, kurios gali pakeisti molekulės konformaciją ir taip paveikti jos aktyvumą, o ir pats žymėjimas gali užimti daug laiko (Wang ir kt., 2019). Taip pat, VVAE jautrumas ir efektyvumas stebint biomolekulių sąveikas parodytas įvairiais eksperimentais: tiriant DNR adsorbciją ir hibridizaciją, fiksuojant mažos molekulinės masės toksinus (Nabok ir Tsargorodskaya, 2008), antikūnų sluoksnio formavimąsi ir jų sąveiką su antigenais (Balevicius ir kt., 2011, Baleviciute 2013), chloroplastų receptorių ir baltymų sąveiką (Kriechbaumer ir kt., 2012), citokino G-CSF ir jo receptoriaus sąveiką (Balevicius ir kt., 2014) ir kt.

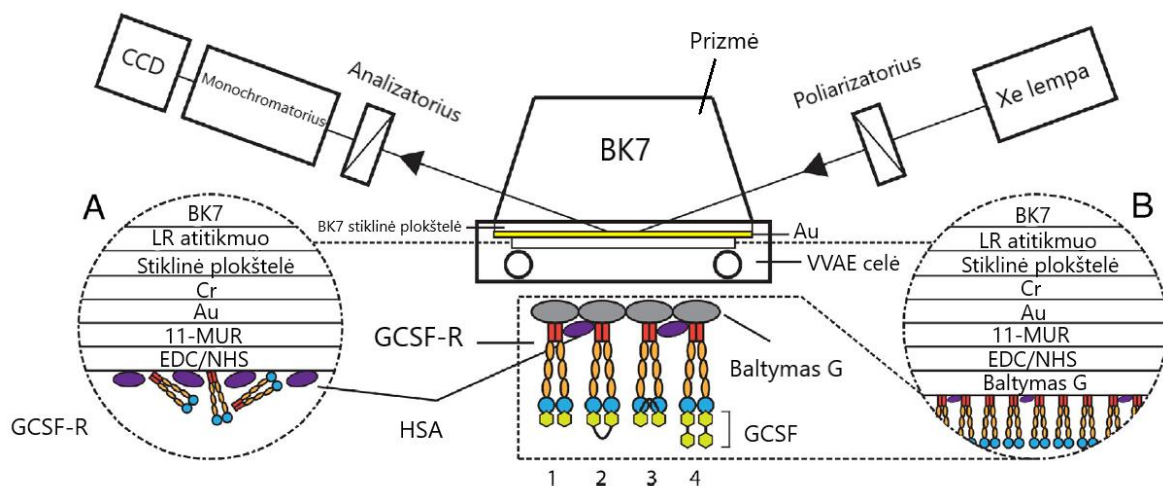
VVAE tai dviejų itin jautrių optinių metodų kombinacija. Spektroskopinės elipsometrijos (SE) ir paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) (Nabok ir Tsargorodskaya, 2008). Šis metodas turi daug privalumų, lyginant jį su tradiciniu PPR metodu, vienas iš šių privalumų yra didesnis matuojamų parametrų jautris (Nabok ir kt., 2006, Plikusiene ir kt., 2020). Visiškas vidaus atspindys susidaro, kai šviesa keliauja iš didesnį lūžio rodiklio terpės į mažesnį ir esant tam tikram kampui. Taip pat, kai tam tikro bangų ilgio šviesa tam tikru kampu keliauja ant plono metalo sluoksnio, esančio tarp dviejų skirtingų lūžio rodiklių terpių, susidaro PPR, kuriuo paremtas tuo pačiu pavadinimu pavadintas PPR metodas (Poksinski ir Arwin, 2004).

Naudojant VVAE matuojami du elipsometriniai parametrai Ψ ir Δ , nusakantys šviesos bangos amplitudę ir fazę atitinkamai. Kintant aplinkos lūžio rodikliui, kinta ir šie matuojami parametrai. VVAE metodas yra didesnio jautrio už įprastą PPR, kuris matuoja tik vieną parametą (šviesos amplitudės pokytį). Parametras Δ gali kisti nuo 0 iki 360 laipsnių, o Ψ nuo 0 iki 45 laipsnių, todėl matuojant abu parametrus gaunama detalesnė informacija ir didesnis jautris. Todėl VVAE yra geriau tinkamas molekulių adsorbcijos arba cheminių ar biologinių reakcijų ant paviršių tyrimui negu įprastas PPR (Nabok ir Tsargorodskaya, 2008).

Pati paprasčiausia VVAE eksperimento struktūra susideda iš stiklo plokštelės, padengtos plonu metalo (įprastai aukso, apie 50 nm) sluoksniu ir pritvirtintos prie stiklo prizmės, bei elipsometras. Kiti komponentai priklauso nuo to, kam šį metodą norima pritaikyti – papildomai gali būti naudojama tėkmės celė, tėkmės kontrolės sistema, pritaikymui specifinė duomenų gavimo bei sistemos kontrolės programinė įranga. Naudojama stiklo plokštelė turi būti tokio pačio lūžio rodiklio, kaip ir prizmė, o jas sujungus pilamas tą patį lūžio rodiklį atitinkantis skystis. Prizmės gali būti įvairių formų – trikampės, trapecinės ar pusinio cilindro. Formos pasirinkimas priklauso nuo reikalingo matavimams kampo. Baltymų tyrimams dažniausiai naudojama BK7 stiklo 70° prizmė, reikalinga sužadinti paviršiaus plazmonus. Taip pat, tam, kad būtų tiriami baltymai, stiklo plokštelė su prizme turi būti pritvirtinta prie tėkmės celės, į kurią prie stiklo plokštelės gali būti įleidžiamas skystyje esantis analizuojamas baltymas ir po to iš jos išbėga. Visi VVAE matavimai atliekami naudojant spektinį elipsometrą (Poksinski ir Arwin, 2006).

Naudojant VVAE galima tirti sąveiką tarp skirtingų biomolekulių, pavydžiui baltymų – antikūno ir antigeno – ant stiklinės plokštelės imobilizuojant antikūnus ir taip sukuriant imuninį jutiklį (Balevicius ir kt., 2011). Lygiai taip pat gali būti tiriama baltymų sąveika su jų receptoriais ir tam yra naudojamas chimerinis antikūno Fc dalį turintis receptorius, atpažįstantis analizuojamą baltymą (Balevicius ir kt., 2014). Įprastai antikūnai

geba jungtis prie aukso sluoksnio, esančio ant stiklinės plokštelės, tačiau jų orientacija būna atsitiktinė (Balevicius ir kt., 2011). Tinkamas receptoriaus orientavimas yra svarbus, kadangi padidėja jo asociacija prie paviršiaus, o pačiame receptoriaus sluoksnyje būna daugiau molekulių, prie kurių gali jungtis analizuojamas baltymas. Tam pirmiausia suformuojamas savitvarkis monosluoksnis iš 11-merkaptoundekanoinės rūgšties (11-MUR) ant kurio kovalentiškai imobilizuojamas receptoriaus Fc dalį atpažįstantis baltymas (Balevicius ir kt., 2014). Stiprų afiniškumą IgG Fc domenui turi Baltymas A (SpA), tačiau jis labiau tinkamas triušių, kiaulių, šunų ir kačių antikūnams. Prie žmogaus įvairių IgG poklasių geriau jungiasi Baltymas G (Choe ir kt., 2016). Jeigu yra analizuojami žmogaus baltymai, prie Baltymo G prijungiamas chimerinis receptorių, kurio Fc domenas sąveikauja su imobilizuotu Baltymu G, o dalis, atpažįstanti analizuojamą baltymą, lieka orientuota į paviršių. Taip yra gaunamas imuninis jutiklis, kurį galima naudoti baltymo ir receptoriaus sąveikos analizei VVAE metodu (1.5.1.1 pav.) (Balevicius ir kt., 2014).



1.5.1.1 pav. VVAE struktūros pavyzdys, kuomet tiriama GCSF ir GCSF receptoriaus sąveika, kai (A) receptorių neorientuotas ir (B) receptorių orientuotas (Balevicius ir kt., 2014)

1.5.2 Baltymų sąveikos kinetiniai modeliai

Elipsometrija yra netiesioginis matavimo metodas, kurio gautiems duomenims reikia pritaikyti tinkamus matematinius modelius, norint gauti daugiau informacijos apie vykstančias sąveikas ar sluoksnių formavimąsi (Poksinski ir Arwin, 2004). Baltymų sąveikos kinetikų charakterizavimui gali būti naudojami tokie modeliai, kaip Langmuir, Freundlich ar Brunauer-Emmett-Teller (BET) izotermos, kurių tinkamas pritaikymas priklauso nuo įvairių jiems keliamų reikalavimų (Latour, 2015).

Vienas iš dažniausiai naudojamų modelių yra Langmuir modelis, kuris paremtas nuostata, kad sluoksnis susiformuoja tik iš vienodų tarpusavyje nesąveikaujančių molekulių, kurių visos jungimosi vietos turi vienodą energiją. Kad baltymams būtų pritaikytas šis modelis, jų sąveikos procesas turi atitikti keturias sąlygas. Pirmoji iš jų – visos adsorbcijos vietos turi būti vienodos ir nepriklausomos. Taip pat, kiekviena iš jų turi gebėti prisijungti tik vieną molekulę. Trečioji sąlyga – prisijungusios molekulės neturi sąveikauti tarpusavyje ar daryti įtakos prisijungimui. Ir paskutinioji sąlyga – komplekso susidarymas yra dinamiškas grįžtamas procesas ir molekulės gali disocijuoti (Latour, 2015).

Kiti modeliai gali apibūdinti adsorbciją ant heterogeniškų paviršių ar daugiasluoksnį jungimąsi. Freundlich modelis išvestas iš Langmuir modelio ir yra panašus į jį, skiriasi jis tik tuo, kad jį galima taikyti tuomet, kai yra laikomasi nuostatos, jog adsorbcijos vietos turi heterogenišką adsorbcijos energiją (Meng ir kt., 2013). BET modelis yra naudojamas daugiasluoksnio formavimosi atveju. Pagal jį pirmasis sluoksnis dar neturi būti visiškai susiformavęs, kad prie jo galėtų jungtis kitas sluoksnis (Latour, 2015).

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Medžiagos ir reagentai

2.1.1.1 lentelė. Tyrimo metu naudotos medžiagos ir reagentai

Medžiaga arba reagentas	Gamintojas, šalis
Fermentai: HindIII restrikcijos endonukleazė BamHI restrikcijos endonukleazė EcoRI restrikcijos endonukleazė PvuI restrikcijos endonukleazė T4 DNR ligazė DreamTaq polimerazė	Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Fermentas, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva
Kiti baltymai: Baltymas G GCSF ir c-kit receptoriai (Fc chimeros) SCF monomeras	Sigma-Aldrich, JAV Abcam, Jungtinė Karalystė Abcam, Jungtinė Karalystė
PGR, klonavimo ir DNR išskyrimo rinkiniai: GeneJET Plasmid Miniprep Kit Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix GeneJET PCR purification kit CloneJET PCR Cloning Kit GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Fermentas, Lietuva
DNR ir baltymų dydžio žymenys ir dažai: O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder PageRuler™ Prestained Protein Ladder 6x Orange Loading dye Pierce™ Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva
Antibiotikai: Kanamicinas Ampicilinas	Sigma-Aldrich, JAV Roth, Vokietija

