

Tartu Ülikool

Loodus- ja tehnoloogiateaduskond

Keemia Instituut

Bakalaureusetöö

Viiruslaadsete osakeste puhastamine ja detekteerimine

Maksim Runin

Juhendaja: Prof. Ago Rinke

Kaasjuhendaja: M.Sc. Oliver Pulges

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

Osakonna juhataja:

Tartu, 2013

KASUTATUD LÜHENDID

VLP – viiruslaadne osake (eng. *Virus-Like Particle*)

PEG – polüetüleenglükool

MMLV – Moloney hiire leukeemia viirus (eng. *Moloney Murine Leukemia Virus*)

HEK cells – inimese embrüoonsed neerurakud (eng. *Human Embryonic Kidney cells*)

PBS – fosfaat-puhverdatud soolalahus (eng. *Phosphate Buffered Saline*)

Amp/Pen – ampitsilliin / penitsilliin

MC4R – melanokortiini retseptor 4 (eng. *Melanocortin 4 Receptor*)

RSV – Rous'i sarkoomi viirus (eng. *Rous Sarcoma Virus*)

YFP – kollane fluorestseeruv valk (eng. *Yellow Fluorescent Protein*)

PM CFP – palmitüleeritud müristüleeritud tsüaansinine fluorestseeruv valk (eng. *Palmitoylated Myristoylated Cyan Fluorescent Protein*)

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
Membraansed valgud.....	5
Membraansete valkude puhastamine ja rekonstrueerimine.	7
Viiruslaadsete osakeste kasutamine membraanvalkude puhastamiseks	8
Ultratsentrifuugimine.....	10
Kromatograafia.....	11
Viiruslaadsete osakeste ja valkude puhastamine polüetüleenglükooliga.	12
DETEKTEERIMINE.....	13
SDS-PAGE, Western Blot	13
Fluorestsents-spektroskoopia	15
Fluorestsentsanisotroopia.....	16
MATERJALID JA MEETODID.....	19
Materjalid	19
Rakkude kasvatamine	19
Plasmiidi transfekteerimine ja VLP-de korjamine	19
PEG puhastamine	20
Ultratsentrifuugimine.....	20
Fluorestsentsi anisotroopia.....	21
Fluorestsents-spektroskoopia	22
SDS-Western Blot.....	22
TULEMUSED.....	23
PEG kasutamine VLP sadestamiseks	23
PEG mõju fluorestseeruva ligandi anisotroopiale.	24
Ultratsentrifuugimine VLP-de sadestamisel PEG-ga.....	25
VLP puhastamine sahharoosi gradiendis	28
KOKKUVÕTE.....	36
SUMMARY	37
KASUTATUD KIRJANDUS	38

SISSEJUHATUS

Tänapäeval luuakse palju uusi ravimeid ja nende tootmine areneb väga kiiresti, sest uute haiguste ilmumisel vajatakse ka uusi ravimeid. Enne kui ravim tuleb turule ja seda hakatakse kasutama, tuleb uurida ravimi aktiivainete omadusi, kuidas aine interakteerub oma sihtmärgiga.

Suur osa kasutatavate ravimite sihtmärkidest on raku membraansed valgud. Konkreetse membraanvalgu uurimiseks tuleb see eraldada ülejäänutest valkudest, mis võivad segada vajaliku valgu uurimist. Valkude puhastamise meetodeid on väga palju. Üks peamisi valikuid, mis tuleb teha, on otsustada, kas membraan lahustada ja valgud viia uude kunstlikku membraani või puhastada valk koos loodusliku membraaniga.

Valkude omadused sõltuvad otseselt struktuurist ja konformatsioonist. Kui me lahustame membraani ja viime valke lahusesse, siis konformatsioon muutub ja sellega muutuvad ka valkude omadused. Seega on mõistlik valkude uurimises liikuda looduslike membraanide kasutamise poole. Looduslike membraanide puhastamiseks on alternatiivseks meetodiks kasutada viiruslaadseid osakesi.

Käesoleva töö eesmärgiks on võrrelda viiruslaadsete osakeste puhastamismeetodeid, hinnata nende sobivust ja efektiivsust edasise eesmärgiga analüüsida membraanseid valke, mis nende viiruselaadsete osakestega kaasa tulevad.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Membraansed valgud

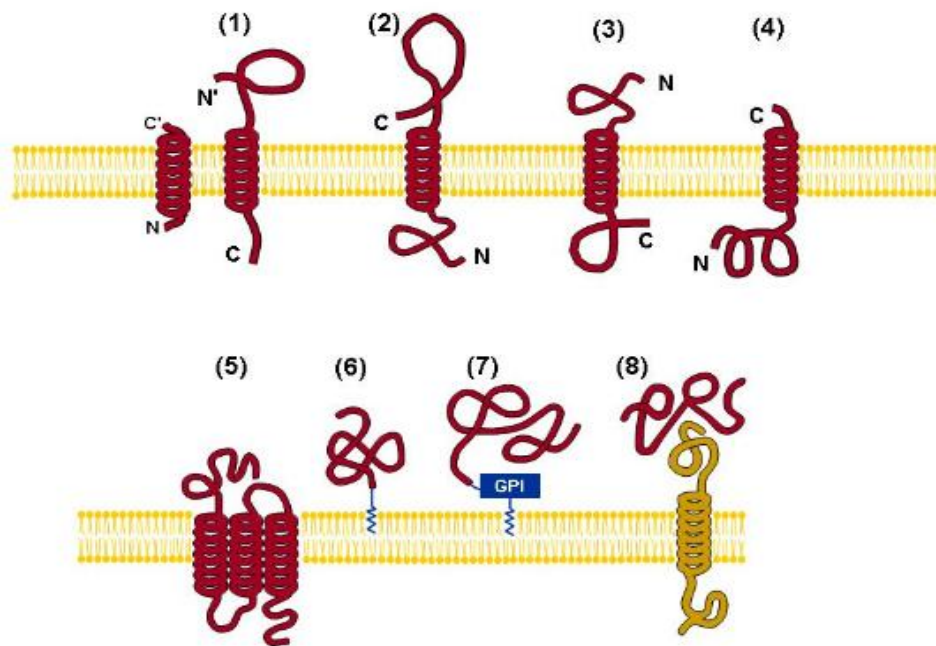
Rakumembraan mängib olulist rolli raku elus. Membraan on alati suletud ja eraldab raku sisesüsteemi ümbritsevast keskkonnast. Rakumembraanid on väga õhukesed (umbes 5 nm) ja koosnevad peamiselt fosfolipiididest ja valkudest [1]. Fosfolipiidid on amfiifilised ehk nendel on hüdrofiilne polaarne osa, kus asub fosfaatrühm ja hüdrofoobne osa, kus asuvad pikad rasvhapped. Fosfolipiidid asuvad membraani kahes kihis. Hüdrofoobsed otsad on suunatud membraani sisse ja hüdrofiilsed osad asuvad väljaspool membraani. Selline struktuur määrab rakumembraani omadused.

Vesi on polaarne ja interakteerub membraani polaarse osaga. Mittepolaarne osa takistab vee membraani läbimist. Lipiidne kaksikkiht on bioloogiliste membraanide põhiline struktuuriosa, aga just membraansed valgud annavad membraanile funktsionaalsed omadused. Erinevad valgud on membraaniga erinevalt seotud. Seostumiseks on mitmeid võimalusi. Osad valgud läbivad membraani üks või mitu korda. Sellised valke nimetatakse transmembraanseteks (Joonis 1 (1-5)). Need valgud on amfiifilised ja läbivad membraani oma hüdrofoobse osaga. Kuna peptiidside on polaarne ja membraani sees on mittepolaarne keskkond, siis peptiidside vahel paiknevad vesiniksidemed põhjustavad tihti alfa-heeliksi moodustumist.

Teist tüüpi valgud asuvad tsütosoolis ning on seotud membraani kaksikkihi sisekihiga. Sidumine võib toimuda lipiidse ankruga (Joonis 1 (6)) või valgu alfa-heeliksi kaudu, mis membraani ei läbi. Mõned valgud võivad olla ka rakust väljas- ja seespool ning seotud glükosüülfosfatidüülinositol (GPI) ankruga (Joonis 1 (7)). Sellised valgud võivad kergelt eralduda membraani pinnalt spetsiifilise ensüümiga, mille nimi on fosfaatidüülinositol-spetsiifiline fosfataas C. Lisaks on veel valke, mis ei ole otseselt seotud membraaniga, vaid on seotud valkudega, mis on omakorda seotud membraaniga (Joonis 1 (8)).

Valke, mis võivad eralduda membraanist, nimetatakse perfeerseteks valkudeks. Valke, mis on otseselt seotud membraaniga, ja ei saa kergesti membraanist eralduda, nimetatakse integreeritud valkudeks. Ainult transmembraansed valgud võivad funktsioneerida rakumembraani mõlemal pool. Nendel on kaks olulist osa: alfa-heeliksi rikkam osa, mis on

hüdrofoobsem ja seega transmembraanne ning hüdrofiilne osa, mis on enamasti raku sees või väljas.



Joonis 1. Membraansete valkude tüübid.

(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemType/Readme.htm>)

Need valgud omandavad unikaalse orientatsiooni membraanis. Unikaalne struktuur põhjustab nii asümmeetrilise valgu paiknemist membraanis kui ka valgu domeenide funktsioonide erinevust raku sees ja väljas. Alfa-heeliksid on väga olulised valkude osad. Kuna lipiidne kaksikkiht on voolav, toimub ka valkude difusioon selle kihi sees, mille tulemusel on võimalik valkude omavaheline interaktsioon.

Kui me räägime transmembraansetest valkudest, siis valgu alfa-heeliksi rikas osa membraanis difundeerub. Valkude alfa-heeliksid interakteeruvad omavahel. Kuna aminohapete valik valkudes on erinev, siis alfa-heeliksite vahelised interaktsioonid on väga spetsiifilised. Transmembraansetel valkudel, mis läbivad membraani mitu korda, on väga täpne ja spetsiifiline alfa-heeliksite positsioon, mis baseerub valk-valk interaktsioonil. Kui me tahame uurida mingit konkreetset transmembraanset valku, siis uurimiseks soovitatud süsteem on selline, kus uuritav valk on täpselt samas konformatsioonis nagu elavas rakus. Vastasel juhul võib valk oma funktsionaalsuse kaotada või seda muuta ning see võib viia valedele tulemustele.

Transmembraanse valgu omaduste täpsemaks uurimiseks on soovitatav see puhastada

mõõtmist segavatest mõjuritest, et saada konkreetset valku kajastavaid täpsemaid tulemusi ja saavutada kontrollitumat keskkonda. Rakus on peale uuritava valgu tohutult palju erinevaid valke, sealhulgas signaalmolekule, mis kõik võivad segada korrektsete tulemuste saamist.

Membraansete valkude puhastamine ja rekonstrueerimine.

Põhimõtteliselt võivad kõik ained, mis lõhuvad hüdrofoobseid interaktsioone, olla kasulikud membraansete valkude puhastamiseks. Kõige paremini sobivad selleks detergendid. Need on väikesed erineva struktuuriga amfiifilised molekulid. Amfiifilisus tähendab, et molekulil on nii hüdrofiilset osa, mis interakteerub hästi veemolekulidega, kui ka hüdrofoobset osa, mis interakteerub teiste hüdrofoobsete molekulidega või nende osadega. Tänu hüdrofiilsele osale detergendid lahustuvad vees paremini kui rasvad. Kui detergentide kontsentratsioon lahuses on väike, siis on detergendid monomeersed ehk kõik molekulid on lahuses eraldi. Kui kontsentratsioon suureneb, hakkavad ilmuma detergentidest koosnevad mitsellid.

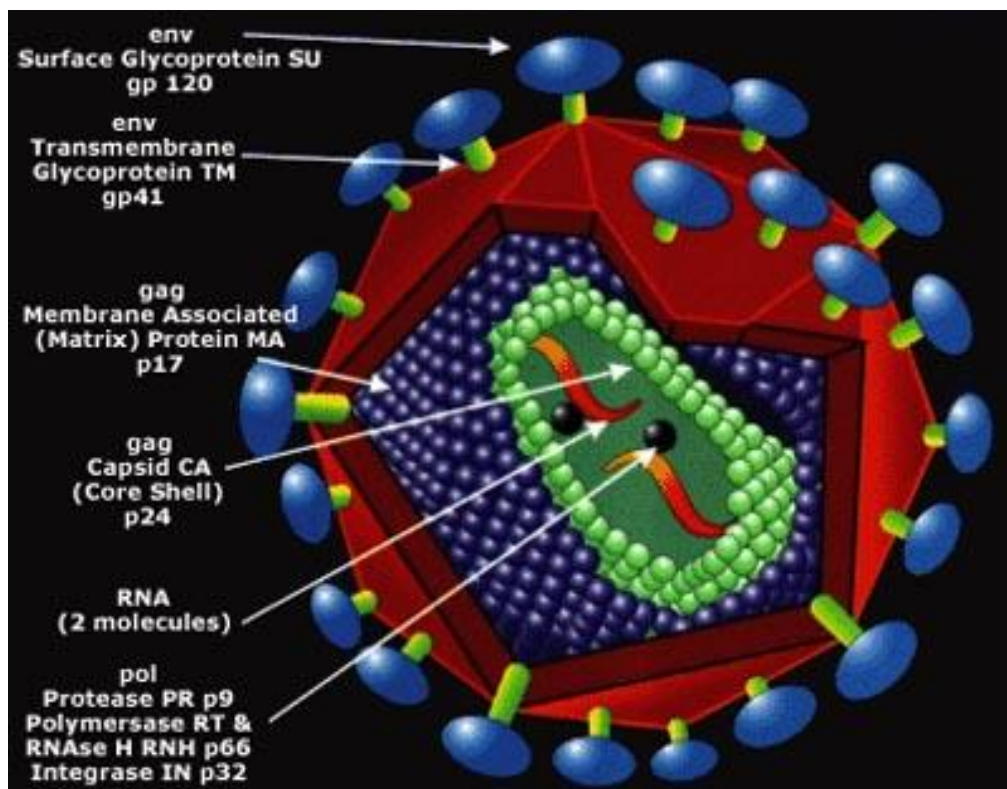
Mitsellid on rakumembraanilaadsed moodustised, mis on põhjustatud samadest interaktsioonidest amfiifilsete molekulide vahel. Monomeerse detergenti kontsentratsioon jääb samaks sõltumata mitsellide kogusest. Kui detergendid ja membraanid on samas lahuses, siis detergenti hüdrofoobne osa interakteerub valgu hüdrofoobse osaga ja seega detergenti molekulid ümbritsevad teda. Kuna detergenti teine osa on hüdrofiilne, siis läheb valk lahusesse detergent-valk kompleksina. Kui me vähendame detergenti kontsentratsiooni lahuses, kus on sellised kompleksid, siis hüdrofiilsete osade arv valgu kohta väheneb ja valgud ei lahustu nii hästi. Kui me lisame sellisesse keskkonda veel fosfolipiide, siis hakkavad juhuslikult moodustuma väikesed vesiikulid, kus on membraansed valgud. Kui valgud on vesilahuses, siis konformatsioon muutub ja sellega muutuvad ka valgu omadused.

Konformatsiooni muutuse pärast ei ole valke võimalik vesilahuses uurida. Konformatsioon ei muutu, kui valgud on membraani sees. Sellepärast ongi vaja uurimiseks viia valke kunstlikult tehtud membraani [1].

Viiruslaadsete osakeste kasutamine membraanvalkude puhastamiseks

Rakumembraani on võimalik puhastada retroviiruste abil. Kui retroviirused väljuvad rakust, siis nad võtavad endaga kaasa membraaniosa, ümbritsedes sellega viiruse kapsiidi. Retroviirus on nukleiinhapest ja valkudest koosnev osake, mis ise paljuneda ei saa, aga kasutab selleks elusrakke. Nukleiinhape ja valkudest tehtud kapsiid on viiruste põhiosadeks.

Retroviirused on *Retroviridae* pere viirused. Nende erinevus teistest viirusest seisneb selles, et nad kasutavad unikaalset fermenti - pöördtranskriptaasi, mille abil sünteesitakse DNA virioon RNA maatriksil. Pöördtranskriptsioon mängib olulist rolli retroviiruste reproduktsioonis. Sellega on seotud viiruse DNA integreerimine raku genoomi. Retroviiruse genoomi põhiosad on *gag*, *pol* ja *env*. Nad kodeerivad viiruse erinevate osade molekule (Joonis 2.).



Joonis 2. Retroviiruse struktuur ja selle valke kodeerivad genoomi osad.

(http://www.stanford.edu/group/nolan/tutorials/ret_6_gpedesc.html)

Env kodeerib glükoproteiine, mis asuvad väliskapsiidi pinnal (SU, TM). SU (eng. *surface*) valk vastutab viiruse seostumise eest rakuga ehk viiruse "kleepumise" eest rakumembraani pinnaga. TM (eng. *transmembrane*) valk vastutab viiruse rakumembraani läbimise eest.

Üldiselt *env* genoomi osa vastutab retroviiruse infekdeerimisomaduste eest, sest kui SU ja TM valgud puuduvad, siis viirus ei saa seostuda märklaudrakuga.

Gag kodeerib struktuursed osad ehk välis- ja sisekapsiidid. MA (eng. *Membrane Associated*) valkudest luuakse väliskapsiidi ja CA (eng. *Core Associated*) valkudest luuakse sisekapsiidi.

Pol valgud vastutavad viriaalse DNA sünteesi eest ja pärast infektsiooni selle DNA integreerimise eest raku DNA-sse [2, 3].

Retroviiruste kapsiidset valku saab kasutada membraansete valkude puhastamisel sellepärast, et retroviiruse kapsiidi loomisel rakku ja loodud osakese väljumisel võetakse rakust kaasa osa rakku ümbritsevast membraanist.

Täisfunktsionaalsed retroviirused on ohtlikud, kuna nad paljunevad kiiresti ja nende genoom jääb rakku kuni selle elu lõpuni. Töö nendega on väga suur biorisk nii endale, kui ka ümbritsevatele keskkonnale. Sellepärast tulebki vältida tööd reaalsete viirustega ja kasutada viiruselaadseid osakesi, mis põhinevad erinevatel retroviiruste osadel (VLP). Retroviirus VLP on viiruse kapsiid ilma genoomi ja pöördtransfektaasita, mis on olulised viiruse paljunemisel.

Modifitseeritud rakud toodavad *gag*-valku, millest moodustub ainult struktuurne osa ehk kapsiid. VLP-d on mittenakatavad, kuna selles puuduvad *env*-valgud ja VLP ei saa teistesse rakkudesse sisse minna. Ühesõnaga, on ainult viiruse skelett ja rakumembraani osa selle skeleti ümber. VLP on efektiivne nanomaterjal, mis võtab paljunemisel rakust membraani koos selles olevate valkudega. Ainult retroviiruse *gag*-valgust piisab VLP moodustamiseks, kui see on ekspresseeritud eukarüootsetes rakkudes [4, 5].

Membraansete valkude orientatsioon uutes osakestes on eeldatavasti sama nagu peremeesrakus. Nad on suhteliselt stabiilsed ja sobivad membraanse materjali kandjateks isegi mitu tundi kestvates katsetes [6]. On näidatud ka säilivust kuni 12 kuud 4 °C juures [7].

Erineva päritoluga retroviirustel on erinevusi osas, mis jääb välise lipiidse membraani ja sisemise kapsiidi vahele. Muutes retroviiruse struktuuri saame muuta ka kaasatulevate osakeste suurust ja sellega valida valke, mida VLP-sse kaasame. *Gag*-genoomi osa koosneb mitmest osast [4, 8]. Osi muutes saame muuta ka VLP-sid. Samuti on võimalus saada hübriidseid VLP-sid ehk kimääre. Nad on tehtud erinevate viiruste *gag*-genoomi osadest, näiteks RSV ja HIV-1 [8]. Erinevad kombinatsioonid annavad erinevaid kimäärseid VLP-sid, mis erinevad *gag*-valkude valikus ja antud meetodi jaoks on määrav ka suurus ning

membraani ja kapsiidi vaheline ala. Kui me teame, kui suur on meid huvitav valk (näiteks G-valk), siis saame arvestada, kui suur peab olema kapsiidi ja membraani vaheline ruum, ning seega võime valida millist viirust või kimääri kasutada.

Ultratsentrifuugimine

Valkude puhastamiseks on vaja saada uuritav valk rakust kätte. Rakku saab purustada mitmel viisil: mehaaniliselt (homogenisaator), ultraheliga või rõhuga. Saadud homogenaadist on võimalik eraldada erineva suurusega osakesi, kasutades selleks tsentrifuugimist. Tsentrifugimiskiirusest, mida väljendatakse rakendatava raskuskiirenduste kordsusega, ja ajast sõltub, millised raku osad sadestuvad. Madalal kiirusel (1 000 g, 10 min) saame eraldada purustamata terved rakud ja rakkude suuremad struktuurid. Keskmisel kiirusel (20 000 g, 20 min) saame eraldada suured organellid. Kõrgel kiirusel (80 000 g, 1 tund) eralduvad väiksed organellid ja vesiikulid. Väga kõrgel kiirusel (150 000 g, 3 tundi) eralduvad viirused ja makromolekulid [1].

Raku siseste viiruste puhastamiseks võime kasutada neid kiiruseid järjest, eraldades iga eelmise tsentrifuugimise sademe. Seega viimasel fuugimisel me kogume ainult viirused ja makromolekulide agregaadid. Rakust väljunud viiruste ja VLP-de kogumiseks on võimalik korjata modifitseeritud rakkude söötmelahust mis sisaldab näiteks VLP-sid ja kasutada ainult esimest ja viimast tsentrifuugimise sammu.

Tsentrifugimine on esimene samm fraktsioneerimisel, aga eraldamine toimub suures osas sõltuvalt osakeste suurusest. Selleks, et saada suurem lahutuvus, kasutatakse kas sahharoosi või CsCl gradienti, mida läbib fraktsioneeriv lahus tsentrifuugimise ajal [1]. Esiteks, on vaja valmistada sahharoosi või CsCl lahused erineva kontsentratsioonidega. Peale seda asetatakse lahused tuubi kiht kihi haaval: alla läheb suurema kontsentratsiooniga lahus ja kontsentratsioon väheneb kuni tuubi ülemise osani, kus on kõige lahjem lahus, mille peale läheb homogenaat või VLP-si sisaldav lahus. Oluline on see, et kihid ei läheks segamini, muidu gradient ei tööta.

Siis, kui gradient ja fraktsioneeriv lahus on pandud tuubi, läheb kõik tsentrifuugi. Tsentrifugimise protsessis uuritavad lahused läbivad gradiendi ja lahuses olevad osakesed peatuvad sellisel kontsentratsioonil, kus gradiendi tihedus on võrdne osakese tihedusega.

Kuna homogenaadis või VLP-dega lahuses on väga palju erineva tihedusega osakesi, siis saame ka palju kihte. Pärast tsentrifuugimist on väga oluline neid kihte uuesti mitte segi ajada. Kihid saab kätte järgmiselt: tuubi põhja teeme augu ja gradient hakkab tilkuma. Sõltuvalt sellest, kui palju fraktsioone tahame saada, valime kogumistuubide arvu. Peale seda lähevad kõik fraktsioonid analüüsi.

Kromatograafia

Valkude ja viiruslaadsete osakeste puhastamisel kasutatakse tihti kromatograafilisi meetodeid. Ioon-vahetuskromatograafia on kromatograafia liik, mis eraldab osakesi nende laengu järgi. Näiteks, kui meil on negatiivselt laetud osake ja kolonni statsionaarne faas on positiivselt laetud, siis selline osake liigub kolonnis aeglasemalt, kui neutraalne osake ja positiivne osake liigub kiiremini, kui neutraalne, sest positiivne statsionaarne faas lükkab positiivseid molekule mobiilsesse faasi [9, 10]. VLP-de ümber on rakumembraan, mis koosneb fosfolipiididest, mis on negatiivselt laetud. Seega ioon-vahetuskromatograafia kolonnis, kus statsionaarne faas on positiivselt laetud, VLP-d liiguvad aeglasemalt.

Teine kromatograafia liik, mis leiab antud juhul tihti kasutamist, baseerub osakeste eraldamisel nende suuruse järgi (eksklusioonkromatograafia või geelfiltreerimiskromatograafia) [9, 10]. Põhimõte baseerub selles, et kolonni statsionaarfaas on molekulaarsõelad, mis on sfäärilise kujuga ja nendega on kolonn täidetud. Need sõelad on tehtud polümeerestest karbohüdraatidest ja arüülamiididest. Kui molekulid või osakesed on väiksemad, kui sõelade poorid, siis osakesed ei mahu aukude sisse ja läbivad kolonni statsionaarse faasi osakeste vahelt. Kui molekulid või osakesed on väiksemad kui sõelade poorid, siis nad läbivad sõelade labürindi ja liiguvad aeglasemalt kui suured osakesed [9, 10].

Kolmas tihti kasutatav meetod on afiinsuskromatograafia. Siin on statsionaarne faas inertne maatriks, kuhu on spetsiifiline ligand kovalentselt seotud. Kui valkude segu läbib kolonni, siis valk, mille ligand on maatriksis, jääb sinna kinni, aga ülejäänud valgud läbivad kolonni. Tuleb meeles pidada, et valk-ligand interakteerumine on väga spetsiifiline, sellepärast uuritava valgu puhtus on suur. Kui kogu valkude segu on läbinud kolonni, siis võime muuta solventi koostist ja eraldada uuritava valgu kolonnist [10]. Kromatograafia on laialt kasutusel valkude ja viiruslaadsete osakeste puhastamiseks [7, 11]. Kromatograafilise meetodi efektiivsuse tõstmiseks on võimalik neid üksteise järel kasutada [12].