2.1.1.1 lentelės tęsinys

<p>Plazmidės:</p> <p>pET28a plazmidės su GCSF/Lα/GCSF ir SCF/Lα/GCSF genų konstruktais</p>	<p>UAB Profarma, Lietuva</p>
<p>Tirpalų ir elektroforezės gelių sudedamosios medž.:</p> <p>TopVision Agarose</p> <p>SeaKem LE Agarose</p> <p>TAE (Tris-acetate-EDTA) buferis</p> <p>Green FastDigest buferis (10x)</p> <p>10x T4 DNR ligazės buferis</p> <p>Akrilamidas/bis-akrilamidas</p> <p>Natrio dodecilsulfatas (NDS)</p> <p>Amonio persulfatas (APS)</p> <p>Tetrametiletilendiaminas (TEMED)</p> <p>10x Tris-Glicino NDS buferis</p> <p>Tris-HCl</p> <p>11-merkaptoundekanoinė rūgštis (11-MUR)</p> <p>Metanolis</p> <p>N-hidroksisukcinimidas (NHS)</p> <p>N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDC)</p> <p>Glicinas</p> <p>Natrio acetatas (CH₃COONa)</p> <p>Natrio chloridas (NaCl)</p> <p>Kalio chloridas (KCl)</p> <p>Dinatrio fosfatas (Na₂HPO₄)</p> <p>Monokalio fosfatas (KH₂PO₄)</p> <p>Etanolamino hidrochloridas</p> <p>Magnio chloridas (MgCl₂)</p> <p>Kalcio chloridas (CaCl₂)</p> <p>10x PBS</p>	<p>Thermo Fisher Scientific, Lietuva</p> <p>Lonza, Šveicarija</p> <p>Thermo Fisher Scientific, Lietuva</p> <p>Thermo Fisher Scientific, Lietuva</p> <p>Thermo Fisher Scientific, Lietuva</p> <p>Roth, Vokietija</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Scharlau, Ispanija</p> <p>Thermo Fisher Scientific, Lietuva</p> <p>Thermo Fisher Scientific, Lietuva</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Applichem, JAV</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Merck, JAV</p> <p>VWR Chemicals BDH, JAV</p> <p>Applichem, JAV</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Sigma-Aldrich, JAV</p> <p>Merck, JAV</p> <p>Applichem, JAV</p> <p>Thermo Fisher Scientific, Lietuva</p>
<p>Mitybos terpė:</p> <p>LB Agar, Miller</p> <p>LB Broth, Miller</p>	<p>Fisher BioReagents, JAV</p> <p>Fisher BioReagents, JAV</p>

2.1.1.1 lentelės tęsinys

Chromatografijos kolonėlių sorbentai: DEAE Sepharose FF SP Sepharose FF CHT ceramic hydroxyapatite, Type II	GE Healthcare, Švedija GE Healthcare, Švedija Bio-Rad Laboratories, JAV
Kitos medžiagos: 10x dNTP mišinys Izopropil-β-D-tiogalaktozidas (IPTG) Lūžio rodiklį atitinkantis skystis	Thermo Fisher Scientific, Lietuva Thermo Fisher Scientific, Lietuva Cargille, JAV

2.1.2 Naudoti prietaisai

2.1.2.1 lentelė. Tyrimo metu naudoti prietaisai

Prietaisas	Gamintojas, šalis
ÄKTA pure 150 sistema	GE Healthcare, Švedija
AmiconUltra-15	Merck Millipore, JAV
Acrodisc Units with Mustang E membrane	Pall Corporation, JAV
Bio TDB-100 termostatas	Biosan, Latvija
EBA 12R cengrifuga	Hettich, Vokietija
Eppendorf 5415R centrifuga	Eppendorf, Vokietija
MultiGene OptiMax termocikleris	Labnet International, JAV
Spektrinis elipsometras M-2000X	J.A.Woollam, JAV
Stilinė BK7 plokštelė, padengta Cr-Au	XanTec bioanalytics GmbH, Vokietija
Stiklinė BK7 prizmė	Cargille, JAV

2.2 Metodai

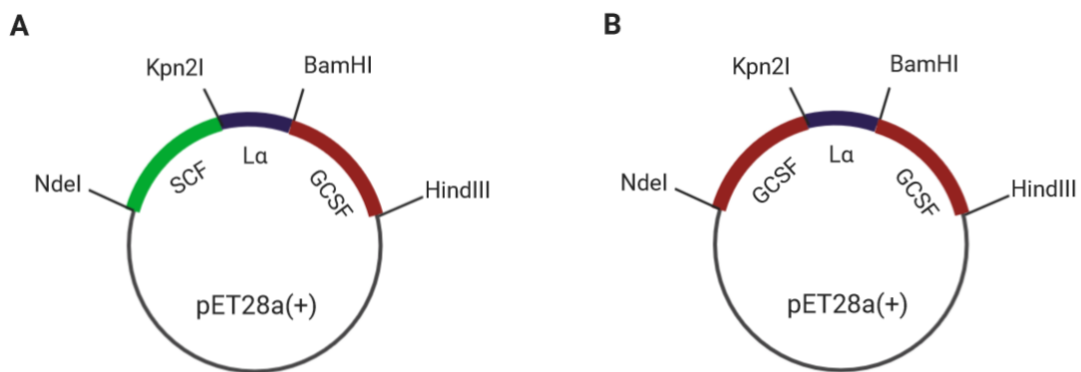
2.2.1 Kompetentinių ląstelių paruošimas

Transformacijai buvo ruošiamos *Escherichia coli* DH10B ir *E. coli* BL21 Star (DE3) kompetentinės ląstelės. Iš kiekvieno kamieno po koloniją užsėjama į 5 ml skystos Luria-Bertani (LB) terpės ir purtyklėje 37 °C bakterijos auginamos per naktį. Kitą dieną imama 170 µl terpės su naktine kultūra ir vėl sėjama į LB terpę. Ląstelės inkubuojamos purtyklėje 37 °C apie 2-3 val., kol OD₆₀₀ pasiekia 0,35-0,4. Tuomet jos šaltai nucentrifuguojamos 5 °C 5 min. 3000 rpm ir įdedamos į ledą. Supernatantas nupilamas ir ląstelės užpilamos ~5 ml natrio tirpalo (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM MgCl₂). Mėgintuvėlis

pavorteksuojamas, kol ląstelės susimaišo su tirpalu ir vėl nucentrifuguojama tais pačiais parametrais. Supernatantas nupilamas, užpilama ~5 ml kalcio tirpalo (100 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) ir pavorteksuojama. Ląstelės laikomos lede 30 min. Mėgintuvėlis nucentrifuguojamas taip pačiais parametrais ir nupilamas supernatantas. Ląstelės suspenduojamos supernatanto likutyje, esančiame ant sienelių, ir jos perkeliamos į sterilų 1,5 ml mėgintuvėlį.

2.2.2 GCSF/L α /SCF geno konstravimas

GCSF/L α /SCF genas buvo konstruojamas iš dviejų konstrukčių – GCSF/L α /GCSF ir SCF/L α /GCSF, kurie buvo pET28a plazmidėse. Kiekvieno iš jų pirmasis genas turi 5' gale NdeI ir 3' gale Kpn2I restrikcijos vietas, o antrasis – atitinkamai BamHI ir HindIII restrikcijos vietas (**2.2.2.1 pav.**).



2.2.2.1 pav. Turimi chimerinių baltymų konstruktai ir jų restrikcijos vietas: (A) SCF/L α /GCSF ir (B) GCSF/L α /GCSF

Visas konstravimas atliekamas keliais etapais. Pirmiausia, šios plazmidės perkeltos į *E. coli* DH10B ląsteles:

Ląstelių transformacija

Į kompetentines ląsteles, kurias laikomos lede, pilama 2 μ l ~50 ng/ μ l plazmidės ir švelniai papurtant pirštu sumaišoma. Jos inkubuojamos lede 30 min. Mėgintuvėliai pernešami į 42 °C termostatą, kuriame jie laikomi 1 min. 30 s. Mėgintuvėliai perkeliama į ledą 2-3 min. ir ištraukiami. Į mėgintuvėlį įpilama ~1 ml LB terpės, pavartoma ir termostate inkubuojama 37 °C 1 val. Nucentrifuguojama 3 min. 3000 rpm, ~0,5 ml supernatanto nupilama ir ląstelės išsėjamos į Petri lėkštes ant LB terpės su antibiotiku, pET28a atveju – su kanamicinu.

SCF fragmento PGR

Iš ląstelių plazmidės išskiriamos naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit pagal gamintojo protokolą ir atliekama SCF fragmento polimerazinė grandininė reakcija (PGR) naudojant Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix, kad būtų prijungtos BamHI ir HindIII restrikcijos vietos bei pridėtas TAA stop kodonas. Tam buvo naudojami tokie SCF pradmenys:

Tiesioginis: 5'-TGGATCCGAAGGGATCTGCCGTAATCG-3'

Atvirkštinis: 5'-TAAGCTTAGGCTGCAACAGGGGG-3'

Į mišinius buvo pilami skirtingi išskirtos DNR kiekiai: 10, 5 ar 3 µl. PGR mišinys vienam mėginiui, kurio galutinis tūris buvo 25 µl: 2x Master Mix, 10 mM tiesioginio pradmens, 10 mM atvirkštinio pradmens, 10, 5 arba 3 µl DNR ir vandens iki 25 µl.

Naudotos 2 skirtingos DNR padauginimo programos, kurios skiriasi pradmenų prisijungimo temperatūra: 1 ciklas denatūracijos 98 °C 30 s., 30 ciklų denatūracijos 98 °C 10 s., prisijungimas 62 °C arba 65 °C 15 s. ir ilginimas 72 °C 15 s., o galutinis ilginimas – 1 ciklas 72 °C 7 min. PGR produktai analizuojami 120 V TAE 1 % agarozės gelyje, kuris dažomas etidžio bromidu.

Padauginto SCF fragmento įligavimas ir analizė

Gauti PGR produktai supilami į vieną mėgintuvėlį ir išvalomi naudojant GeneJET PCR purification kit. Tuomet naudojant Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit SCF fragmentas įliguojamas į pJET1.2/blunt plazmidę pagal gamintojo protokolą ir ji perkeliama transformuojant *E. coli* DH10B ląsteles anksčiau aprašytu būdu, kurios išsėjamos ant LB terpės su ampicilinu. Ar fragmentas įsiligavo, tikrinama atliekant kolonijų PGR ir plazmidės skaldymą restrikcijos endonukleazėmis.

Kolonijų PGR mišinys vienam mėginiui, kurio galutinis tūris yra 25 µl: 1,25 U DreamTaq DNR polimerazės, 10x buferio, po 1 µl SCF tiesioginio ir atvirkštinio pradmens, 10x dNTP, 17,5 µl vandens. PGR sąlygos: 1 ciklas denatūracija 94 °C 4 min., 32 ciklai denatūracija 94 °C 30 s., prisijungimas 60 °C 20 s. ir ilginimas 72 °C 40 s., 1 ciklas galutinis ilginimas 72 °C 5 min. PGR produktai analizuojami agarozės gelyje.

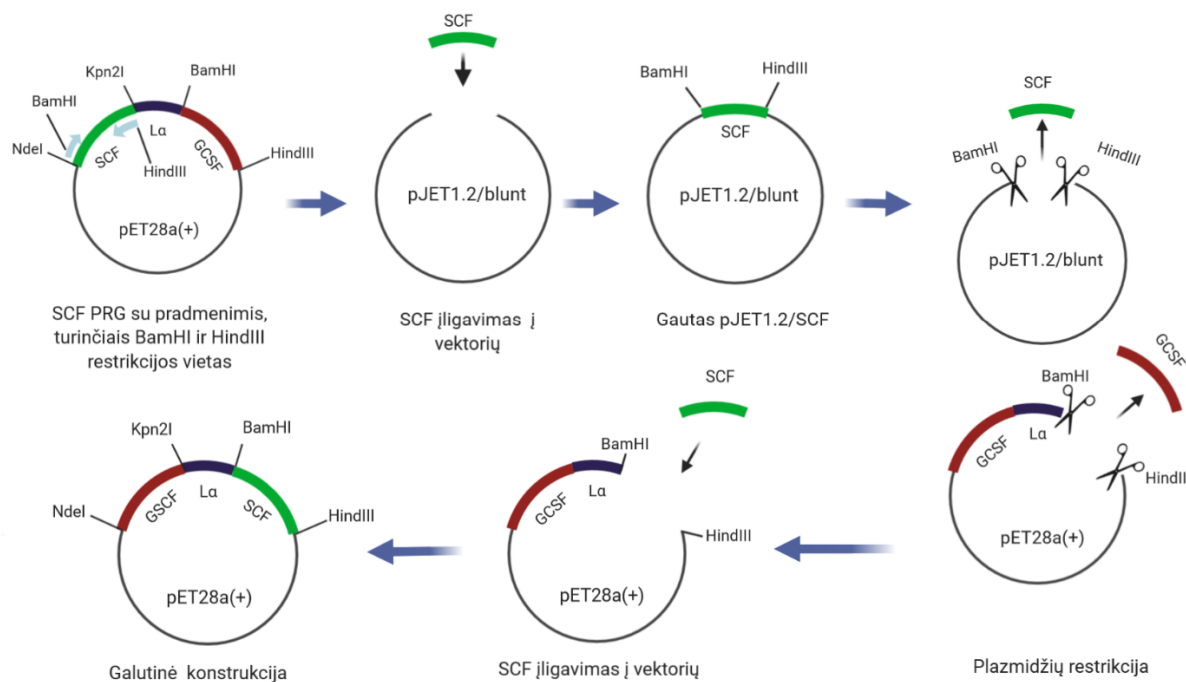
Pasirinkti 4 mėginiai, kurių kolonijų bakterijos užsėtos į skystą LB terpę, auginamos per naktį ir kitą dieną plazmidės išskirtos anksčiau minėtu būdu. Jos skaldomos 1 val. 37 °C temperatūroje dvejomis restrikcijos endonukleazių kombinacijomis: HindIII + BamHI ir EcoRI + PvuI.