Viiruslaadsete osakeste ja valkude puhastamine polüetüleenglükooliga.

Polüetüleenglükool (PEG) on vees lahustuv polümeer, mida kasutatakse laialt keemilises ja biomeditsiinilises tööstuses. Varasemad artiklid näitavad, et PEG interakteerub valkudega ja selle tagajärjel muutub oluliselt nende lahustuvus vees [13]. PEG ei denatureeri valke, mis teeb ta heaks valkude kontsentreerimise agendiks. Termin "pegülatsioon" tähendab, et uuritav molekul või osake on konjugeeritud PEG molekulidega, mis suurendab osakeste suurust, ja teeb need vees lahustuvaks [14]. Sageli kasutatakse PEG molekulmassiga 6 000 Daltonit [15,16]. Oluline on ka PEG molekulide struktuur. Kui sadestatavat valku ümbritsevad PEG molekulid on lineaarse struktuuriga, siis see takistab vähem teiste molekulide pääsemist konjugeeritud valgu pinnale, kui PEG hargnenud molekulaarstruktuuri puhul [17].

Üheks heaks näiteks on aastal 2002 avaldatud artikkel, kus oli uuritud erinevaid tegureid, mis mõjutavad PEG-ga sadestamist. Selles töös puhastati HIV-1 VLP-sid. Lahus koos viiruste kapsiididega segati PEG lahustega 1:1 ja hoiti 4 °C juures mõnda aega, peale mida VLP-PEG kompleks sadestatakse tsentrifuugil. HIV-1 VLP-de sadestamisel antud meetodil varieeriti kasutatava PEG-i PEG molekulmassi, PEG kontsentratsiooni, jahutamise aega, tsentrifuugimise aega ja tsentrifuugimiskiirust.

PEG molekulaarmass varieerus vahemikus 1 000 - 20 000 Daltonit, sest PEG väiksema molekulaarmassiga on toksiline, aga lahused PEG molekulmassiga rohkem kui 20 000 Daltonit on juba liiga viskoossed. Tuli välja, et PEG massiga 20 000 Daltonit annab parimaid tulemusi. Järgmisena prooviti varieerida PEG lahuse kontsentratsiooni. Kontsentratsioonid olid valitud vahemikus 2-30%. Parim tulemus saadi kontsentratsioonil 20%.

Prooviti varieerida jahutus- ehk inkubatsiooniaega vahemikus 1-25 tundi. Praktika näitas et pärast 16 tundi tulemus paremaks ei lähe, seega 16 tundi on parim aeg. Peale segu jahutamist tsentrifuugiti varieerides kiirust ja aega. Valiti kiirused 794 g, 1 984 g, 7 938 g ja 17 860 g. Parima tulemuse andis kõige suurem kiirus. Aega varieeriti vahemikus 5-30 min, millest 20 min osutus optimaalseks.

Selline meetod on lihtne ja odav, aga võib põhjustada probleeme edaspidisel analüüsil, sest PEG teeb lahuse viskoossemaks, mis võib segada näiteks fluorestsentsanisotroopia mõõtmisi. Üks suur meetodi puudus on see, et PEG (eriti suurema molekulaarmassiga) on raske proovist välja pesta.

DETEKTEERIMINE

Eespool on toodud ülevaade mõnedest puhastamismeetoditest, mis sageli kasutatakse. Siis, kui uuritavad valgud või VLP-d on puhastatud, on vaja kontrollida, kas meetod töötas või ei töötanud ja kui hästi see töötas. Edasi on toodud mõned näited, kuidas saab kontrollida meetodi puhastamisvõimsust.

SDS-PAGE, Western Blot

Valgud on positiivselt või negatiivselt laetud molekulid, sõltuvalt aminohapete valikust. Valgu molekulid hakkavad lahuses liikuma elektrivälja mõjul. Liikumiskiirus sõltub molekuli suurusest, kujust ja laengust. Laialdaselt kasutatav meetod, mis põhineb sellel omadusel, on SDS-PAGE (naatrium dodetsüülsulfaat - polüakrüülamiidgeeli elektroforees) [1, 10].

Selles meetodis kasutatakse väga tihedat geeli, kus polüakrüülamiid on maatriksiks. Geel valmistatakse monomeeride polümerisatsioonil. Seega saab valida ka pooride suuruse, kus uuritav valk liigub piisavalt aeglaselt. Enne geeli läbimist asetatakse valgud SDS lahusesse. Kuna SDS on detergent, on ta amfifilne ja seostub valkudega hüdrofoobse osaga, mille tõttu kõik valgu molekulid on lahuses eraldi. Lisaks SDS-le pannakse lahusesse ka beta-merkaptoeanooli, mis purustab S-S sidemed valkude vahel, seega kõik polüpeptiidse koostise osakesed on üksteisest eraldi.

Iga valgu molekul on seotud suure koguse detergenti molekulidega. Detergent on negatiivselt laetud, seega kogu valgu molekul saab negatiivse ümbrise ja liigub elektrivälja toimel positiivse elektroodi suunas ehk anoodile. Sama suurusega valgud liiguvad sama kiirusega, kuna detergenti mõjul on nende struktuur lineaarne ja detergenti molekulide arv, mis ümbritseb molekuli, on sama, seega negatiivne laeng on sama.

Suuremate valkude negatiivne laeng on suurem ja samas on suurem ka pidurdumine liikumise ajal. Vesilahuses need kaks efekti tasakaalustavad üksteist, aga kui valk liigub läbi geeli, siis suurtel valkudel on pidurdumine oluliselt suurem kui väikestel. Seepärast eraldatakse geelis valgud nende suuruse järgi. Kui valgud on elektrivälja mõjul eraldatud, siis on võimalik neid geelis värvida kasutades Coomassie sinist värvi. Kasutades *Silver Stain* või *Gold Stain* värvi valkude värvimiseks on võimalik detekteerida kuni 10 ng ühes bändis.

Spetsiifilist valku on võimalik visualiseerida *Western Blotting* meetodit kasutades. Põhimõte on järgmine: kui valgud on geelis suuruse järgi eraldatud, siis on vaja nad kas nitrotselluloosi või nailoni membraanile üle kanda. Seda saab teha kasutades tugevat elektrivälja.

Siis, kui kõik geelis olevad valgud on membraanis, tuleb kõik membraanis olevad vabad valku adsorbeerivad kohad blokeerida, et vältida mittespetsiifilist antikeha sidumist membraaniga. Seda tehakse tavaliselt mittespetsiifilise valguga nagu kaesiin (piimavalk). Siis, kui membraan on blokeeritud, pannakse membraan lahusesse, kus on uuritavale valgule spetsiifilised antikehad. Antikehad on Y-kujulised valgud, mida toodetakse B-rakude (lümfootsüütide) poolt organismi võõrmolekulide ehk antigeenide vastu ja edaspidi seostuvad nad spetsiifiliselt nende molekulide kindlate osadega.

Antikeha molekuli tippudel on lukupärane struktuur, mida nimetatakse paratopiks. Paratop on spetsiifiline ühele antigeenis olevale struktuurile nimega epitop. Sellepärast on antigeen-antikeha sidumine väga spetsiifiline. Kui sidumine on toimunud, siis sidumata antikehad pestakse ära. Sekundaarne antikeha seotakse primaarse antikeha detekteerimiseks/visualiseerimiseks.

Järgmine samm on siduda sekundaarsed antikehad, mis on orienteeritud primaarsete antikehade vastu. Primaarne antikeha on saadud loomallikast, selle tõttu on antikehal klassispetsiifiline osa, millega seostub sekundaarne antikeha. Näiteks küüliku rakust saadud sekundaarne antikeha interakteerub kõikide küüliku primaarsete antikehadega. Sidumata sekundaarne antikeha pestakse ära.

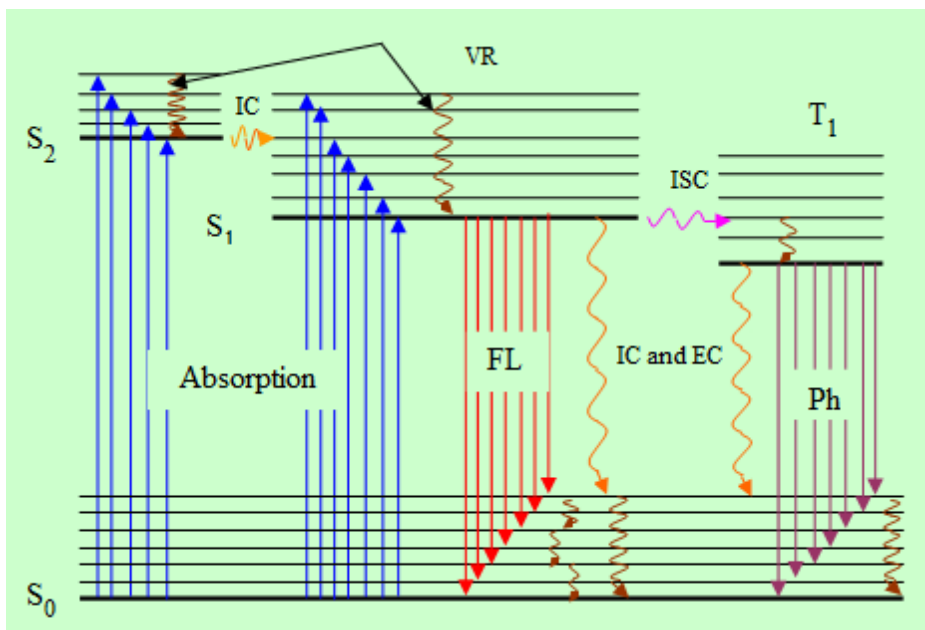
Üheks visualiseerimise meetodiks on see, et sekundaarsed antikehad on modifitseeritud sisaldama spetsiaalset ensüümi, mida aktiveerides saadakse värvreaktsioon ja nii on membraanil näha uuritava valgu asukoht. Näiteks küüliku sekundaarsele antikehale on juurde seotud leeliseline fosfataas. Leelise fosfataasiga reageerib substraat BCIP (4-bromo-4-klooro-3'-indolüfosfaati p-toluediini sool), millega omakorda reageerib NBT (nitro-sinine tetrasooliumi kloriid).

Tulemuseks on tumesinine värv membraani kohtadel, kus oli seotud sekundaarne antikeha koos leeliselise fosfataasiga. Membraanile on pandud ka *Ladder*, mis on värviline standardvalkude segu. See annab võimaluse uuritava valgu molekulaarmass teada saada. Meetodi eelisteks lihtsus ja tihti ka odavus, aga puudusteks on see, et see on aeganõudev ja halva automatiseeritavusega.

Fluorestsents-spektroskoopia

Fluorestsentsi põhimõte on järgmine: molekulide elektronid saavad omada energianivood, kus nad võivad olla kas ergastatud või põhiolekus. Kui foton põrkab vastu molekuli, siis molekuli elektronid võivad neelata footoni energia ja lähevad ergastatud olekusse. Elektroni relakseerumine molekulides tagasi põhiolekusse toimub mitmeastmeliselt.

Elektron võib relakseeruda andes energiat, kas soojusena, sideme võnkumise muutumise tagajärjel või elektromagnetlainena kiirgusena. Kui elektron relakseerub elektromagnetlainena, siis seda nimetatakse fotoluminestsentsiks [19]. Nagu on näha Joonisel 3, võib foton eralduda erineva energiaga. Sõltuvalt spinni muutusest (kas muutub või ei muutu) toimub kas fluorestsents või fosforestsents. Fluorestsents erinevalt fosforestsentsist, toimub peaaegu samal hetkel. Tavaliselt on neelatava footoni energia suurem kui väljuva footoni, sest mingi osa energiast läheb soojuseks ja mehaanilise töö tegemiseks.



Joonis 3. Tüüpilise fotoluminestsentsmolekuli energianivoode diagramm. S_0 on elektroni põhiolek. Kiirguse neelamisel (sinised nooled) läheb elektron ergastatud olekusse ja jõuab kõrgemale energianivoole, sõltuvalt kiirguse energiast. Relakseerumine põhiolekusse toimub molekulides mitmeastmeliselt. Elektron saab ära anda energiat kas vibratsioonina ehk mehaanilise töö kaudu (pruunid nooled), soojusena (oranž nooled) või kiirgusena fluorestsentsi (punased nooled) või fosforestsentsi (violetsed nooled) sõltuvalt elektroni spinni muutmisest.