Reakcijos mišinys vienam mėginiui, kurio galutinis tūris yra 20 μ l: 10 μ l ~100 ng/ μ l konc. DNR, 10x Green FastDigest buferio, po 1 μ l restrikcijos endonukleazės, 6 μ l vandens. Produktai analizuojami agarozės gelyje. Taip pat, kad būtų įsitikinta, jog visa SCF seka yra teisinga, buvo atlikta plazmidės sekoskaita.

Plazmidžių karpymas ir GCSF/L α /SCF sukonstravimas

Plazmidės pJET1.2/SCF ir pET28a/GCSF/L α /GCSF skaldomos BamHI ir HindIII restrikcijos endonukleazėmis, kurios iškerpa SCF fragmentą iš pirmosios ir antrąjį GCSF fragmentą iš antrosios plazmidės. Reakcijos mišinio sudėtis vienai plazmidei, kurio galutinis tūris yra 40 μ l: 15 μ l ~150 ng/ μ l konc. DNR, 10x FastDigest buferis, po 1 μ l restrikcijos endonukleazės, 19 μ l vandens. Reakcija atliekama 37 $^{\circ}$ C temperatūroje 1 val. Gauti produktai išskirstomi agarozės gelyje ir SCF bei pJET28a/GCSF/L α fragmentai išpjaunami iš gelio. Jie išgryninami naudojant GeneJET Gel Extraction Kit. Tuomet šie fragmentai liguojami naudojant tokį reakcijos mišinį, kurio galutinis tūris yra 20 μ l: 10x T4 DNR ligazės buferis, 1 μ l T4 DNR ligazės, 2 μ l pET28a/GCSF/L α , 15 μ l SCF. Ši reakcija buvo atliekama per naktį 4 $^{\circ}$ C temperatūroje. Gauta plazmidė perkeliama į *E. coli* BL21 Star (DE3) transformuojant anksčiau aprašytu metodu ir bakterijos išsėjamos ant Petri lėkštelių su LB terpe ir kanamicinu. Plazmidė išskiriama anksčiau aprašytu metodu ir fragmento įsiligavimas bei seka patvirtinami sekoskaitos būdu. Supaprastinta baltymo geno sukonstravimo schema pavaizduota 2.2.2.2

pav.



2.2.2.2 pav. Schema, vaizduojanti GCSF/L α /SCF geno konstravimą

2.2.3 Rekombinantinio baltymo ekspresijos indukcija

Keturios *E. coli* BL21 Star (DE3) transformantų kolonijos užsėjamos į 4 mėgintuvėlius su 5 ml LB terpės ir 5 µl 25 mg/ml kanamicino. Ląstelės auginamos purtyklėje 37 °C 220 rpm 2-3 val., kol OD₆₀₀ pasiekia apie 0,6. Iš vieno mėginio paimama 0,5 ml ir atsidedama kontrolei, o į likusių baltymų ekspresija indukuojama 1 mM izopropil-β-D-tiogalaktozidu (IPTG) ir ląstelės tais pačiais parametrais auginamos dar 2-3 val. Iš kiekvieno mėginio paimama 500 µl, perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlius ir nucentrifuguojama 5 min. 3000 rpm. Supernatantas nupilamas, o ant likusių ląstelių užpilama 60 µl PBS 2 % NDS ir suvorteksuojama. Mėginiai kaitinami 100 °C temperatūroje apie 7 min., kol tirpalai tampa skaidrūs. Įpilama 15 µl Pierce™ Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer, pavorteksuojama ir kaitinama 100 °C apie 5 min. Mėginiai analizuojami poliakrilamido gelyje (NDS-PAGE) (2.2.3.1 lentelė). Viršutiniu geliu baltymai leidžiami 90 V įtampoje, o apatiniu – 150 V.

2.2.3.1 lentelė. NDS-PAGE poliakrilamido gelio sudėtis

Apatinis skiriamasis gelis	Viršutinis koncentruojantis gelis
2,45 ml akrilamidas/bis-akrilamidas (santykiu 37,5:0,5)	0,5 ml akrilamidas/bis-akrilamidas (santykiu 37,5:0,5)
1,5 Tris-HCl, pH 8,8	0,5 Tris-HCl, pH 6,8
1,94 ml H ₂ O	2,25 ml H ₂ O
61 µl 10 % NDS	37,5 µl 10 % NDS
30,5 µl 10 % APS	18,75 µl 10 % APS
3,05 µl TEMED	2,5 µl TEMED

2.2.4 Rekombinantinių baltymų renatūracija ir gryninimas

Baltymų renatūracija ir gryninimas buvo atliktas dokt. Gitanos Mickienės. Indukuotos ir nucentrifuguotos ląstelės be supernatanto buvo nuplautos ir ištirpintos 120 ml buferyje, sudarytame iš 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM 1,4-ditiotreitolio (DTT) ir 8 M urėjos. Tirpalas buvo maišomas 4 °C 2 val ir nucentrifuguojamas 30000 × g 25 min. Baltymų susilankstymas buvo atliekamas denatūruotus baltymus greitai atskiedžiant buferiu (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), oksiduotas glutationas (GSSG)) kol pasiekama 2 M urėjos koncentracija.

Galutinis GSSG ir DTT moliarinis santykis buvo išlaikomas 1:5. Reakcija atliekama 24 val. 4 °C temperatūroje švelniai maišant. Tuomet galutinis tirpalas centrifuguojamas 25 min. 30000 × g.

Trijų žingsnių rekombinantinių baltymų gryninimo schema buvo atliekama naudojant ÄKTA pure 150 sistemą. Sulankstytas tirpus baltymas buvo pilamas į DEAE Sepharose FF kolonėlę, kuri suekvilibruota su 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) buferiu. Tuomet baltymai buvo plaunami žingsninės eliacijos būdu didinant NaCl koncentraciją nuo 0 M iki 0,5 M. Surinktos frakcijos pilamos į CHT ceramic hydroxyapatite, Type II kolonėlę, suekvilibruota su 50 mM Tris-HCl buferiu (pH 7,2). Kolonėlė plaunama 5 mM NaH₂PO₄ buferiu (pH 7,2), turinčiu 0,1 M NaCl, ir baltymai išplaunami naudojant 5 iki 500 mM NaH₂PO₄ gradientą. Frakcijos, kuriose buvo taikininis baltymas, surinktos, atskiestos 20 mM natrio acetatu iki pH 4,7 ir tuomet pilamos į SP Sepharose FF kolonėlę, suekvilibruotą su 20 mM natrio acetatu (pH 4,7). Kolonėlė išplauta ekvibracijos buferiu ir baltymai išplauti naudojant NaCl gradientą su ekvibracijos buferiu, turinčiu 500 mM NaCl.

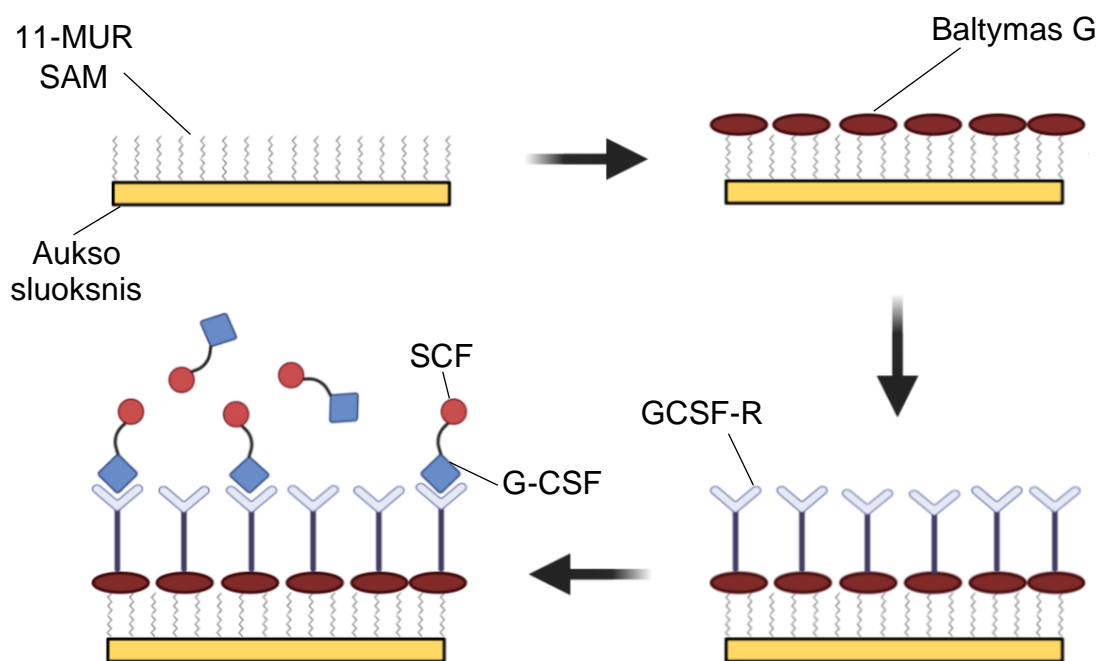
Frakcijos, kuriose buvo daugiausiai gryno baltymo, surinktos ir perkeltos į laikymo buferį, sudarytą iš 20 mM acto rūgšties/NaOH (pH 4,0) naudojant diafiltraciją su 10-kDa centrifuginiais filtravimo prietaisais (AmiconUltra-15, Millipore). Baltymų tirpalas prafiltruotas per 0,2 μm Acrodisc Units with Mustang E membrane, kad būtų pašalinti endotoksinai.

2.2.5 Baltymų sąveikos su receptoriais analizė naudojant VVAE

SCF/L α /GCSF ir naujai sukonstruoto GCSF/L α /SCF baltymų sąveikos analizuotos su chimeriniais GCSF ir c-Kit (SCF) receptoriais, turinčiais žmogaus IgG1 antikūno Fc dalį. Taip pat, buvo analizuojama SCF monomero sąveika su jo receptoriumi bei GCSF/L α /GCSF su GCSF receptoriumi.

Kad būtų atlikti matavimai, buvo formuojamas imuninis jutiklis (**2.2.5.1 pav.**). 1 mm storio BK7 plokštelė, padengta Cr-Au sluoksniu, inkubuojama 1 mM 11-merkaptoundekanoinės rūgšties (11-MUR), ištirpintos metanolyje, tirpale 18 val. taip susidarant savitvarkiam monosluoksniui (SAM). Tuomet plokštelė nuskalaujama metanoliu, dejonizuotu vandeniu ir įmontuojama į elipsometrinę celą. 11-MUR karboksilo grupės aktyvuojamos 0,1 M N-hidroksisukcinimido (NHS) ir 0,4 M N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidroklorido (EDC) lygiais tūriais sumaišytus tirpalus suleidžiant į celą ir inkubuojant 20 min. Tirpalai išplaunami vandeniu, tada įpilama 10 mM acetatinio buferio (pH

4,0) ir laukiama, kol stabilizuojasi elipsometrinis signalas. Tuomet į celę suleidžiama 100 µg/ml baltymo G, ištirpinto tokiaame pačiame acetatiniame buferyje ir inkubuojama apie 90 min. Tirpalas išplaunamas acetatiniu buferiu ir laukiama, kol nusistovės signalas. Kad būtų užblokuotos likusios aktyvios karboksilo grupės, suleidžiama 1 M etanolamino hidrochlorido (pH 8,5) 10 min. ir vėl nuplaunama acetatiniu buferiu. Kovalentiškai neprisijungusio baltymo G likučiai išplaunami naudojant 10 mM glicino tirpalą (pH 3,0), inkubuojant 10 min. Glicinas nuplaunamas acetatiniu buferiu ir jis pakeičiamas į PBS buferį (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM PO₄³⁻, pH 7,4) ir laukiama, kol stabilizuosis signalas. 5 µg/ml receptoriaus, ištirpinto PBS buferyje, suleidžiama ir inkubuojama 60 min. Galiausiai, kovalentiškai neprisijungęs receptorius nuplaunamas. Suleidžiama 10 µg/ml analizuojamo baltymo, ištirpinto PBS buferyje, ir inkubuojama apie 60 min. Visas ligandų jungimosi matavimas buvo atliekamas spektre nuo 300 nm iki 1000 nm. Stebima baltymų jungimosi kinetika, o jos charakterizavimui taikomas Langmuir modelis ir apskaičiuojamos asociacijos bei disociacijos greičio konstantos visoms sąveikoms išskyrus GCSF/Lα/GCSF. Jam pritaikytas iš Langmuir modelio išvestas modelis, kuris atsižvelgia į daugiau prielaidų.



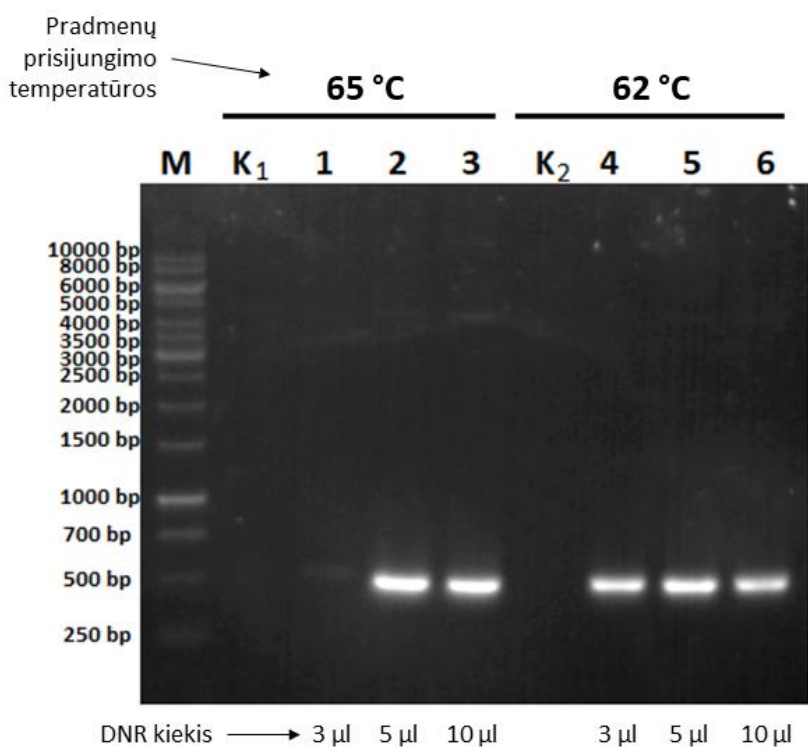
2.2.5.1 pav. Imuninio jutiklio, kuriam naudojamas GCSF receptorius, formavimo schema

3. REZULTATAI

Kuriant sulietus rekombinantinius baltymus pirmiausia reikia sujungti skirtingų baltymų genų. Chimerinis baltymo genas, sudarytas iš citokinų G-CSF ir SCF genų – SCF/L α /GCSF buvo sukonstruotas anksčiau, tačiau reikėjo sukurti ir kitos orientacijos geną GCSF/L α /SCF, kadangi domenų išsidėstymo tvarka gali turėti įtakos baltymo aktyvumui, todėl yra svarbu juos abu palyginti. Išgrynintų baltymų aktyvumas buvo vertinamas naudojant VVAE metodą, kuriuo stebima jų sąveika su imobilizuotais receptoriais ir iš gautų matavimų apskaičiuojamos asociacijos ir disociacijos konstantos.

3.1 GCSF/L α /SCF geno konstravimas

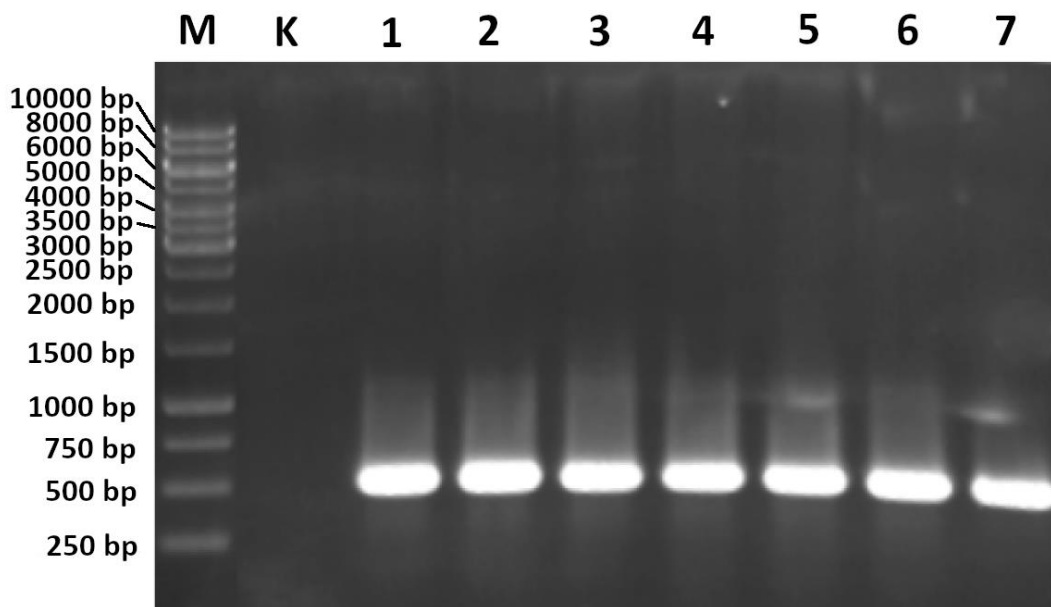
Iš ląstelių išskyrus plazmidę su SCF/L α /GCSF konstruktu, buvo pagausintas SCF fragmentas su pradmenimis: tiesioginis turi BamHI restrikcijos endonukleazės atpažinimo vietą, o atvirkštinis – HindIII. Tam buvo naudojami keli skirtingi PGR mišiniai, kurie skyrėsi išskirtos DNR kiekiu, bei buvo taikomos dvi skirtingos temperatūrų programos – pradmenų prisijungimo temperatūra buvo 62 °C arba 65 °C. Gauti produktai buvo analizuojami naudojant elektroforezę agarozės gelyje (3.1.1 pav.).



3.1.1 pav. PGR pagausinto SCF fragmento elektroforezės nuotrauka. M – dydžio žymuo; 1-6 – PGR produktai; K₁ ir K₂ – kontrolės

Agarozės gelyje penkiuose iš šešių mėginių buvo matomi efektyviai pagausinti maždaug 500 bp dydžio fragmentai, kurie atitinka SCF dydį. Mėginyje, į kurį įpilta 3 μl DNR ir pradmenų prisijungimo temperatūra buvo 65 °C, PGR produktas yra nežymiaimatomas, labai neryškus. Tai reiškia, jog reakcijai vykti ši temperatūra buvo per aukšta arba DNR kiekis nepakankamas. Penki mėginiai, kuriuose efektyviai pagausintas fragmentas, buvo supilti į vieną ir atliktas jo ligavimas į pJET1.2/blunt vektorių.

Plazmidė su įliguotu fragmentu perkelta į *E.coli* DH10B ląsteles ir tam, kad būtų patikrinta, ar SCF fragmentas tikrai įsiterpė, atlikta kolonijų PGR naudojant tuos pačius SCF pradmenis ir produktai analizuojami agarozės gelyje. Jame buvo matomos ryškios produktų juostelės ties 500 bp visuose mėginiuose ir tai rodo, jog SCF buvo sėkmingai įliguotas į pJET1.2/blunt plazmidę (**3.1.2 pav.**). Tuomet iš 1, 2, 4 ir 6 mėginių šis vektorius buvo išskirtas.

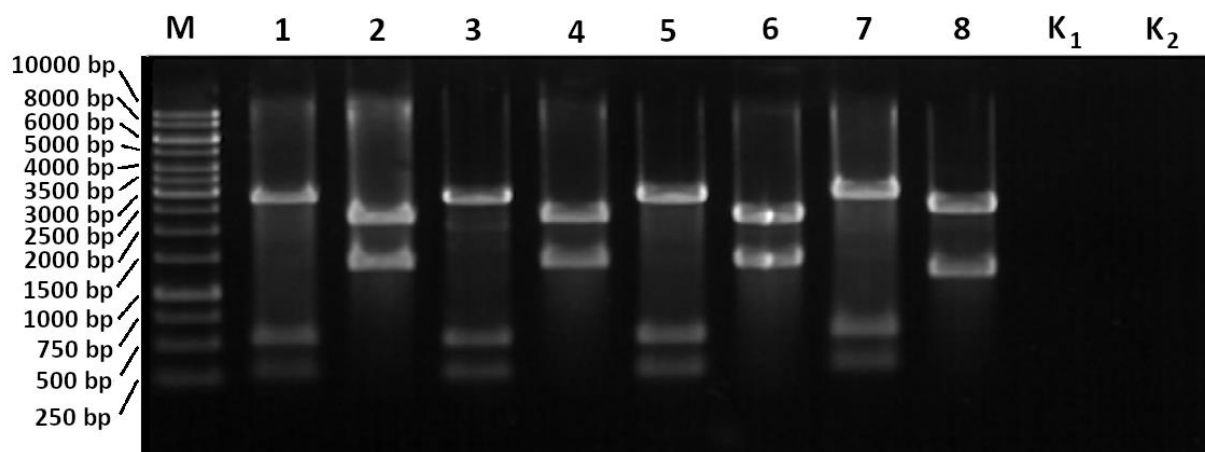


3.1.2 pav. Kolonijų PGR produktai. M – dydžio žymuo; 1-7 – kolonijų PGR produktai; K – kontrolė

Tam, kad būtų dar labiau įsitikinta, jog tikrai buvo pagausintas ir įliguotas SCF, o ne G-CSF ar kitas fragmentas, atlikta restrikcinė analizė – išskirtas vektorius, suskaldytas dvejomis restrikcijos endonukleazių kombinacijomis: HindIII + BamHI ir EcoRI + PvuI. Naudojant pirmąją kombinaciją turėtų būti gauti 3 fragmentai: 501 bp SCF fragmentas, kadangi iš abiejų geno pusių jis turi įterptas šių restrikcijos endonukleazių atpažinimo vietas,

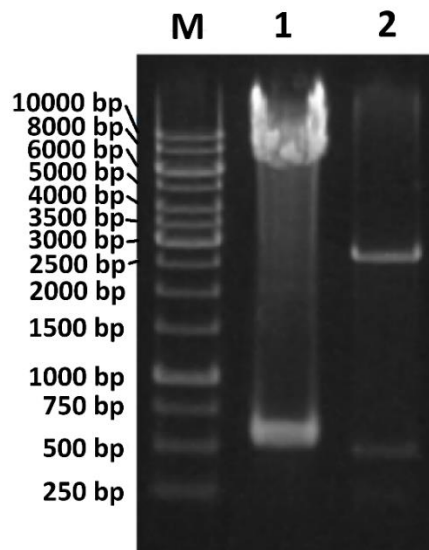
ir du 263 bp ir 2717 bp fragmentai, nes plazmidėje yra dar viena HindIII skėlimo vieta. EcoRI ir PvuI atveju, jeigu yra įliguotas SCF, turėtų gautis 2160 bp ir 1321 bp ilgio fragmentai. Jeigu į plazmidę būtų įterptas ne SCF, o G-CSF, būtų matomas tik vienas fragmentas, kadangi EcoRI geba kirpti SCF, o G-CSF – ne.

Restrikcijos produktai buvo analizuojami agarozės gelyje (**3.1.3 pav.**). Visuose mėginiuose, kuriuose DNR suskaldyta HindIII ir BamHI restrikcijos endonukleazėmis (1, 3, 5 ir 7), yra matomos trys juostelės: ~250 bp, ~500 bp ir 2500-3000 bp ilgio fragmentai. Jie apytiksliai atitinka dydžius, kurie ir turėtų būti gaunami karpant pJET1.2/SCF plazmidę. Mėginiuose, skaldytuose su EcoRI ir PvuI, gauti du fragmentai – 2000-2500 bp ir 1000-1500 bp ilgio. Jie taip pat apytiksliai atitinka tuos dydžius, kurie turėjo būti gauti. Įliguoto SCF seka taip pat buvo patvirtinta atlikus šios pJET1.2/SCF plazmidės sekoskaitą.