(<http://www.monzir-pal.net/Instrumental%20Analysis/Contents/Luminescence.htm>)

Fluorestsentsanisotroopia

Polarisatsioon ja anisotroopia on üht ja sama sündmust kirjeldavad suurused. Mõlemad on valguse polariseeritud komponendi ja kogu intensiivsuse suhe, aga nendel on vahe. Joonis 4 näitab anisotroopia ja polarisatsiooni mõõtmist. Polarisaator, mis asub valguse allika ja proovi vahel, on z-teljega paralleelne. Siis, kui registreeriv polarisaator on z-teljega paralleelne, saame intensiivsuse I_{\parallel} , ning kui on suunatud z-teljega risti, saame intensiivsuse I_{\perp} . Seega saame väljendada polariseeritud komponendi $I_{\parallel}-I_{\perp}$, ning kogu intensiivsuse $I_x+I_y+I_z$. Kuna neelav valgus on z-teljega paralleelne, siis $I_x=I_y=I_{\perp}$ ja $I_z=I_{\parallel}$. Seega anisotroopia on väljendatud valemiga:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

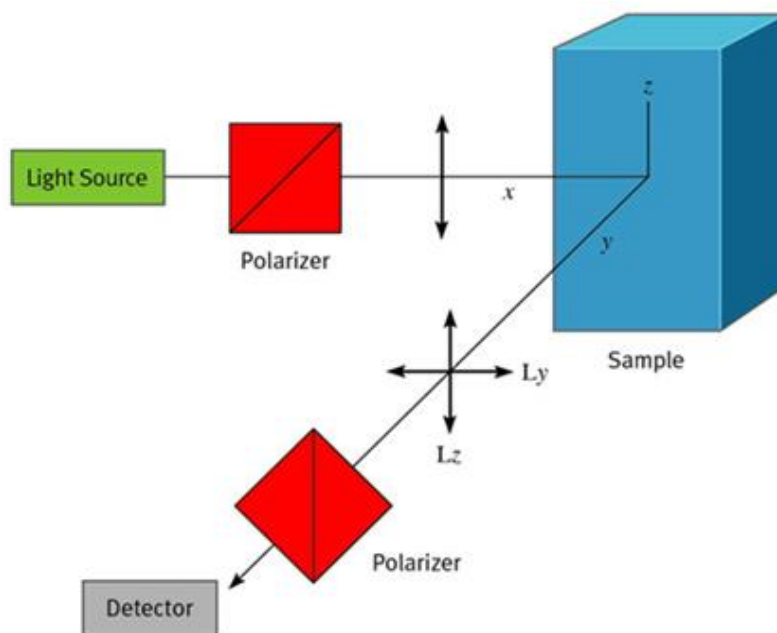
Polarisatsiooni on mugavam kasutada siis, kui valgus on suunatud piki x-telge. Sellisel juhul on polariseeritud valguse komponent väljendatud $I_{\parallel}-I_{\perp}$, ja kogu intensiivsus $I_z-I_y+2I_y$. Seega saame polarisatsiooni valemi:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Kuna polarisatsioon ja anisotroopia on sama sündmust kirjeldavad suurused, siis saab neid üksteiseks teisendada:

$$r = \frac{2P}{3-P}$$

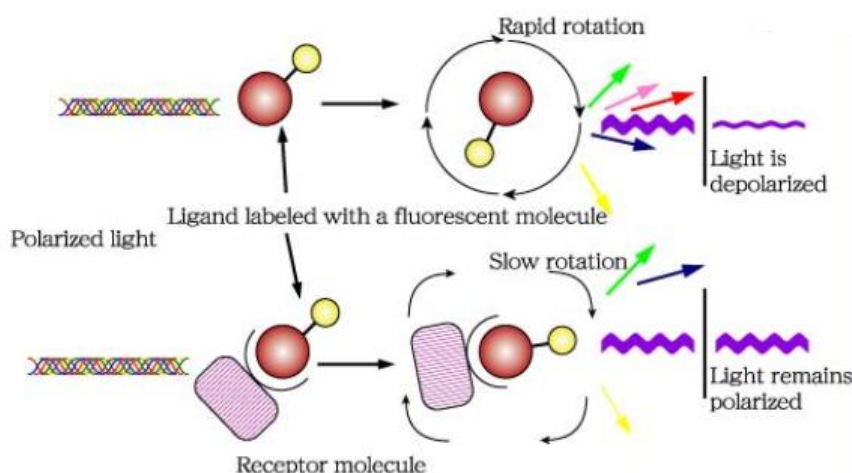
$$P = \frac{3r}{2+r}$$



Joonis 4. Fluorestsentsanisotroopia mõõtmise skeem.

(http://www.iss.com/resources/research/technical_notes/PC1_FP.html)

Kui polariseeritud kiirgus tuleb molekulile, siis molekuli kiirgus on ka polariseeritud. Kiirgus, mis läheb molekulist välja, on spetsiifiliselt orienteeritud. Kuna molekulid ja osakesed difusiooni järgi pöörduvad, siis eraldatud kiirguse suund muutub, mis viib kiirguse polarisatsiooni ja anisotroopia kaotusele. Kui osakesed pöörduvad kiiremini, kui toimub emissioon, siis eraldatav kiirgus on depolariseeritud ja anisotroopia läheneb nullile. Osakeste pöörlemise kiirust mõjutavad erinevad tegurid. Mida suurem on osake või molekul, seda aeglasemalt ta pöörleb ja seda rohkem polariseeritud kiirgust ta kiirgab (Joonis 5).



Joonis 5. Kiirguse polarisatsiooni sõltuvus osakese suurusest.

(<http://glycoforum.gr.jp/science/word/glycotechnology/GT-C06E.html>)

Lahuse viskoossus mängib olulist rolli anisotroopia mõõtmises. Mida viskoossem on lahus, seda aeglasemalt liiguvad seal osakesed, seda suurem on anisotroopia [20].

Fluorestsentsanisotroopia on väga kasulik meetod retseptor-ligand interaktsiooni uurimiseks. Fluorestseeruv ligand omab lahuses vabalt olles madalat anisotroopiat sellepärast, et pöörlemiskiirus on suur ja kiirguva valguse polarisatsioon on madal. Siis, kui ligand on seotud retseptoriga, anisotroopia kasvab. Retseptor-ligand kompleks on oluliselt suurem kui ligand, seega pöörlemiskiirus on madal ja kiirguva valguse polarisatsioon kasvab. Oluline on meeles pidada, et valgude uurimises võivad valgud üksteisega interakteeruda, mille tulemuseks on pöörlemiskiiruse alanemine.

Rakud, tootes VLP-sid, teevad neid väga sarnaselt, seega kõik sama liiki VLP-d on sarnase suurusega. Kui lahuses kõik osakesed on sama suurusega, siis teoreetiliselt nad pöörlevad sama kiirusega ja kui me vaatame polariseeritavat kiirgust paralleelses ja rist-suunas, siis näeme et intensiivsus muutub kahes suunas seaduspäraselt. Juhul, kui meil osakesed on erineva suurusega või lahuses on teise suurusega segavad osakesed, siis on näha, et polarisatsioon kaob. Kui me tahame uurida kindlat retseptor-ligand seostumist fluorestsentsi anisotroopia meetodiga, siis sellisel juhul on soovitatav, et lahuses oleksid uuritavad osakesed sama suurusega. Seega VLP-d on head sellise analüütilise meetodi jaoks. Teiseks eeliseks on see, et valgud, mis asuvad VLP ümbritsevas rakumembraanis, võivad üksteisega interakteeruda ja see interaktsioon ei muuda anisotroopiat.

Fluorestsents-spektroskoopia ja -anisotroopia on alternatiivsed meetodid retseptor-ligand seostumise uurimiseks, võrreldes näiteks radioligandi sidumise meetodiga. Need võimaldavad jälgida protsessi reaalselt. Fluorestsentsi anisotroopia meetod on ka loodussõbralikum, aga samas proovide puhtus peab olema kõrge.

MATERJALID JA MEETODID

Materjalid

1. HEK 293 rakuliin (American Type Culture Collection).
- 2, *Phoenix* rakuliin (Nolan lab, Stanford University).
3. MEM sööde (Minimum Essential Media, Gibco®).
4. DMEM sööde (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®).
5. ExGen 500 (Fermentas Life Sciences).
6. RSVgag plasmid (Pennsylvania University, Prof. J. Will).
7. DIR plasmid (Missouri S and T Resource Center).
8. MC4 plasmid (Missouri S and T Resource Center).
9. Sahharoos (SERVA).
10. Cy3B-NDP- α MSH (GE Healthcare).
11. Cav1-mred, mlv-gag-yfp, pm-cfp plasmiidid (Addgene).

Rakkude kasvatamine

Kõik katsed on teostatud HEK 293 ja *Phoenix* rakuliinidel. HEK 293 rakud kasvatati MEM söötmes, kuhu oli lisatud 10% FBS ja 1% ampitsilliin/penitsilliin antibiootikumide segu. *Phoenix* rakud (MMLV gag-pol geeni järgi valku tootvad rakud) kasvatati DMEM söötmes, kuhu oli lisatud 10% FBS ja 1% ampitsilliin/penitsilliin antibiootikumide segu. Rakud kasvatati 5% CO₂ inkubaatoris (Eppendorf Galaxy 48R) 37 °C juures petri tassides või 6-well plaatidel. Kõik rakkude jagamised toimusid 80% konfluentsuse juures maksimaalse edasitõstmislahjendusega 1:6. Enne transfektsiooni jagati rakud 6-well plaatidele ja kasvatati ilma antibiootikumideta DMEM söötmes kuni 80-90% konfluentsuseni.

Plasmiidi transfekterimine ja VLP-de korjamine

Kõik plasmiidid meie töös transfekteriti rakkudesse kasutades ExGen 500, tootja ettenähtud

protokollist lähtuvalt. Pärast plasmidi ja ExGeni segu lisamist plaadid tsentrifugeeriti (Sigma 3K30 centrifuge) 280 g 10 min 20 °C alandatud kiirendusega transfektsiooni efektiivsuse tõstmiseks. Rakud inkubeeriti 3 tundi 37 °C CO₂ atmosfääris ja seejärel plasmidi ning ExGen'i segu vahetati puhta söötme vastu. Katseteks vajalikud rakud ja sööde koguti 48 tundi pärast transfektsiooni. Sööde ja rakud tsentrifugeeriti 10 min 2 000 g 20 °C (rotor 13150). Supernatant korjati ja filtreeriti läbi 0.2 µm poori suurusega tselluloosifiltri (Corning Incorporated).

Kasutatud plasmiidid:

Cav1-mRed plasmiid (kodeerib Caveoliin1 valku mis on seotud punase fluorestseeruva valguga)

MMLV-*gag*-YFP plasmiid (kodeerib MMLV viiruse *gag*-valku koos kollase fluorestseeruva valguga)

PM CFP plasmiid (kodeerib palmitüleeritud müristüleeritud tsüaanosiinise fluorestseeruva valguga)

MC4R plasmiid (kodeerib melanokontiin 4 retseptorit)

RSV-*gag* plasmiid (kodeerib RSV viiruse *gag*-valku)

PEG puhastamine

Filtreeritud söötme proovid koos VLP-dega segati 20% PEG (molekulaarmass 10 000 Daltonit) ja 0.9% NaCl lahusega suhtes 1:1. Proovid inkubeeriti 4 °C juures 24 tundi VLP-PEG kompleksite modustamiseks. Pärast segu tsentrifugeeriti 30 min 4 °C 20 000 g (rootor 13180). Sade korjati ja lahustati 300 µl PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄•2H₂O, 2 mM KH₂PO₄, pH = 7.4) puhvis. Proovid säilitati 20 °C juures kuni katseni.

Ultratsentrifuugimine

Proov pandi 20% shaaroori lahuse peale. Proovid sadestati 32 000 rpm 20 °C 2 tundi Beckman Coulter Optima L-90K ultratsentrifuugil kasutades SW-41 rootorit. Sööde ja saharoori lahus aspireeriti ettevaatlikult ja sade lahustati 300 µl PBS puhvis, mis omakorda kanti edasi saharoori gradiendile. Sahharoori gradient valmistati vahemikus 20-60%

(sahharoosi lahus PBS-is) otse tsentrifuugi tuubidesse. Gradiendi fraktsioonid alt ülesse: 3 ml 60%, 2 ml 50%, 2 ml 40%, 2 ml 30%, ~3 ml 20%. Gradient pandi 4 °C juurde üleöö seisma ühtlustumiseks. Ühtlustatud gradiendi peale kantud proovid ultratsentrifuugiti 30 000 rpm 4 °C 16 tundi. Seejärel tehti tsentrifuugi tuubi põhja väike auk kuuma nõelaga ja gradient jagati umbes 500 µl ekvivalentidena eppendorfi tuubidesse. Saadud proovid säilitati 4 °C juures. Proovipunktide sahharoosi kontsentratsioonid määrati refraktomeetrilisel meetodil kasutades refraktomeetrit ИРФ-454 (NSVL).