3.1.3 pav. pJET1.2/SCF restrikcinė analizė. M – dydžio žymuo; 1, 3, 5, 7 – mėginiai, skaldyti HindIII ir BamHI; 2, 4, 6, 8 – mėginiai, skaldyti EcoRI ir PvuI; K₁ – kontrolė su HindIII ir BamHI; K₂ – kontrolė su EcoRI ir PvuI

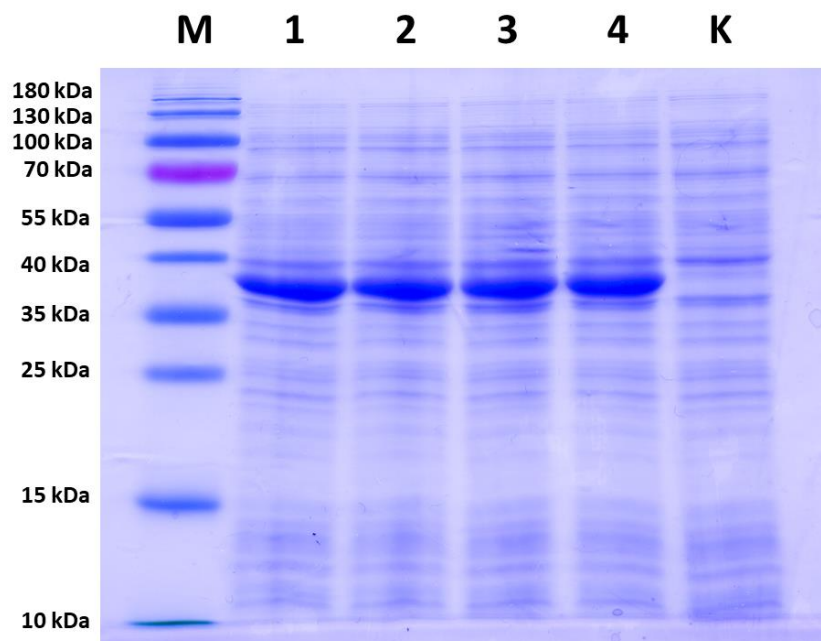
Toliau buvo atliekamas pJET1.2/SCF ir kito konstrukto pET28a/GCSF/L α /GCSF skaldymas su HindIII ir BamHI restrikcijos endonukleazėmis. Jų fragmentai išskirstomi gelyje, tam, kad iš jo būtų galima išpjauti ir išskirti SCF ir pET28a/GCSF/L α dalis. Suskaldžius pET28a/GCSF/L α /GCSF buvo gautas kiek daugiau nei 500 bp ilgio G-CSF ir 5000-6000 bp dydžio pET28a/GCSF/L α , kuris vėliau buvo išpjaujamas. Iš antrojo vektoriaus buvo gauta 2500-3000 bp pJET1.2 dalis ir ~500 bp SCF, kuris taip pat buvo išpjautas (**3.1.4 pav.**). Išskirti pET28a/GCSF/L α ir SCF fragmentai buvo suliguoti ir taip gautas galutinis pET28a/GCSF/L α /SCF konstruktas, kurio seka patvirtinta atlikus sekoskaitą.



3.1.4 pav. Plazmidžių restrikcija naudojant BamHI ir HindIII. M – dydžio žymuo; 1 – pET28a/GCSF/L α /GCSF; 2 – pJET1.2/SCF

3.2 Rekombinantinio baltymo ekspresijos indukcija

Kad būtų patikrinta, ar *E. coli* BL21 Star (DE3) ląstelėse GCSF/L α /SCF baltymas gali būti ekspresuojamas, buvo atlikta indukcija ir NDS-PAGE. Gelyje visuose keturiuose mėginiuose yra matoma ryški iš kitų išsiskirianti juostelė, kurios nėra kontrolėje (**3.2.1 pav.**). Tai reiškia, jog efektyviai vyksta GCSF/L α /SCF baltymo ekspresija ir jį galima gryninti.

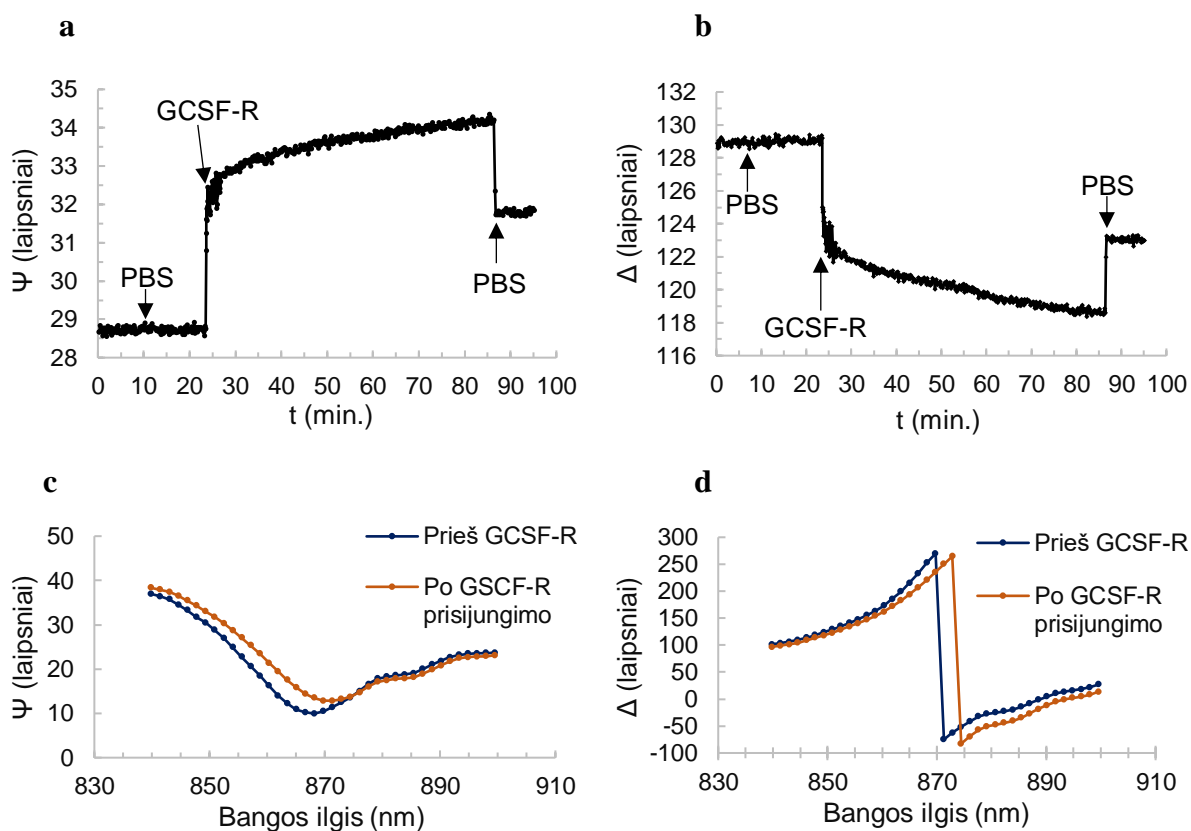


3.2.1 pav. NDS-PAGE gelio nuotrauka, kurioje matomi ląstelių baltymai po GCSF/L α /SCF indukcijos. M – dydžio žymuo; 1-4 – mėginiai; K – kontrolė

3.3 Baltymų aktyvumo analizė naudojant VVAE

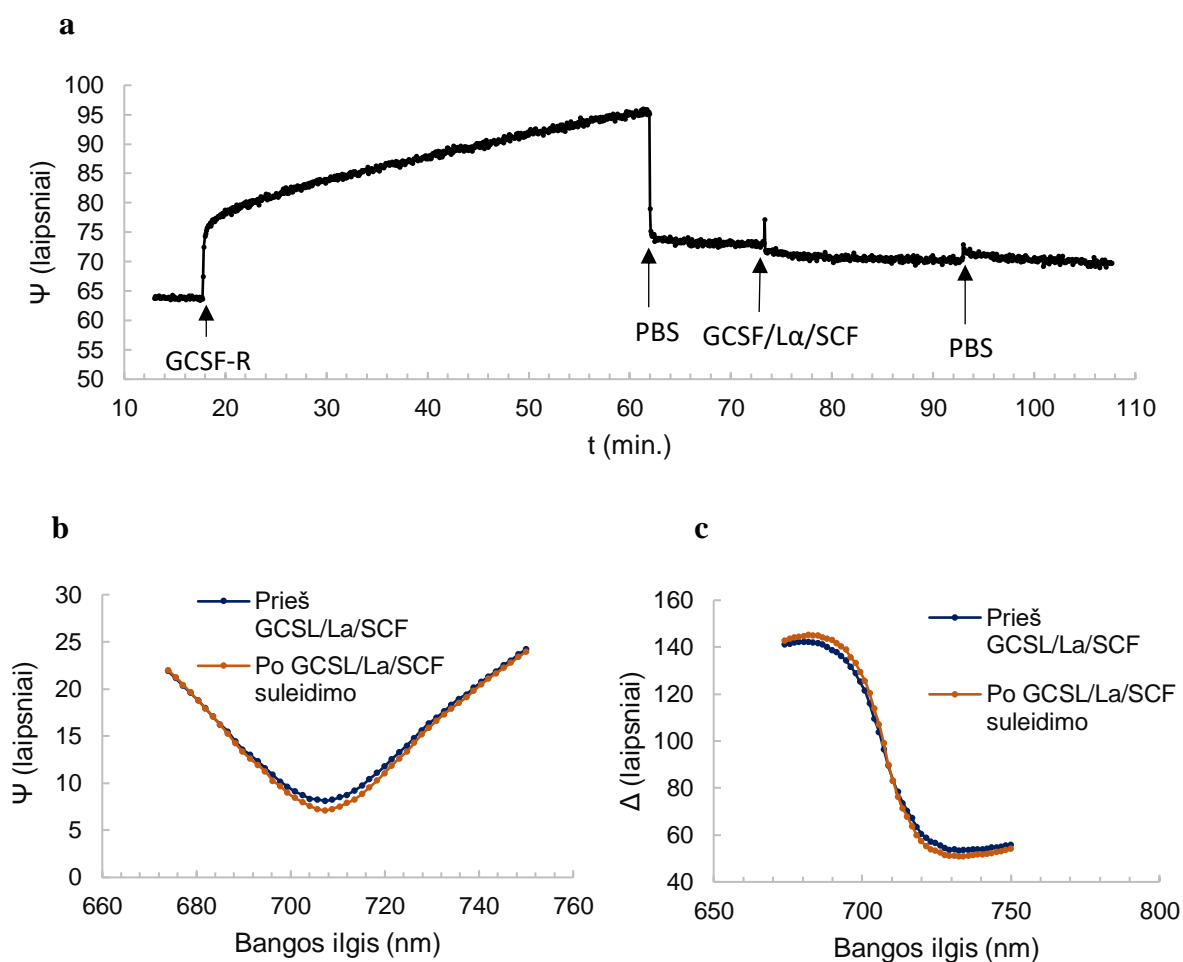
Sulietų baltymų ir receptorių sąveikų analizei buvo naudojamas VVAE metodas. Juo matuotas GCSF/L α /SCF ir SCF/L α /GCSF jungimasis prie GCSF ir c-kit receptorių, GCSF/L α /GCSF – prie GCSF-R, ir monomerinio SCF – prie c-kit receptoriaus.

Sąveikai nustatyti buvo kuriamas imuninis utiklis: suformuotas SAM, kuris aktyvuojamas EDC ir NHS, o prie jo prijungtas baltymas G ant kurio kryptingai imobilizuojami receptoriai. Imobilizuojant receptorius buvo stebimi Ψ ir Δ parametų, atitinkančių šviesos bangos amplitudę ir fazę, pokyčiai laike. Pavyzdžiui, viename iš eksperimentų, kurio metu naudotas GCSF-R, yra matoma, kaip įleidus šį receptorių į celę Ψ reikšmė didėja, nes formuojasi jo sluoksnis iki tol, kol nuplaunama su PBS. GCSF-R sluoksnio susiformavimą rodo tai, kad lyginant Ψ reikšmę prieš receptoriaus įleidimą ir po jo nuplovimo, ji yra padidėjusi (**3.3.1 pav. a**). Panašus pokytis matomas ir Δ parametro atveju, tik jo reikšmė yra mažėjanti (**3.3.1 pav. b**). Receptoriaus sluoksnio susiformavimas taip pat yra vertinamas lyginant Ψ ir Δ kreivių pasislinkimą spektre prieš ir po receptoriaus įleidimo. Šiame eksperimente Ψ ir Δ kreivės pasislenka maždaug 3,1 nm (**3.3.1 pav. c ir d**).