Fluorestsentsi anisotroopia

Fluorestsentsmõõtmised anisotroopia mõõtmiseks teostati BMG Labtech PHERAstar plaadilugejal. Proovid valmistati ette ja intensiivsus paralleelsel perpendikulaarsel polarisatsioonitasandil mõõdeti kasutades puhvrit: 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA, 11 mM Na-Hepes, pH 7,4, EDTA-vaba proteaasi inhibiitor kokteil [Rosche Applied Science] + 0,1% Pluronic F-127 (Invitrogen). Intensiivsused korrigeeriti tausta suhtes ja anisotroopia arvutati vastavalt valemile:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

kus I_{\parallel} on intensiivsus paralleelsel ja I_{\perp} perpendikulaarsel tasandil. Katsetes kasutati MC4 retseptori fluoristseeruvat ligandi Cy3B-NDP- α MSH. Elektroni viimiseks ergastatud olekusse ehk eksitatsiooniks on vaja kindla lainepikkusega kiirgust. Kindla lainepikkusega kiirgust saab kasutades filtreid. Fluorestsentsmõõtmistes kasutatakse kaks filtrit. Filtrit, mis laseb läbi kiirgust molekuli ergastamiseks nimetatakse eksitatsiooni filtriks. Filtrit, mis laseb läbi molekuli poolt tuleva kiirguse registreerimiseks nimetatakse emissiooni filtriks. Eksitatsiooni lainepikkus on alati väiksem kui emissiooni lainepikkus, sest osa energiast eraldub soojuseks või mehaanilise töö tegemiseks. Emissiooni filter ei lase eksitatsiooni lainepikkusega kiirgust läbi, seega detektor ei registreeri eksitatsiooni kiirgust. Filtrite plokkis filtrid asuvad üks teise risti ja nende vahel asub 45° nurga all poolläbipaistev peegel, mis laseb läbi eksitatsiooni kiirgust ja peegeldab emissiooni kiirgust, millega suunab kiirgust filtri juurde. Eksitatsioon ja emissioon mõõdeti lainepikkustel 540 nm ja 590 nm vastavalt. Iseloomustati kasutatud fluorofoori fluorestsentsi intensiivsuse ja anisotroopia sõltuvus PEG kontsentratsioonist.

Fluorestsents-spektroskoopia

Fluorestsentsi spektrid mõõdeti Perkin Elmer LS 55 luminescents spektrimeetril. Cav1-mRed valkude fluorestsents emissioon spekter mõõdeti vahemikul 545-645 nm ergastuskiirgusel 530 nm. MLV-gag-YFP fluorestsents emissioon spekter mõõdeti vahemikul 510-645 nm ergastuskiirgusel 495 nm. PM CFP fluorestsents emissioon spekter mõõdeti vahemikul 410-545 nm ergastuskiirgusel 395 nm. Mõõtmised teostati PBS puhvris.

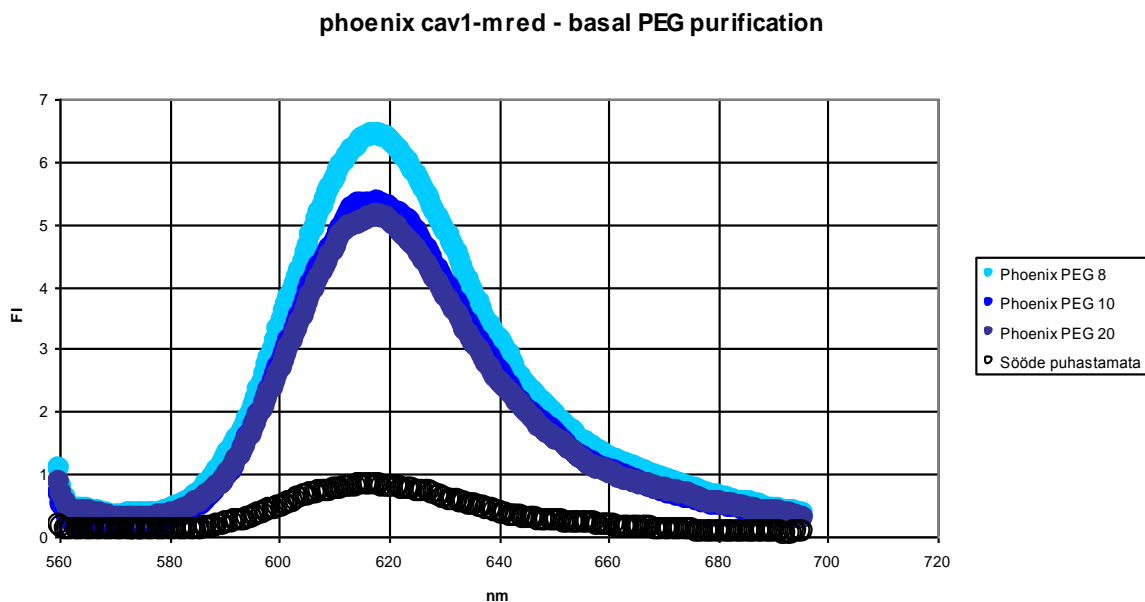
SDS-Western Blot

Proovid denatureeriti Laemelli puhvris 100 °C juures 5 min. Valgud lahutati 10% SDS PAGE geelis ja kanti nitrotselluloosmembraanile. Membraan blokeeriti TTBS puhvris (100 mM Tris, 0.9% NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7.4) üleöö 4 °C juures. Primaarseks antikehaks kasutati anti-MLV-gag IgG antikeha (Icosagen) 1:1000. Sekundaarseks antikehaks kasutati *anti-rabbit-alkaline-phosphatase* (küüliku antikehaga seotud leeliseline fosfataas) (TÜTI) 1:1000. Membraanid visualiseeriti lisades leeliselise fosfataasi substraadid NBT ja BCIP.

TULEMUSED

PEG kasutamine VLP sadestamiseks

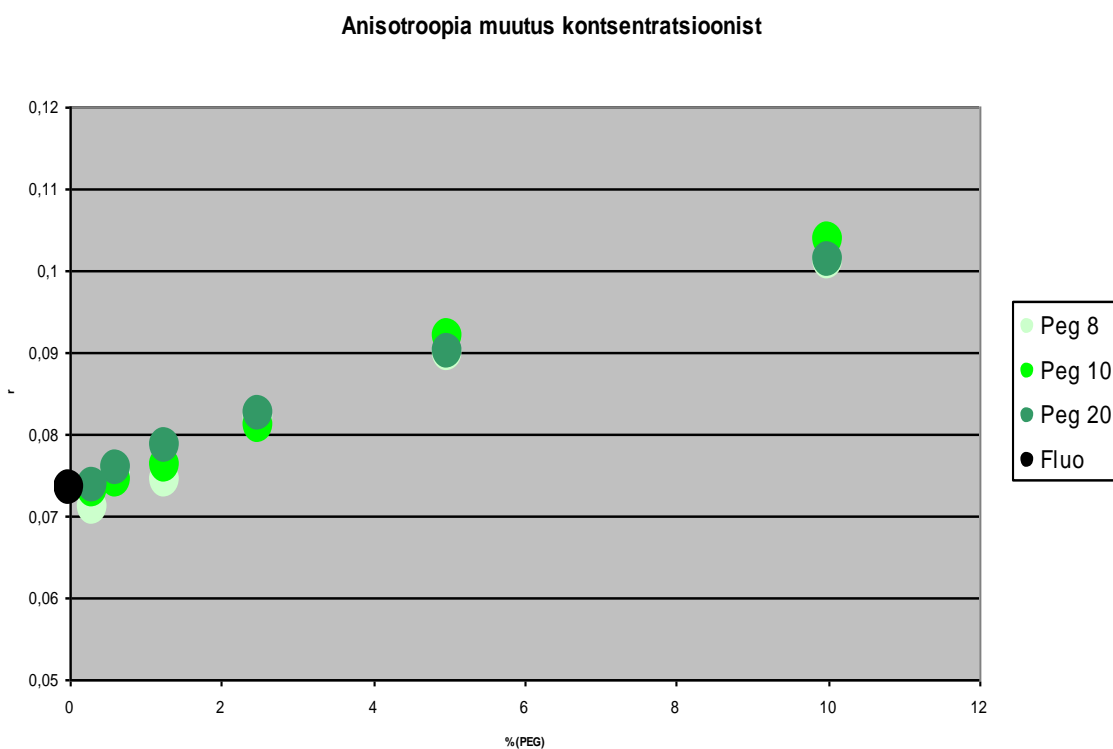
Polüetüleenglükooliga katsete eesmärgiks oli VLP-de efektiivne eraldamine. Selleks oli vajalik uurida, kuidas PEG-i molekulaarmass, kontsentratsioon ja omadused mõjutavad analüüsi. Lisaks on vaja uurida, kas ultrafuugimine lisapuhastusena suurendab signaali. Selleks, et edaspidistes katsetes kasutada PEG molekulmassiga, mis annab puhastamisel parema tulemuse, oli kõigepealt vaja määrata puhastamise efektiivsuse sõltuvus PEG molekulaarmassist. Esimeses katses oli kasutatud *Phoenix* rakud, mis toodavad VLP-sid. Rakkudele oli transfekeeritud Cav1-mRed plasmiid. VLP-d puhastati kasutades PEG puhastamise protokollit ja fluorestsentsi intensiivsus oli mõõdetud vahemikul 545-645 nm ergastuskiirgusel 530 nm (*Fluorestsentsi spektroskoopia*). Tulemused (Joonis 6) näitavad, et puhastamine PEG-ga suurendab signaali. Samaaegselt signaali intensiivsus ei sõltu oluliselt PEG molekulaarmassist (8 000, 10 000, 20 000 Daltonit).



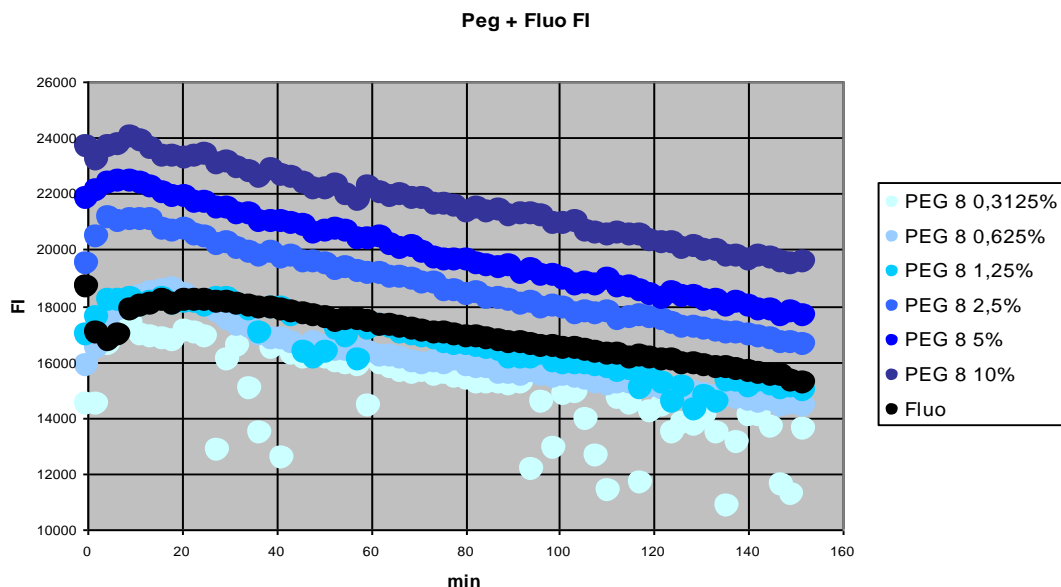
Joonis 6. Fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvus PEG molekulaarmassist (8 000, 10 000, 20 000 Daltonit).

PEG mõju fluorestseeruva ligandi anisotroopiale.

Nagu eelnevalt sai mainitud, annavad fluorestsentsi anisotroopia mõõtmised kasulikku informatsiooni valg-ligand sidumisest. Seega on mõistlik uurida PEG-i mõju anisotroopia mõõtmisel fluorestseeriva ligandi vastu. Selline katse on vajalik, et hinnata mõõtmiste tõesust. Katseks kasutati MC4 retseptori fluorestseeruvat ligandi Cy3B-NDP- α MSH. Erineva PEG molekulaarmassidega ja kontsentratsioonidega lahustele oli lisatud sama kogus fluorestseerivat ligandi (*Fluorestsents anisotroopia*). Tulemused näitavad, et PEG kontsentratsioon mõjutab tugevalt mitte ainult anisotroopiat (Joonis 7), vaid ka fluorestseeruva ligandi fluorestsentsi intensiivsust (Joonis 8). Samas näeme, et PEG molekulaarmass olulisi erinevusi ei näita.