3.3.1 pav. Ψ ir Δ parametų pokyčiai formuojantis GCSF-R sluoksniui: **a** ir **b** – Ψ (**a**) ir Δ (**b**) reikšmės kitimas laike esant 850,9 nm bangos ilgiui; **c** ir **d** – Ψ (**c**) ir Δ (**d**) kreivės spektre prieš ir po GCSF-R įleidimo

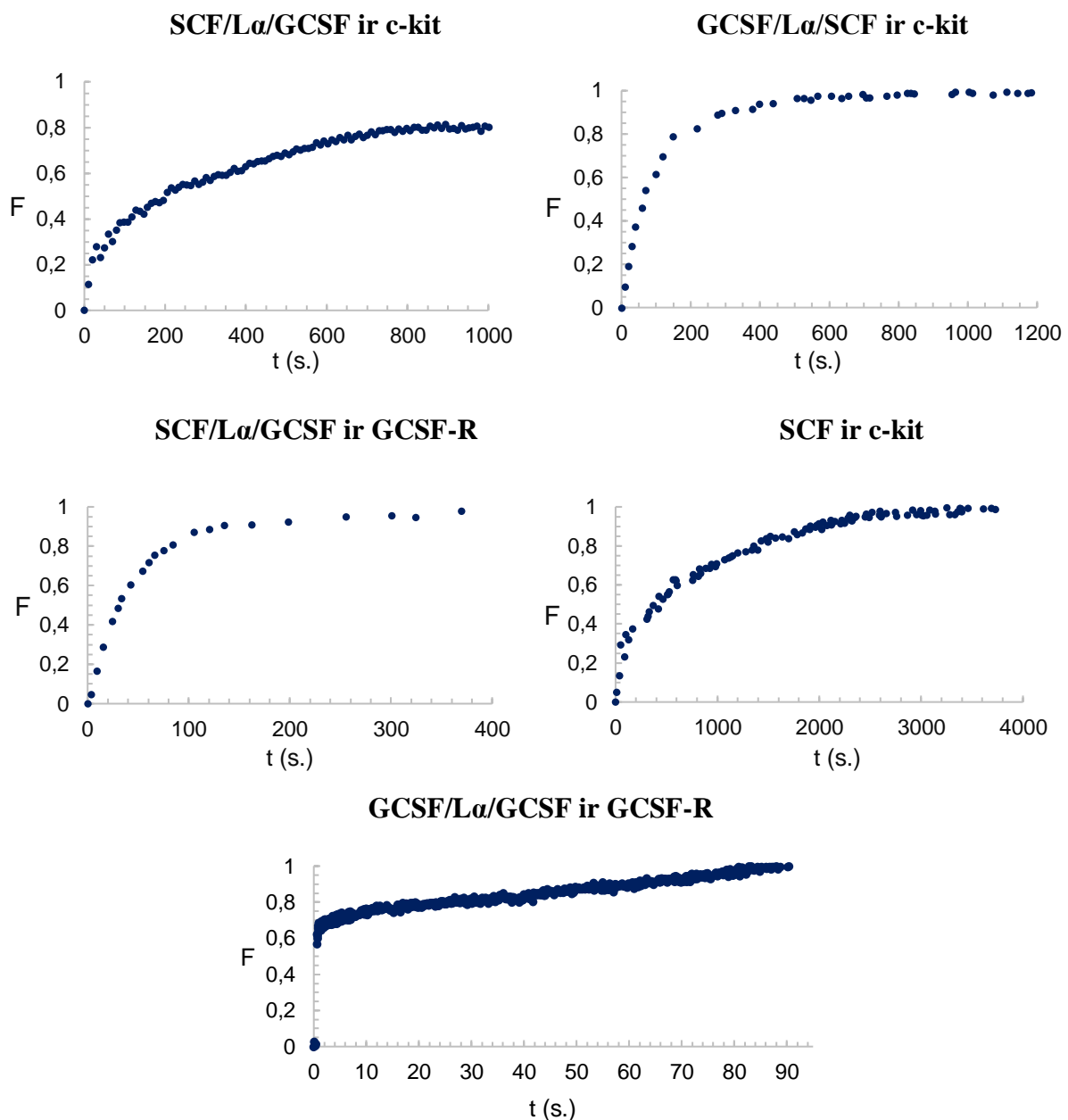
Lygiai taip pat stebimas ir c-kit receptoriaus sluoksnio formavimasis bei analizuojamų baltymų jungimasis prie receptorių. Visi baltymai sąveikavo su savo receptoriais, išskyrus GCSF/L α /SCF, kuris, nors ir jungėsi prie c-kit, su GCSF-R nesąveikavo (3.3.2 pav.). Ψ reikšmė buvo padidėjusi po GCSF-R įleidimo, kas rodo, jog receptoriaus sluoksnis susiformavo, tačiau vėliau įleidus GCSF/L α /SCF baltymą, reikšmė ne tik nepadidėjo, bet ir nežymiai sumažėjo (3.3.2 pav. a). Žiūrint į Ψ ir Δ kreives spektre prieš ir po baltymo įleidimo taip pat matosi, jog poslinkio beveik nėra ir jis yra į priešingą pusę (3.3.2 pav. b ir c).



3.3.2 pav. GCSF/L α /SCF baltymo sąveikos su GCSF-R kinetikos grafikai: **a** – Ψ pokytis laike prie 713,6 nm bangos ilgio suleidus GCSF-R ir GCSF/L α /SCF; **b** ir **c** – Ψ (**b**) ir Δ (**c**) poslinkis spektre prieš ir po GCSF/L α /SCF suleidimo

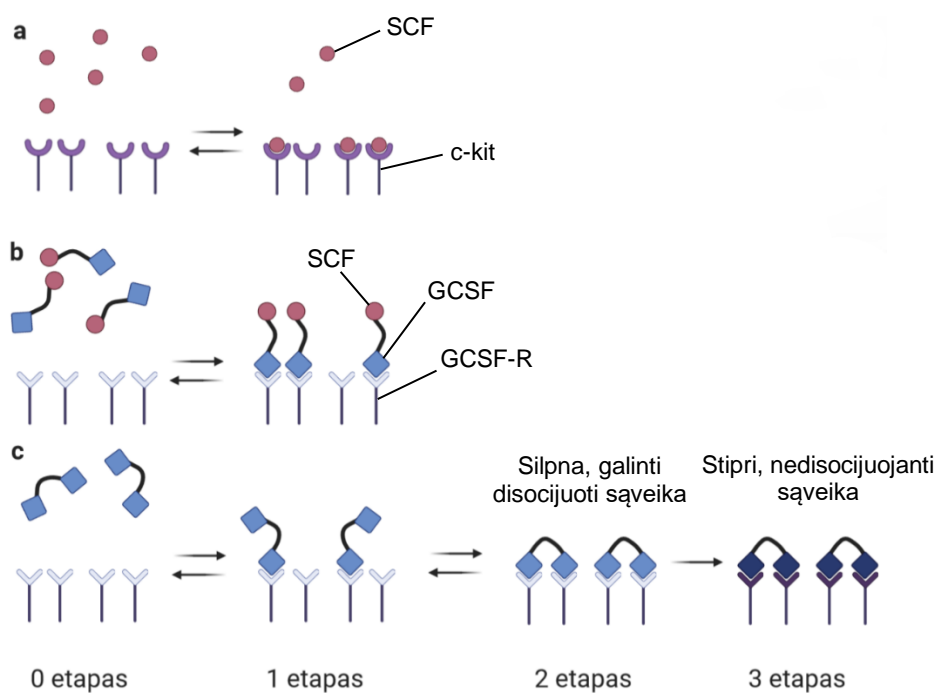
Visos kitos gautos analizuojamų baltymų Δ parametro kinetikos buvo sunormuotos nuo 0 iki 1 į parametą F, tam kad galima būtų jas palyginti. 3.3.3 pav. grafikuose matoma per kiek sekundžių baltymai prisijungia prie receptorių – tai rodo F reikšmės stabilizavimasis.

SCF/L α /GCSF ir c-kit kompleksas susiformuoja per maždaug 825 s. Daug greičiau prie to pačio receptoriaus jungiasi GCSF/L α /SCF baltymas – į stabilią būseną pareinama po maždaug 526 s., o su GSCF-R šis GCSF/L α /SCF baltymas kompleksą suformuoja per 198 s. SCF monomeras prisijungia prie c-kit receptoriaus per daugiau nei 2400 s., o tai yra lėčiau negu abu heterodimerai. GCSF/L α /GCSF jungdamasis prie GCSF-R didžiausią F reikšmę pasiekia ties 90 s. Lyginant su heterodimero sąveika su tuo pačiu receptoriumi, GCSF/L α /GCSF kompleksą suformuoja greičiau.



3.3.3 pav. Baltymų jungimosi prie receptorių kinetinių grafikų

Kad tiksliau būtų įvertinti baltymų prisijungimo prie receptorių greičiai, skaitmeninio modeliavimo būdu buvo gautos asociacijos ir disociacijos greičio konstantos. Visų baltymų kinetikai pritaikytas standartinis Langmuir modelis, išskyrus homodimero GCSF/L α /GCSF, kadangi jo jungimasis yra sudėtingesnis procesas ir vyksta trimis etapais. Iš pradžių baltymas būna tirpale neprisijungęs prie receptoriaus ir tai yra laikoma 0 etapu. Tuomet įvyksta 1 etapas – homodimeras su vienu iš savo domenų prisijungia prie vieno receptoriaus. 2 etapo metu antrasis baltymo domenas prisijungia prie kito receptoriaus ir susidaro kompleksas iš vienos baltymo ir dviejų receptoriaus molekulių. 3 etape kompleksas pasidaro negrįžtamas, todėl GCSF/L α /GCSF iš jo nedisocijuoja (**3.3.4 pav.**). Dėl tokios sąveikos jam pritaikytas iš Langmuir modelio išvestas trijų etapų modelis, pagal kurį modeliuojant gauta asociacijos greičio konstanta, o disociacijos greičio konstantos pagal šį modelį išskirti negalima (Balevicius ir kt., 2019).



3.3.4 pav. Schema, vaizduojanti baltymų sąveikas su receptoriais: **a** – grįžtama SCF sąveika su c-kit; **b** – grįžtama SCF/L α /GCSF sąveika su GCSF-R; **c** – GCSF/L α /GCSF 3 etapų sąveika su GCSF-R

3.3.1 lentelėje aprašytos visų tirtų sąveikų tarp baltymų ir receptorių asociacijos (k_a) ir disociacijos (k_d) greičio konstantos. Didžiausios k_a ir k_d buvo GCSF/L α /SCF su c-kit sąveikos - $1,14 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ir $6,46 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$. Tai rodo, jog šis baltymas greičiausiai jungiasi prie receptoriaus, tačiau ir greičiausiai disocijuoja. Taip pat šis baltymas nesąveikauja su GCSF-R. Daugiau nei 13 kartų už GCSF/L α /SCF ir c-kit mažesnės asociacijos greičio

konstantos nustatytos SCF/L α /GCSF su c-kit ($k_a = 7,77 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ir SCF/L α /GCSF su GCSF-R ($k_a = 8,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) sąveikų, kurios abi yra panašios. Tačiau jų k_d yra mažesnis: SCF/L α /GCSF su c-kit – apie 46 kartus ($k_d = 1,39 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), o su GCSF-R – apie 517 k. ($k_d = 1,25 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Mažiausia k_a nustatyta SCF monomero sąveikos su c-kit, $k_a = 1,37 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ir lyginant su SCF/L α /GCSF ir c-kit sąveika, ji skiriasi apie 5,7 karto, o jų k_d yra panaši, kas reiškia, jog šis heterodimeras jungiasi greičiau negu SCF monomeras ir disocijuoja panašiu greičiu. GCSF/L α /GCSF ir GCSF-R asociacijos greičio konstanta $k_a = 4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lyginant su SCF/L α /GCSF ir GCSF-R sąveikos k_a , yra šiek tiek didesnė – apie 5 kartus.

3.3.1 lentelė. Baltymų ir receptorių sąveikų asociacijos ir disociacijos greičio konstantos

Ligandas + receptorius	$k_a (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$
SCF/L α /GCSF + c-kit	$7,77 \cdot 10^4$	$1,39 \cdot 10^{-2}$
GCSF/L α /SCF + c-kit	$1,14 \cdot 10^6$	$6,46 \cdot 10^{-1}$
SCF/L α /GCSF + GCSF-R	$8,5 \cdot 10^4$	$1,25 \cdot 10^{-3}$
GCSF/L α /SCF + GCSF-R	Sąveika nenustatyta	Sąveika nenustatyta
SCF + c-kit	$1,37 \cdot 10^4$	$1,43 \cdot 10^{-2}$
GCSF/L α /GCSF + GCSF-R	$4 \cdot 10^5$	Išskirti negalima, nes naudojamas trijų etapų modelis

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Šio darbo metu buvo sukonstruotas rekombinantinis sulietas baltymo genas iš sujungtų dviejų citokinų, G-CSF ir SCF, genų – GCSF/L α /SCF. Jo bei SCF/L α /GCSF, GCSF/L α /GCSF ir SCF monomero aktyvumas įvertintas naudojant visiško vidaus atspindžio elipsometriją (VVAE) ir iš gautų duomenų apskaičiavus sąveikų asociacijos ir disociacijos konstantas.

Tyrimo metu buvo analizuojami chimeriniai baltymai SCF/L α /GCSF, GCSF/L α /SCF ir GCSF/L α /GCSF, kurių domenai yra atskirti L α jungtuku. Kai L α jungtukas yra įterptas tarp dviejų G-CSF molekulių užtikrinamas jų atskyrimas ir todėl dimero domenai gali efektyviai ir nepriklausomai funkcionuoti, o jų prisijungimo vietos lieka laisvos sąveikai su receptoriais. Taip pat toks baltymas yra lengviau išgryninamas ir gaunami didesni jo kiekiai, lyginant su kai kuriais kitais jungtukais sujungtomis molekulėmis (Mickiene ir kt., 2017). Vienas iš heterodimerų, SCF/L α /GCSF, jau buvo sukonstruotas, tačiau domenų išsidėstymo tvarka gali daryti įtaką baltymo aktyvumui (Schmidt, 2013), todėl iš SCF/L α /GCSF ir GCSF/L α /GCSF genų buvo sukurtas GCSF/L α /SCF genas, šių baltymų aktyvumo palyginimui.

Naudojant VVAE buvo atlikti sąveikų tarp ligandų ir receptorių tyrimai: SCF/L α /GCSF ir GCSF/L α /SCF su c-kit ir GCSF receptoriais, GCSF/L α /GCSF su GCSF-R, SCF monomero su c-kit. Iš pradžių sukurtas imuninis jutiklis, kuriame receptoriai yra kryptingai imobilizuoti ant baltymo G. Kada receptoriai ant jutiklio paviršiaus yra orientuojami kryptingai, prisijungimui aktyvios jų sritys yra geriau prieinamos ligandams, nei tada, kai receptoriai orientuojami atsitiktinai (Balevicius ir kt., 2014). Kad būtų įvertintos receptoriaus-ligando sąveikos, eksperimentų analizei buvo pritaikyti matematiniai modeliai pagal kuriuos gautos asociacijos ir disociacijos konstantos. SCF/L α /GCSF, GCSF/L α /SCF ir SCF molekulių jungimosi prie receptorių ir jų disociacijos charakterizavimui buvo naudotas standartinis Langmuir kinetinis modelis, kuris įskaito tik į asociaciją ir disociaciją, o tokie procesai, kaip sluoksnį formuojančių molekulių sąveikos tarpusavyje ar kelių molekulių prisijungimas prie vienos, nevyksta (Latour, 2015). Šis modelis nėra tinkamas aprašyti GCSF/L α /GCSF baltymo sąveika su GCSF receptoriumi, kadangi kompleso formavimasis vyksta trimis etapais ir trečiame iš jų susidaro kompleksas, iš kurio molekulės nebedisocijuoja (Balevicius ir kt., 2019). Tokiu atveju disociacijos konstantos išskirti negalima, o asociacijos konstanta apskaičiuota pritaikius iš Langmuir modelio išvestą trijų etapų modelį.

Balevicius ir kt., 2014 tyrime VVAE metodu jau buvo nustatytos GCSF/L α /GCSF ir GCSF monomero sąveikų su GCSF-R $k_a = 9,8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ir $5,6 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ atitinkamai bei apskaičiuotos $k_d = 5,2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ir $1 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ atitinkamai. Šio darbo metu GCSF monomero jungimasis prie GCSF-R nebuvo tirtas, tačiau buvo gauta GCSF/L α /GCSF asociacijos greičio konstanta, kuri yra 2,45 karto mažesnė – $k_a = 4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Toks skirtumas gali būti todėl, kad buvo naudoti skirtingi matematiniai modeliai. Senesniame tyrime pritaikytas dviejų etapų modelis, kuriame nėra trečiojo etapo, kurio metu analizuojamas baltymas su receptoriais sudaro stiprų nedisocijuojantį kompleksą. Lyginant šio darbo GCSF/L α /GCSF + GCSF-R asociacijos greičio konstantą su monomero k_a , matoma, jog jos yra panašios, bet GCSF/L α /GCSF yra šiek tiek mažesnė. Tai reiškia, jog homodimeras kiek lėčiau jungiasi prie receptoriaus negu monomeras, dėl to, kad jo masė yra didesnė. Taip pat šiame darbe pritaikius standartinį Langmuir modelį apskaičiuotos naujo chimerinio SCF/L α /GCSF baltymo sąveikos su GCSF-R k_a ir k_d , kurios yra $8,5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ir $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ atitinkamai. Šio heterodimero asociacija yra lėtesnė negu GCSF/L α /GCSF ir GCSF monomero, bet disocijuoja jis apie 100 kartų lėčiau negu monomeras. Kitas iš atvirkštine tvarka sulietų citokinų sukurtas baltymas GCSF/L α /SCF su GCSF-R nesąveikavo. To priežastimi galėtų būti papildomo domeno su jungtuku prijungimas prie G-CSF C-galo, o ne N-galo. G-CSF baltymo C-galas yra labai arti prisijungimo prie receptoriaus vietos (Layton, 2006), todėl gali būti, jog sąveika nevyksta, nes yra blokuojama prieiga prie jos.

Naudojant VVAE metodą taip nustatytos baltymų sąveikos su c-kit receptoriumi ir naudojant standartinį Langmuir modelį buvo gautos asociacijos ir disociacijos greičio konstantos. SCF monomero jungimosi prie šio receptoriaus k_a buvo mažiausia iš visų baltymų – $k_a = 1,37 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, o apskaičiuota disociacijos greičio konstanta – $k_d = 1,43 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Abu sulieti baltymai prie c-kit receptoriaus jungėsi greičiau negu monomeras. SCF/L α /GCSF ir c-kit sąveikos $k_a = 7,77 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, kuri yra daugiau nei 5 kartus didesnė. O disociacijos greitis buvo labai panašus į SCF – $1,39 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. GCSF/L α /SCF sąveika su c-kit palyginus su monomeru ir SCF/L α /GCSF buvo labai greita – apskaičiuota k_a buvo $1,14 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ir tai yra net 83 kartus daugiau už monomero konstantą. Taip pat šio heterodimero disociacija yra greičiausia negu kitų baltymų – $k_d = 6,46 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$. Jo disociacija vyksta apie 45 kartus greičiau negu SCF monomero.

Įvertinus visų baltymų sąveikas su receptoriais bei jų asociacijos ir disociacijos greičio konstantas, yra matoma, jog chimerinis SCF/L α /GCSF galėtų būti vertas išsamesnių tyrimų atlikimo. Jis geba jungtis prie abiejų receptorių, kuomet GCSF/L α /SCF – tik prie c-kit. Taip pat jo sąveikos su c-kit asociacijos greičio konstanta yra didesnė negu SCF monomero, o

sąveikos su GCSF-R – nors ir mažesnė, tačiau pakankamai gera. Dėl to SCF/L α /GCSF baltymas galėtų būti tinkamas kitų biologinių ir terapinių savybių tyrimams.

IŠVADOS

1. Iš sulietų rekombinantinių baltymų genų GCSF/L α /GSCF ir SCF/L α /GCSF sukonstruotas baltymo GCSF/L α /SCF genas.
2. Sukurtas imuninis jutiklis receptoriaus-ligando sąveikų nustatymui tarp SCF ir GCSF receptorių ir rekombinantinių citokinų G-CSF, SCF, GCSF/L α /GSCF, SCF/L α /GCSF bei GCSF/L α /SCF, naudojant VVAE metodą.
3. SCF/L α /GCSF sąveikauja su abiem receptoriais – prie GCSF-R jungiasi daugiau nei 2 kartus greičiau negu homodimeras ir prie c-kit 5,7 karto greičiau negu SCF monomeras, o nuo jo disocijuoja beveik tokiu pačiu greičiu kaip ir SCF.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

AISTĖ LISAVIČIŪTĖ

Sulietų citokinių konstravimas ir aktyvumo tyrimas

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Darbo metu buvo iš citokinių konstruojamas rekombinantinis chimerinis GCSF/L α /SCF baltymas ir tiriamas jo bei kai kurių kitų baltymų aktyvumas. Tai atlikta naudojant visiško vidaus atspindžio elipsometrijos (VVAE) metodą, kuriam buvo kuriami imuniniai jutikliai ir tuomet matuotos GCSF/L α /SCF ir SCF/L α /GCSF baltymų sąveikos su GCSF-R ir c-kit receptoriais, GCSF/L α /GCSF – tik su GCSF-R, o SCF monomero – tik su c-kit. Kad būtų įvertintos sąveikos, pritaikyti matematiniai modeliai ir apskaičiuotos jų asociacijos ir disociacijos greičio konstantos. GCSF/L α /SCF baltymas buvo sukonstruotas ir sukurti imuniniai jutikliai baltymų sąveikų tyrimui. Nustatyta, jog GCSF/L α /SCF geba jungtis greičiausiai prie c-kit receptoriaus bei disocijuoti lyginant su kitais baltymais, tačiau su GCSF-R nesąveikauja. SCF/L α /GCSF baltymas jungiasi prie abiejų receptorių – prie GCSF-R kiek lėčiau nei homodimeras, o prie c-kit greičiau nei SCF monomeras. Taip pat jis lėčiau disocijuoja negu SCF.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Institute of Biosciences

AISTÈ LISAVIČIŪTÈ

**Engineering Recombinant Fusion Cytokines and Investigation
of Their Activity**

Master Thesis

SUMMARY

The aim of this work was to fuse cytokines to engineer a recombinant chimeric protein GCSF/L α /SCF and investigate the activity of this and several other proteins. It was done using total internal reflection ellipsometry (TIRE) which required immunosensors that were also created. The interactions between GCSF/L α /SCF, SCF/L α /GCSF and their receptors GCSF-R and c-kit were measured. Also, GCSF/L α /GCSF binding to GCSF-R and SCF monomer binding to c-kit were measured. Mathematical models were applied to calculate association and dissociation rate constants for evaluation of interactions between receptors and ligands. GCSF/L α /SCF was successfully engineered and immunosensors created for measuring the binding of the proteins. It was found that GCSF/L α /SCF is able to bind to c-kit the fastest when compared to other proteins, but it does not interact with GCSF-R. SCF/L α /GCSF interacts with both receptors – it binds to GCSF-R slightly slower than homodimer and faster to c-kit than SCF monomer. Also, it dissociates slower than SCF.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Almenar D, Mayans J, Juan O, Bueno JMG, Lopez JIJ, Frau A, Guinot M, Cerezuela P, Buscalla EG, Gasquet JA, Sanchez J. Pegfilgrastim and daily granulocyte colony-stimulating factor: Patterns of use and neutropenia-related outcomes in cancer patients in Spain - results of the LEARN Study. *Eur J Cancer Care*. 2009;18(3):280–286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2008.00959.x>

Bai Y, Ann DK, Shen WC. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent. *P Natl A Sci*. 2005;102(20):7292–7296. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500062102>

Balevicius Z, Baleviciute I, Tumenas S, Tamosaitis L, Stirke A, Makaraviciute A, Ramanaviciene A, Ramanavicius A. In situ study of ligand–receptor interaction by total internal reflection ellipsometry. *Thin Solid Films*. 2014;571:744–748. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2013.10.090>

Balevicius Z, Ramanaviciene A, Baleviciute I, Makaraviciute A, Mikoliunaite L, Ramanavicius A. Evaluation of intact- and fragmented-antibody based immunosensors by total internal reflection ellipsometry. *Sensor Actuat B-Chem*. 2011;160(1):555–562. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.08.029>

Balevicius Z, Talbot J, Tamosaitis L, Plikusiene I, Stirke A, Mickiene G, Balevicius S, Paulauskas A, Ramanavicius A. Modelling of immunosensor response: The evaluation of binding kinetics between an immobilized receptor and structurally-different genetically engineered ligands. *Sensor Actuat B-Chem*, 2019;297:126770. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126770>