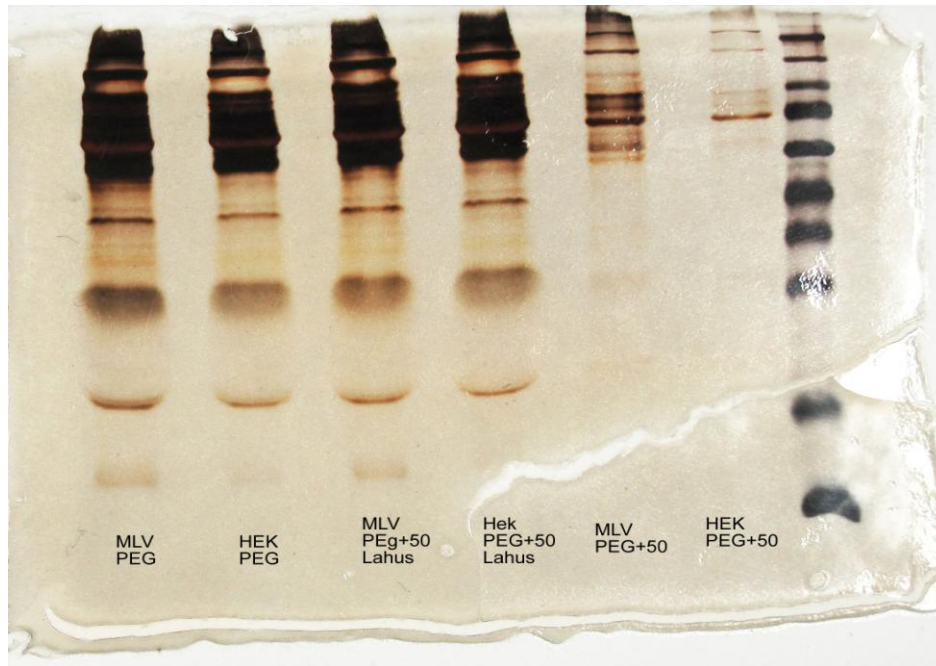
Joonis 7. Anisotroopia sõltuvus PEG kontsentratsioonist erinevatel PEG molekulaarmassidel (8 000, 10 000, 20 000 Daltonit, Fluo - kontroll).



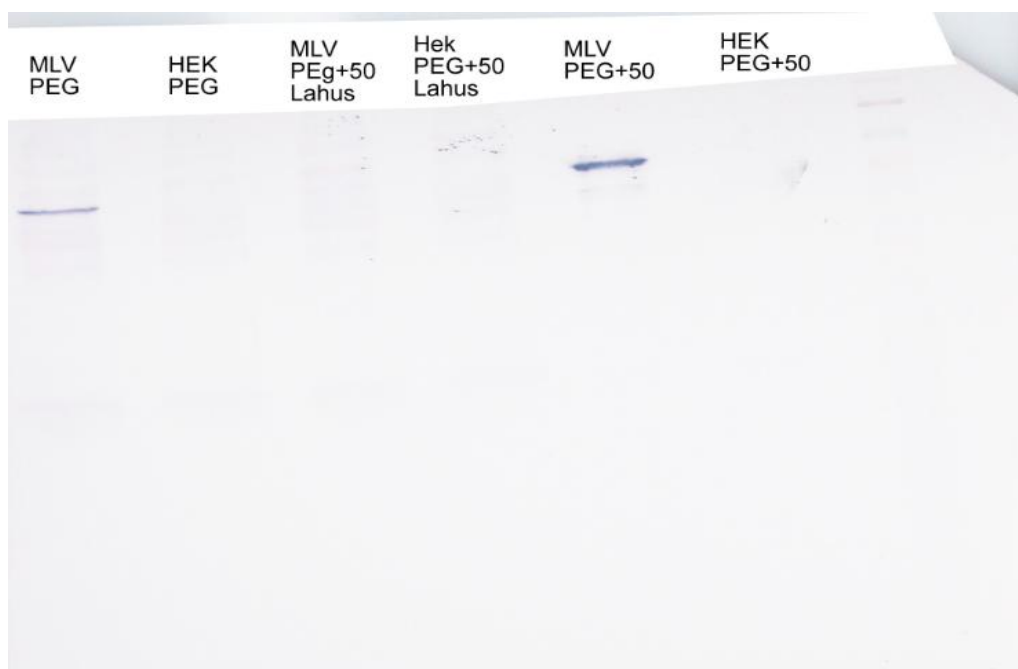
Joonis 8. Fluorestseeruva ligandi Cy3B-NDP- α MSH fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvus PEG 8 000 kontsentratsioonist ajas.

Ultratsentrifuugimine VLP-de sadestamisel PEG-ga

Oli vaja mõõta, kuidas ultratsentrifuugimine aitab lisapuhastusena ja kas signaal suureneb. Selles katses kasutati HEK rakke, millesse oli transfekteeritud plasmiid MMLV-*gag*-YFP. Katse teostati PEG puhastamise protokoll järgi. Lisapuhastuseks, saadud proovid lahustati 2 ml PBS puhvrts ja ultratsentrifuugiti 50 000 g 4 °C 1 tund. YFP valguse fluorestsentsi intensiivsus mõõdeti PEG sademes enne ultrafuugimist ning pärast ultrafuugimist nii sademes kui ka supernatantis (*Fluorestsents spektroskoopia*). Ultrafuugimine oli väga efektiivne ja näitas raku muude valkude kontsentratsiooni vähenemist (Joonis 9), kuid VLP-de kontsentratsioon jäi umbes samaks (Joonised 10 ja 11).

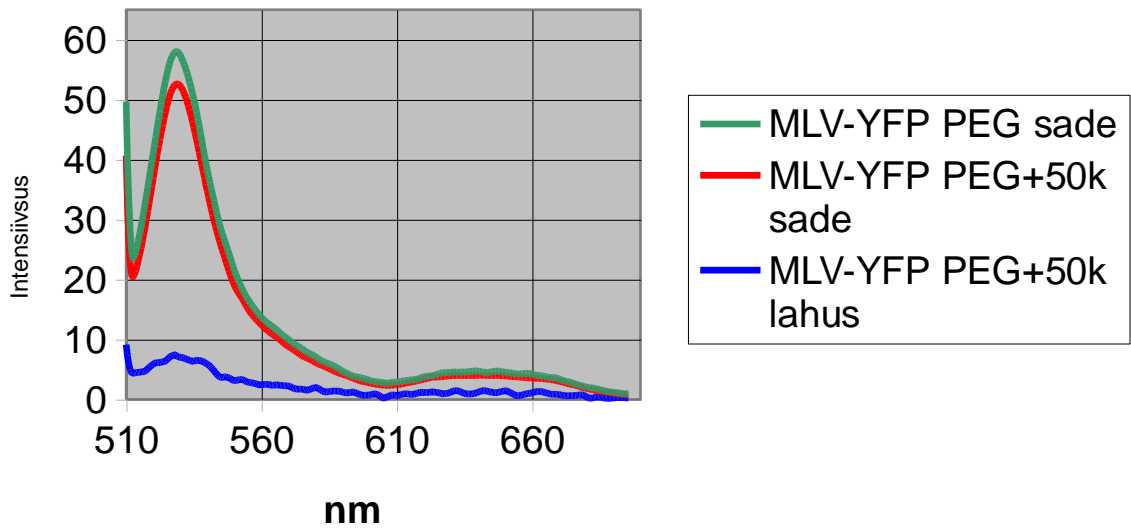


Joonis 9. *SDS-PAGE* (hõbedaga värvitud). Vasakult paremale MLV PEG – MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekeeritute HEK rakkude PEG sadestamise sade ilma ultratsentrifuugimiseta; HEK PEG - transfekeeritamata HEK rakkude PEG sadestamise sade ilma ultratsentrifuugimiseta; MLV PEG+50 lahus - MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekeeritute HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise supernatant; HEK PEG+50 lahus - transfekeeritamata HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise supernatant; MLV PEG+50 - MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekeeritute HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise sade; HEK PEG+50 - transfekeeritamata HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise sade.



Joonis 10. *SDS-PAGE/Western Blot.* Vasakult paremale MLV PEG – MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekeeritute HEK rakkude PEG sadestamise sade ilma ultratsentrifuugimiseta; HEK PEG - transfekeeritamata HEK rakkude PEG sadestamise sade ilma ultratsentrifuugimiseta; MLV PEG+50 lahus - MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekeeritute HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise supernatant; HEK PEG+50 lahus - transfekeeritamata HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise supernatant; MLV PEG+50 - MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekeeritute HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise sade; HEK PEG+50 - transfekeeritamata HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise sade.

Spetsiifiline sidumine (Fuugimine 50k)



Joonis 11. YFP fluorestsentsi intensiivsus erinevatel proovidel. Roheline - MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekteeeritute HEK rakkude PEG sadestamise sade ilma ultratsentrifuugimiseta; punane - MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekteeeritute HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise sade; sinine - MMLV-*gag*-YFP plasmiidiga transfekteeeritute HEK rakkude PEG sadestamise ja ultratsentrifuugimise supernatant.

VLP puhastamine sahharoosi gradiendis

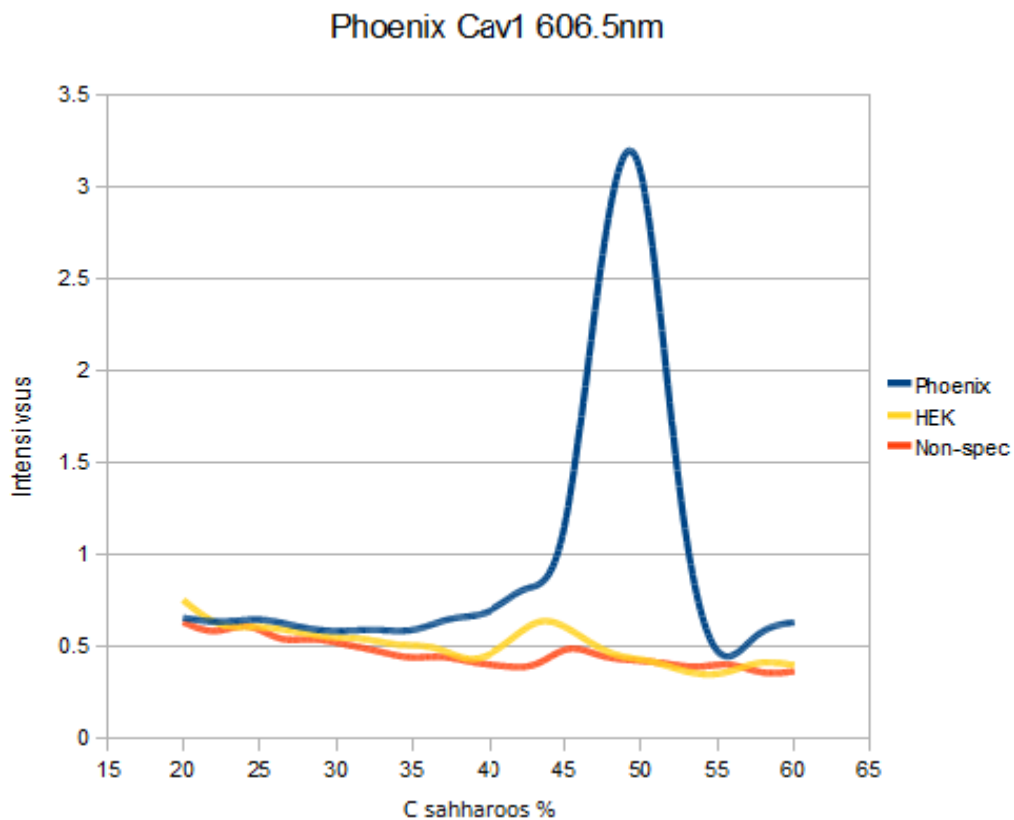
Sahharoosi gradiendi kasutamise eesmärk on saada puhastatud homogeenne membraanvalkude fraktsioon. Katses kasutati HEK 293 ja *Phoenix* rakuliine. Mõlematele rakuliinidele transfekteeeriti järgmised plasmiidid: Cav1-mRed, MMLV-*gag*-YFP ja PM CFP. Kõik plasmiidid transfekteeeriti kasutades eeltoodud meetodit (plasmidi transfekteeerimine ja VLPde korjamine). Saadud lahused puhastati kasutades sahharoosi gradienti (ultratsentrifugeerimine). Saadud proovid hoiti 4 °C juures. Proovid, mis olid saadud plasmiidide Cav1-mRed, MMLV-*gag*-YFP, PM CFP rakuliinidele transfekteeerimisest, analüüsiti kasutades fluorestsents-spektromeetria meetodit. Pärast seda kõik proovid, mis andsid positiivse tulemuse ehk need fraktsioonid, mille fluorestsentsi intensiivsus oli suurem, võrreldes transfekteeerimata rakuproovide intensiivsusega, analüüsiti *SDS-PAGE/Western Blot* meetodiga kinnitamiseks, et fluorestsentsisignaali on ikka uuritava valguga signaal. Katse põhimõte on järgmises: *Phoenix* rakud toodavad VLPsid kogu aeg, aga HEK rakud toodavad ainult MMLV-*gag*-YFP plasmidi transfekteeerimisel, sellega me peame saama signaali ainult

proovides, mis olid tehtud *Phoenix* rakkude transfekteerimisel Cav1-mRed ja PM CFP plasmiididega, ja proovidest, millel oli transfekteeritud MMLV-gag-YFP plasmiid mõlematel rakuliinidel. Mitte-spetsiifilise sidumise mõõtmiseks kasutati HEK rakuliini, mis ei olnud transfekteeritud plasmiidiga, aga kogu ülejäänud protsess oli sama nagu teiste rakkude jaoks. Kõik proovid olid fraktsioneeritud sahharoosi gradiendiga kontsentratsiooni vahemikul 20-60%, et saavutada täiendav puhastus, aga ka iseloomustada nende suurust.

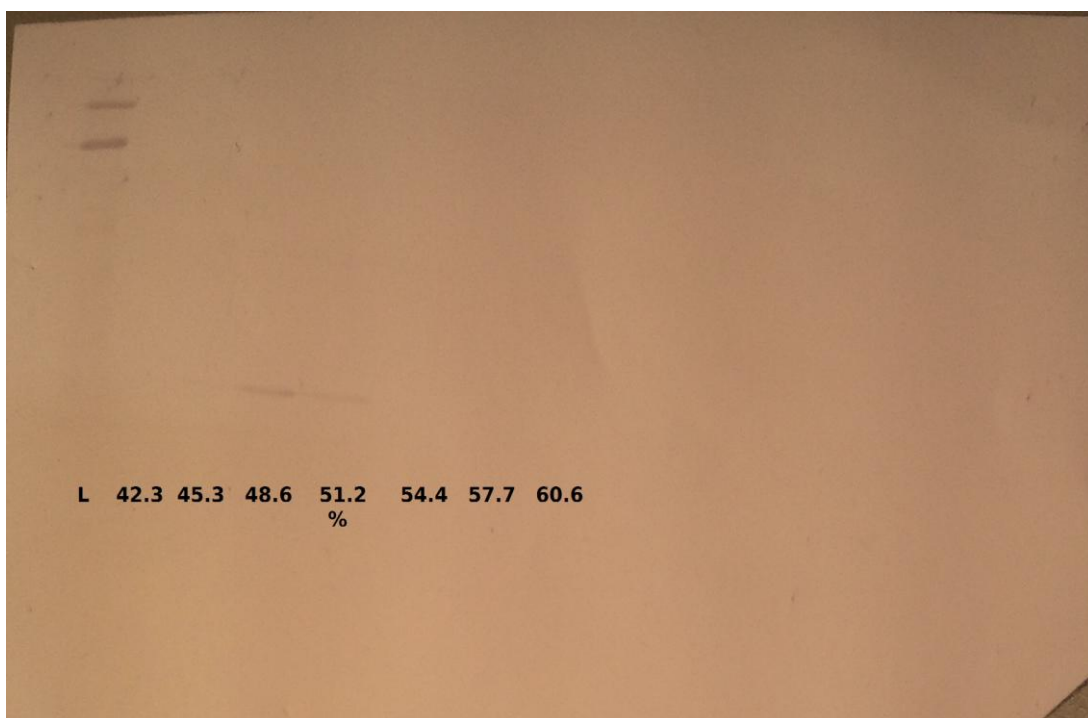
Cav1-mRed plasmiidiga ekspresseeritud tulemustes, mis olid saadud fluorestsentsintensiivsuse mõõtmisel lainepikkusel 606,5 nm, (Joonis 12) on näha, et signaal tuleb transfekteeritud *Phoenix* rakkudest ja HEK rakud ei anna signaali, sest nad ei tooda VLPsid. Tulemus on kinnitatud ka SDS-Western blot tulemustega (Joonis 13). *SDS-PAGE/Western Blot* tulemustest on näha, et VLP sisaldavad fraktsioonid on sahharoosi kontsentratsiooni vahemikus 48-51%.

Samasugust pilti näeme PM CFP plasmiidiga ekspresseeritud tulemustes (lainepikkusel 456,5 nm) (Joonis 14). Siin on näha ka sõltuvus sahharoosi kontsentratsioonist, kuid VLP-dele vastava fraktsiooni võime selgelt eristada. Tulemused on kinnitatud *SDS-PAGE/Western Blot* tulemustega (Joonis 15). Sahharoosi kontsentratsiooni vahemik, kus jäävad VLP-d, on 47-52%. MMLV-gag-YFP plasmidi tulemustes (lainepikkusel 529,5 nm) on pilt sarnane (Joonis 16), aga on vaja meeles pidada, et selle plasmiidiga HEK rakud toodavad ka VLP-sid. Tulemustes on näha, et *Phoenix* rakud, kus MMLV-gag geen on transfekteerimata sees, annavad oluliselt suurema signaali, kui HEK rakud, kuhu MMLV-gag geen oli transfekteeritud. Tulemused kinnitati *SDS-PAGE/Western Blot* tulemustega (Joonis 17). Sahharoosi kontsentratsiooni vahemik, kus jäävad VLP-d on 42-52%.

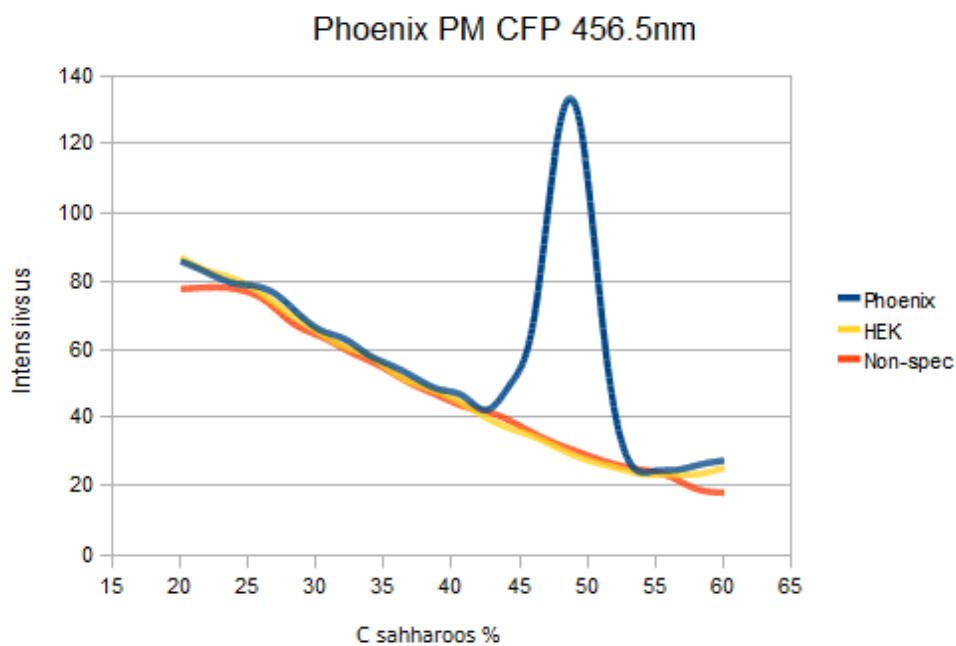
Saadud tulemused näitavad, et VLP-de puhastamine sahharoosi gradiendiga töötab ja on sobilik fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmiseks. Samas tuleb märkida, et kõikide plasmiidide VLP-d jäävad samasse sahharoosi kontsentratsiooni vahemikku, seega erinevate valkudega VLP-d on eeldatavasti sama suurusega.



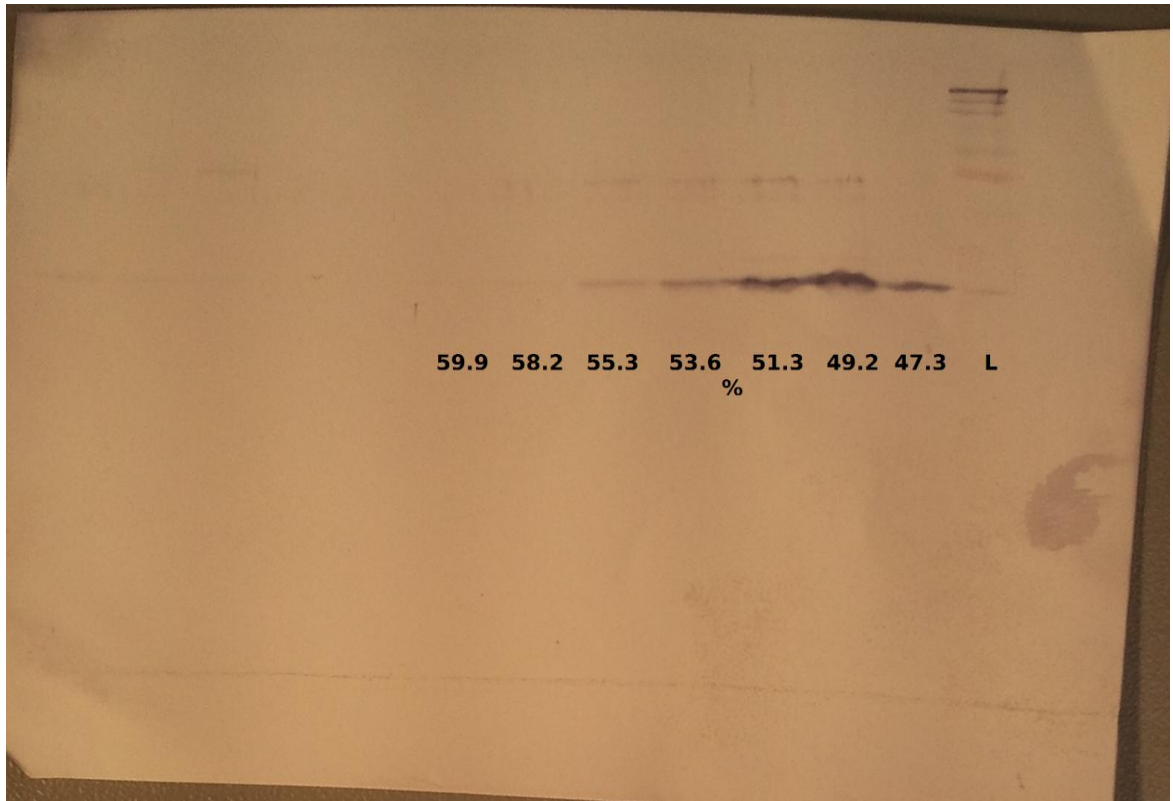
Joonis 12. Cav1-mRed intensiivsuse sõltuvus sahharoosi kontsentratsioonist lainepikkusel 606.5 nm. *Phoenix* - Cav1-mRed plasmiidiga transfecteeritud *Phoenix* rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid; HEK - Cav1-mRed plasmiidiga transfecteeritud HEK rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid; Non-Spec - transfecteeritamata HEK rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid.