Baumann A, Tuerck D, Prabhu S, Dickmann L, Sims J. Pharmacokinetics, metabolism and distribution of PEGs and PEGylated proteins: Quo vadis? *Drug Discov Today*. 2014;19(10):1623–1631. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.002>

Beekman R, Touw IP. G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. *Blood*. 2010;115(25):5131–5136. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-234120>

Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth F R*. 2014;25(4):355–367. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.011>

Cetean S, Căinap C, Constantin AM, Căinap S, Gherman A, Oprean L, Hangan A, Oprean R. The importance of the granulocyte-colony stimulating factor in oncology. *Clujul Med.* 2015;88(4):468–472. <https://doi.org/10.15386/cjmed-531>

Choe W, Durgannavar TA, Chung SJ. Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides. *Materials.* 2016;9(12):994. <https://doi.org/10.3390/ma9120994>

Costa JJ. The therapeutic use of hematopoietic growth factors. *J Allergy Clin Immun.* 1998;101(1):1–6. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70185-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70185-X)

Cox GN, Smith DJ, Carlson SJ, Bendele AM, Chlipala EA, Doherty DH. Enhanced circulating half-life and hematopoietic properties of a human granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin fusion protein. *Exp Hematol.* 2004;32(5):441–449. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.01.012>

Cui L, Wang D, McGillis S, Kyle M, Zhao LR. Repairing the Brain by SCF+G-CSF Treatment at 6 Months Postexperimental Stroke: Mechanistic Determination of the Causal Link Between Neurovascular Regeneration and Motor Functional Recovery. *ASN Neuro.* 2016;8(4):175909141665501. <https://doi.org/10.1177/1759091416655010>

Dale DC. Advances in the treatment of neutropenia: *Curr Opin Support Pa.* 2009;3(3):207–212. <https://doi.org/10.1097/SPC.0b013e32832ea6ae>

Dehbashi, M., Kamali, E., Vallian, S. Comparative genomics of human stem cell factor (SCF). *Mol Biol Res Commun.* 2017;6(1):1-11. <https://doi.org/10.22099/mbrc.2017.3919>

Do BH, Kang HJ, Song JA, Nguyen MT, Park S, Yoo J, Nguyen AN, Kwon GG, Jang , Jang M, Lee S, So S, Sim S, Lee KJ, Osborn MJ, Choe H. Granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) fused with Fc Domain produced from E. coli is less effective than Polyethylene Glycol-conjugated GCSF. *Sci Rep-UK.* 2017;7(1):6480. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06726-7>

Doycheva D, Shih G, Chen H, Applegate R, Zhang JH, Tang J. Granulocyte-colony Stimulating Factor in Combination with Stem Cell Factor Confers Greater Neuroprotection after Hypoxic–Ischemic Brain Damage in the Neonatal Rats than a Solitary Treatment. *Transl Stroke Res.* 2013;4(2):171–178. <https://doi.org/10.1007/s12975-012-0225-2>

Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot C. Congenital neutropenia: Diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6(1):26. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-26>

Duarte RF, Frank DA. The Synergy Between Stem Cell Factor (SCF) and Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF): Molecular Basis and Clinical Relevance. *Leukemia Lymphoma*. 2002;43(6):1179–1187. <https://doi.org/10.1080/10428190290026231>

Ekmekcioglu S, Kurzrock R, Grimm EA. Hematopoietic Growth Factors and Cytokines. In: *The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition*. 2014. p. 789–808. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4066-6.00057-3>

Fredriksson S, Bülow L. Chimeric Genes, Proteins. In: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier; 2001. p. 333–334. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0191>

Geissler K, Gunzer M, Ostermann H. How Safe Is the Administration of Long-Acting Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Cancer Patients? *Oncol Res Treat*. 2018;41(5):316–326. <https://doi.org/10.1159/000486681>

Germeshausen M, Skokowa J, Ballmaier M, Zeidler C, Welte K. G-CSF receptor mutations in patients with congenital neutropenia. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(4):332–337. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328303b9f6>

Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med*. 2011;208(4):715–727. <https://doi.org/10.1084/jem.20101059>

Hopman RK, DiPersio JF. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev*. 2014;28(1):31–40. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.01.001>

Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, Takagi S, Okano H, Ando K, Hotta T. Administration of Hematopoietic Cytokines in the Subacute Phase After Cerebral Infarction Is Effective for Functional Recovery Facilitating Proliferation of Intrinsic Neural Stem/Progenitor Cells and Transition of Bone Marrow-Derived Neuronal Cells. *Circulation*. 2006;113(5):701–710. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563668>

Kriechbaumer V, Nabok A, Mustafa MK, Al-Ammar R, Tsargorodskaya A, Smith DP, Abell BM. Analysis of Protein Interactions at Native Chloroplast Membranes by Ellipsometry. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e34455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034455>

Kroschinsky F, Hölig K, Ehninger G. The role of pegfilgrastim in mobilization of hematopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci*. 2008;38(3):237–244. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2008.04.007>

Kuhlmann MT, Kirchhof P, Klocke R, Hasib L, Stypmann J, Fabritz L, Stelljes M, Tian W, Zwiener M, Mueller M, Kienast J, Breithardt G, Nikol S. G-CSF/SCF reduces

inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med*. 2006;203(1):87–97. <https://doi.org/10.1084/jem.20051151>

Layton JE. The interaction of G-CSF with its receptor. *Front Biosci*. 2006;11(1):3181. <https://doi.org/10.2741/2041>

Latour RA. The langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior: Protein Adsorption and the Langmuir Isotherm. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(3):949–958. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35235>

Lee AY, Chung HK, Bae EK, Hwang JS, Sung BW, Cho CW, Kim JK, Lee K, Han JY, Lee CT, Joo HA. Recombinant human G-CSF/GM-CSF fusion protein from *E. coli* showing colony stimulating activity on human bone marrow cells. *Biotechnol Lett*. 2003;25(3):205–11. <https://doi.org/10.1023/a:1022346800375>

Lennartsson J, Rönstrand L. Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol Rev*. 2012;92(4):1619–1649. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2011>

Li B, Gonzalez-Toledo ME, Piao CS, Gu A, Kelley RE, Zhao LR. Stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor reduce b-amyloid deposits in the brains of APP/PS1 transgenic mice. *Alzheimers Res Ther*. 2011;3(2):8. <https://doi.org/10.1186/alzrt67>

Liongue C, Ward AC. GCSF Receptor. In: S. Choi, editor, *Encyclopedia of Signaling Molecules*). Springer New York; 2016. p. 1–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9_101956-1

Meng Q, Wang J, Ma G, Su Z. Isotherm Type Shift of Hydrophobic Interaction Adsorption and its Effect on Chromatographic Behavior. *J Chromatogr Sci*. 2013;51(2):173–180. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms123>

Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008;111(2):485–491. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079681>

Mickiene G, Dalgediene I, Dapkunas Z, Zvirblis G, Pesliakas H, Kaupinis A, Valius M, Mistiniene E, Pleckaityte M. Construction, Purification, and Characterization of a Homodimeric Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Mol Biotechnol*, 2017;59(9–10):374–384. <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0026-7>

Molineux G. The Design and Development of Pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta#174;). *Curr Pharm Design*. 2004;10(11):1235–1244. <https://doi.org/10.2174/1381612043452613>

Molineux G, Foote M, Arvedson T. Twenty Years of G-CSF: Clinical and Nonclinical Discoveries. Springer Basel, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0218-5>

Morstyn G, Foote M, Lieschke GJ. Hematopoietic Growth Factors in Oncology. Humana Press, 2004. <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-747-5>

Nabok A, Tsargorodskaya A. The method of total internal reflection ellipsometry for thin film characterisation and sensing. *Thin Solid Films*. 2008;516(24):8993–9001. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2007.11.077>

Piao CS, Gonzalez-Toledo ME, Gu X, Zhao LR. The combination of stem cell factor and granulocyte-colony stimulating factor for chronic stroke treatment in aged animals. *Exp Trans Stroke Med*. 2012;4(1):25. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-4-25>

Plikusiene I, Balevicius Z, Ramanaviciene A, Talbot J, Mickiene G, Balevicius S, Stirke A, Tereshchenko A, Tamosaitis L, Zvirblis G, Ramanavicius A. Evaluation of affinity sensor response kinetics towards dimeric ligands linked with spacers of different rigidity: Immobilized recombinant granulocyte colony-stimulating factor based synthetic receptor binding with genetically engineered dimeric analyte derivatives. *Biosens Bioelectron*. 2020;156:112112. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112112>

Poksinski M, Arwin H. Protein monolayers monitored by internal reflection ellipsometry. *Thin Solid Films*. 2004;455–456:716–721. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2004.01.037>

Poksinski M, Arwin H. Total Internal Reflection Ellipsometry: Monitoring of Proteins on Thin Metal Films. In: Déjardin P, editor. *Proteins at Solid-Liquid Interfaces*. Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 105–118. https://doi.org/10.1007/3-540-32658-8_5

Rahmati M, Petitbarat M, Dubanchet S, Bensussan A, Chaouat G, Ledee N. Colony Stimulating Factors 1, 2, 3 and early pregnancy steps: From bench to bedside. *J Reprod Immunol*. 2015;109:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.01.005>

Root RK, Dale DC. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: Comparisons and Potential for Use in the Treatment of Infections in Nonneutropenic Patients. *J Infect Dis*. 1999;179(s2):S342–S352. <https://doi.org/10.1086/513857>

Schmidt, SR. Fusion Proteins: Applications and Challenges. In: Schmidt SR, editor. *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals* (p. 1–24). John Wiley Sons, Inc., 2013. p. 1–24. <https://doi.org/10.1002/9781118354599.ch1>

Scholz M, Schirm S, Wetzler M, Engel C, Loeffler M. Pharmacokinetic and -dynamic modelling of G-CSF derivatives in humans. *Theor Biol Med Model*. 2012;9(1):32. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-9-32>

Sinha S, Zhu QS, Romero G, Corey SJ. Deletional Mutation of the External Domain of the Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor in a Patient With Severe Chronic Neutropenia Refractory to Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003;25(10):791–796.

<https://doi.org/10.1097/00043426-200310000-00010>

Strohl WR. Chimeric Genes, Proteins. In: Reference Module in Life Sciences Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06199-9>

Strohl WR. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs*. 2015;29(4):215–239. <https://doi.org/10.1007/s40259-015-0133-6>

Takami A, Nakao S, Koizumi S, Matsuda T. Impaired response of granulocyte-committed progenitor cells to stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in human cyclic neutropenia. *Ann Hematol*. 1999;78(4):197–199.

<https://doi.org/10.1007/s002770050501>

Triot A, Järvinen PM, Arostegui JI, Murugan D, Kohistani N, Dapena Díaz JL, Racek T, Puchałka J, Gertz EM, Schäffer AA, Kotlarz D, Pfeifer D, Díaz de Heredia Rubio C, Ozdemir MA, Patiroglu T, Karakukcu M, Sánchez de Toledo Codina J, Yagüe J, Touw IP, Klein C. Inherited biallelic CSF3R mutations in severe congenital neutropenia. *Blood*. 2014;123(24):3811–3817. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-535419>

Vanz AL, Renard G, Palma MS, Chies JM, Dalmora SL, Basso LA, Santos DS. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): Cloning, overexpression, purification and characterization. *Microb Cell Fact*. 2008;7(1):13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-13>

Vazquez-Lombardi R, Roome B, Christ D. Molecular Engineering of Therapeutic Cytokines. *Antibodies*. 2013;2(4):426–451. <https://doi.org/10.3390/antib2030426>

Wang T, Ma K, Liu W, Jin G, Niu Y. Total internal reflection imaging ellipsometry biosensor: Its principle and applications. *AIF Conf Proc*. 2019;020007. <https://doi.org/10.1063/1.5110801>

Zamboni WC. Pharmacokinetics of Pegfilgrastim. *Pharmacotherapy*. 2003;23(8 Part 2):9S-14S. <https://doi.org/10.1592/phco.23.9.9S.32888>

Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. Crystal structure of human stem cell factor: Implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *P Natl A Sci*. 2000;97(14):7732–7737. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.7732>

Zhao S, Zhang Y, Tian H, Chen X, Cai D, Yao W, Gao X. Extending the Serum Half-Life of G-CSF via Fusion with the Domain III of Human Serum Albumin. *Biomed Res Int*, 2013; 2013:107238. <https://doi.org/10.1155/2013/107238>