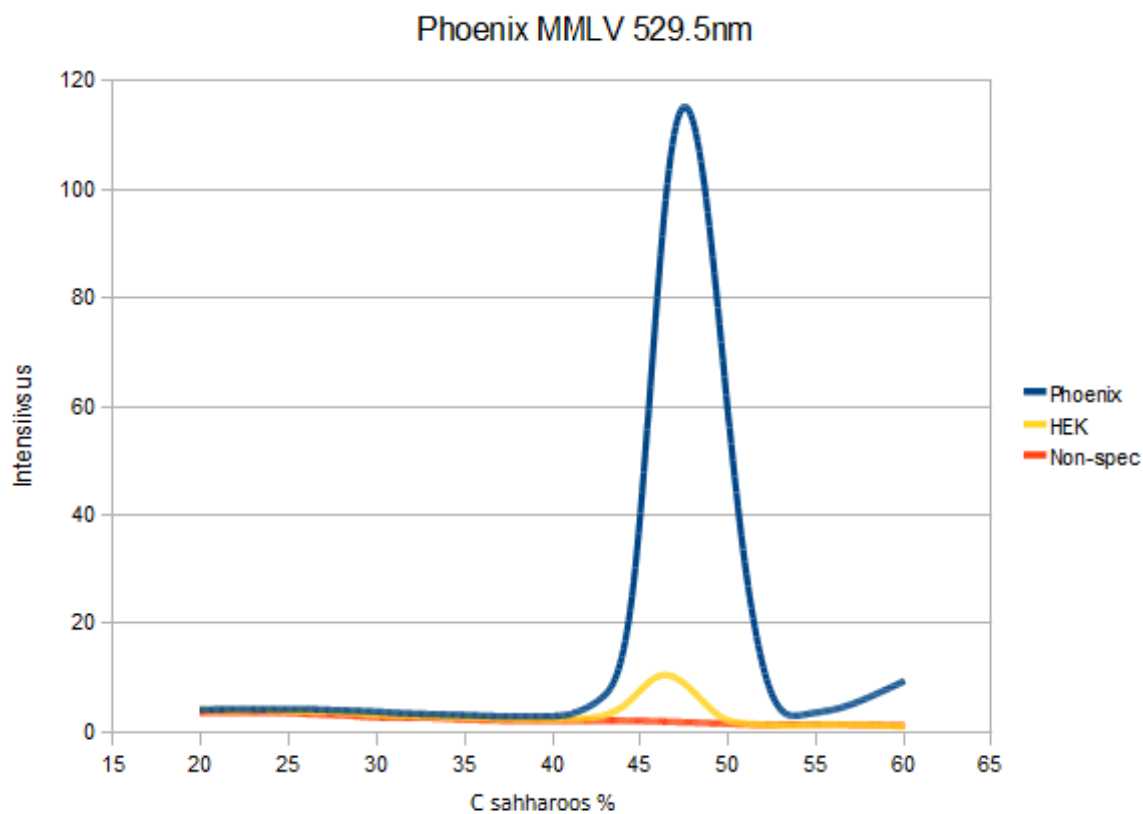
Joonis 13. *SDS-PAGE/Western Blot*. Cav1-mRed plasmiidiga transfekteeritud *Phoenix* rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid. *Western Blot* kasutatud primaarne antikeha - anti-MLV-gag IgG, sekundaarne antikeha - *anti-rabbit-alkaline-phosphatase*, visualiseerimiseks - fosfataasi substraadid NBT ja BCIP. Sahharoosi kontsentratsioonid olid mõõdetud refraktomeetriliselt. Numbrid vastavad sahharoosi kontsentratsioonile protsentides.



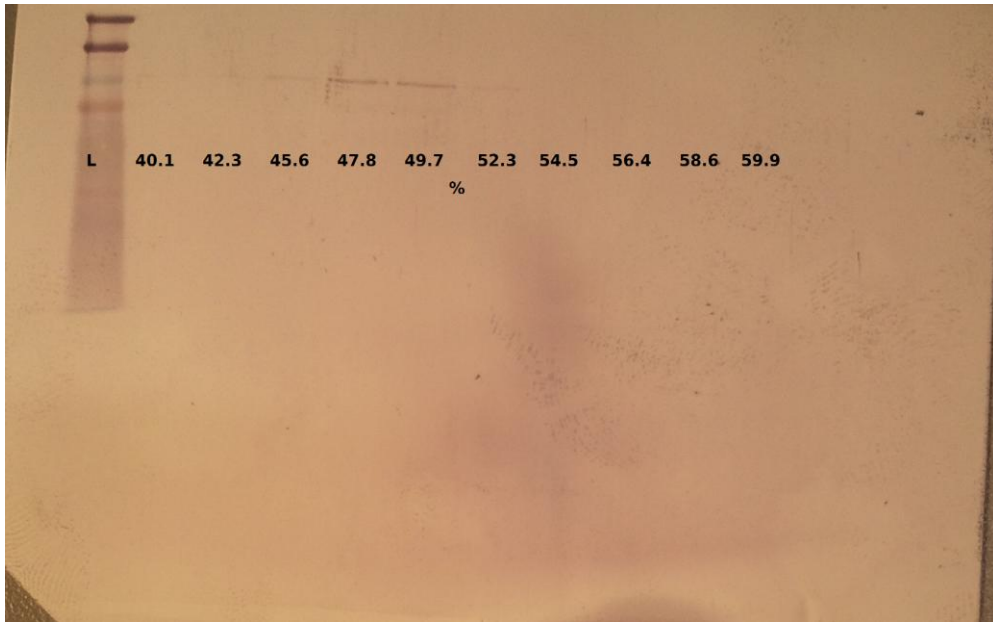
Joonis 14. PM CFP intensiivsuse sõltuvus saharoosi kontsentratsioonist lainepikkusel 456,5 nm. *Phoenix* - PM CFP plasmiidiga transfekteeritud *Phoenix* rakkude saharoosi gradiendi fraktsioonid; HEK - PM CFP plasmiidiga transfekteeritud HEK rakkude saharoosi gradiendi fraktsioonid; Non-Spec - transfekteerimata HEK rakkude saharoosi gradiendi fraktsioonid.



Joonis 15. SDS-PAGE/Western Blot. PM CFP plasmiidiga transfekteeritute *Phoenix* rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid. Western Blotis kasutatud primaarne antikeha - anti-MLV-gag IgG, sekundaarne antikeha - *anti-rabbit-alkaline-phosphatase*, visualiseerimiseks - fosfataasi substraadid NBT ja BCIP. Sahharoosi kontsentratsioonid olid mõõdetud refraktomeetriselt. Numbrid vastavad sahharoosi kontsentratsioonile protsentides.



Joonis 16. MMLV-gag-YFP intensiivsuse sõltuvus sahharoosi kontsentratsioonist lainepikkusel 529,5 nm. *Phoenix* - MMLV-gag-YFP plasmiidiga transfekteeritute *Phoenix* rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid; HEK - MMLV-gag-YFP plasmiidiga transfekteeritute HEK rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid; Non-Spec - transfekteeritamata HEK rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid..



Joonis 17. *SDS-PAGE/Western Blot.* PM CFP plasmiidiga transfekteeritute *Phoenix* rakkude sahharoosi gradiendi fraktsioonid. *Western Blotis* kasutatud primaarne antikeha - anti-MLV-*gag* IgG, sekundaarne antikeha - *anti-rabbit-alkaline-phosphatase*, visualiseerimiseks - fosfataasi substraadid NBT ja BCIP. Sahharoosi kontsentratsioonid olid mõõdetud refraktomeetriliselt. Numbrid vastavad sahharoosi kontsentratsioonile protsentides.

KOKKUVÕTE

Membraanse valgu konformatsioon on väga oluline ligandiga seondumisel, selle tõttu on vaja uurida valke samas konformatsioonis nagu see on reaalses rakus. Rakust väljudes võtavad VLP-d endaga osa rakumembraani kaasa, mis garanteerib uuritava valgu konformatsiooni samasuse.

Töö eesmärgiks on võrrelda viiruslaadsete osakeste puhastamismeetodeid. VLP-d on proovitud puhastada polüetüleenglükooliga. Tulemuste põhjal võime järeldada, et meetod töötab, eriti hästi siis, kui lisapuhastamiseks on kasutatud ultrafuugimist. PEG segab oluliselt fluorestsentsanisotroopia mõõtmist, mis teeb PEG-i sadestamise mittesobilikuks meetodiks anisotroopia mõõtmiseks.

Sahharoosi gradiendiga puhastamismeetod oli efektiivne ja sobilik fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmiseks. VLP-de sisaldus fraktsioonides oli kinnitatud kahe detekteerimismeetodite tulemustega (Fluorestsents spektroskoopia ja *SDS-PAGE/Western Blot*). Kõik VLP-d jäid samasse sahharoosi kontsentratsioonivahemikku, mis annab meile võimaluse eeldada, et erinevate valkudega VLP-d on sama suurusega.

Kirjanduses on kirjeldatud erinevaid kromatograafia liike, mis annavad positiivse tulemuse, eriti siis, kui neid on kasutatud järjestikku.

Käesolevas töös VLP-de puhastamiseks kasutatud meetodid töötavad. Enne puhastamismeetodi valimist tuleb oma katsed läbi mõelda, ja seejärel otsustada, milliseid analüüsimeetodeid kasutada, kuna mõned puhastamismeetodid võivad segada edaspidist analüüsi ning viia valedele järeldusele.

SUMMARY

The conformation of membrane proteins is essential for ligand binding. That is why proteins have to be studied in same conformation as in a real cell. When VLP is leaving the cell, it takes a part of cell membrane with it. This guarantees studied protein conformation to be the similar than as in a real cell.

The aim of this paper is to compare methods of VLP purification. An assay was made using polyethylene glycol. With the results we may conclude, that this method works and ultracentrifugation for additional purification increases the signal. PEG makes some troubles during fluorescence anisotropy measurements. This makes this purification method unsuitable for anisotropy measurements.

Purification method with sucrose gradient showed itself very effective and suitable for fluorescence intensity measurements. Concentration of VLP in fractions was confirmed by two methods (Fluorescence spectroscopy and SDS-PAGE/Western Blot). All VLPs were detected in same concentration of sucrose indicating, that all VLPs are of the similar size. Obtained results indicate also that centrifugation in sucrose gradient is a suitable method for purification of VLP from cells and medium.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewes, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Molecular biology of the cell. 5th edition. Garland Science, New York, 2008.
2. Stanford University, Nolan Lab
http://www.stanford.edu/group/nolan/tutorials/ret_6_gpedesc.html
Viimati vaadatud 28.05.13
3. L. Collier, J. Oxford, Human virology. Oxford University Press, Oxford, 1994.
4. N. Hoshikawa, A. Kojima, A. Yasuda, E. Takayashiki, S. Masuko, J. Chiba, T. Sata, and T. Kurata, Role of the gag and pol genes of human immunodeficiency virus in the morphogenesis and maturation of retrovirus-like particles expressed by recombinant vaccinia virus: an ultrastructural study. *Gen Virol* 1991 72: 2509-2517.
5. A.J. Smith, N Srinivasakumar, M.L. Hammarskjöld, D. Rekosh, Requirements for incorporation of Pr160gag-pol from human immunodeficiency virus type 1 into virus-like particles. *J. Virol.* April 1993 67: 2266-2275;
6. S.T. Andreadis, D. Brott, A.O. Fuller, B.O. Palsson. Moloney Murine Leukemia Virus-Derived Retroviral Vectors Decay Intracellularly with a Half-Life in the Range of 5.5 to 7.5 hours, *J Virol.* 1997 Oct;71(10):7541-8.
7. L. Huhti, V. Blazevic, K. Nurminen, T. Koho, V. P. Hytinen, T. Vesikari, A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles, *Arch Virol.* 2010 155:1855-1858
8. Danso Ako-Adjei, Marc C. Johnson, and Volker M. Vogt, The Retroviral Capsid Domain Dictates Virion Size, Morphology, and Coassembly of Gag into Virus-Like Particles, *Journal of Virology*, Nov. 2005, p. 13463-13472.
9. Gary D. Christian, Analytical Chemistry 6th Edition. Hoboken (N.J.), Wiley 2004
10. Donald Voet, Judith G. Voet, Biochemistry 3rd Edition. Hoboken (N.J.), Wiley 2004
11. S. Zolotukhin, B.J. Byrne, E. Mason, I. Zolotukhin, M. Potter, K. Chesnut, C. Summerford, R.J. Samulski, N. Muzyczka, Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Stockton Press, Gene Therapy* (1999) 6, 973-975
12. Baek JO, Seo JW, Kim IH, Kim CH, Production and purification of human papillomavirus type 33 L1 virus-like particles from *Spodoptera frugiperda* 9 cells using two-step column chromatography. *Epub Aug. 2010, 75(2):211-7*
13. Donald H. and Kenneth C. Ingham, Mechanism of Precipitation of Proteins by

- Polyethylene Glycol. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 256, No. 23, Issue of December 10, pp. 12108-12117, 1981
14. F.M. Veronese, J.M. Harris, Introduction and overview of peptide and protein pegylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002) 453–456
 15. D. Sanyal, G. Kudesia, G. Corbitt, Comparison of ultracentrifugation and polyethylene glycol precipitation for concentration of hepatitis B virus (HBV) DNA for molecular hybridisation tests and the relationship of HBV-DNA to Hbe antigen and anti-HBe status. *J. Med. Microbiol.* - Vol. 35 (1991), 291-293
 16. A. Polson, A. Keen, C. Sinclair-Smith, Polyethylene glycol purification of influenza virus with respect to aggregation and antigenicity. *J. Hyg., Camb.* (1972), 70, 255
 17. F.M. Veronese, Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Department of Pharmaceutical Sciences, Biomaterials* 22 (2001) 405-417
 18. T. Kohno, S. Mohan, T. Goto, C. Morita, T. Nakano, W. Hong, J.C.E. Sangco, S. Morimatsu, K. Sano, A new improved method for the concentration of HIV-1 infective particles, *Journal of Virological Methods* 106 (2002) 167/173.
 19. Douglas A. Skoog, James J. Leary, *Principles Of Instrumental Analysis* 4th Edition, Philadelphia, Saunders College Publishing: Harcourt Brace College Publishers 1998
 20. Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 3rd ed., New York, Springer 2006

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Maksim Runin
(27.12.1987)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

”Viiruslaadsete osakeste puhastamine ja detekteerimine”,

- mille juhendajad on M.Sc. Oliver Pulges ja Prof. Ago Rinke,
- reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
- olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
- kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2013**