

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**Proteīndisulfidizomerāzes A17 izoformas strukturālie un  
funkcionālie pētījumi**

Bakalaura darbs

Autors: Sofija Matisone

Stud. apl. nr. sm17051

Darba vadītājs:

LOSI zinātniskā asistente, M. Sc. Diāna Zeļencova

RĪGA 2020

## KOPSAVILKUMS

Bakalaura darba mērķis ir izpētīt PDI A17 (AGR2) izoformas strukturālās un funkcionālās īpašības, pro-onkogēno proteīndisulfīdu izomerāžu (PDI) selektīvo inhibitoru meklēšanas projekta ietvaros. Šīm nolūkam izstrādāt protokolu PDI A17 iegūšanai aktīvā formā, un piemērot proteīnu kodolu magnētiskās rezonanses (KMR) spektroskopijas pētīšanas metodei. Izpētīt saistību starp neaktivēto un aktivēto aziridīn-2-karbonskābes atvasinājumiem un PDI A17 izoformu.

Šajā darbā aprakstīta optimizētas PDI A17 izoformas iegūšana, pamatoti izvēlētie apstākļi un metodes proteīna-ligandu saistības testēšanai ar 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC eksperimenta palīdzību. Darbā arī ir aprakstīti pirmie rezultāti par aziridīn-2-karbonskābes N-sulfonil atvasinājumu saistības vietu PDI A17 aktīvajā centrā.

Darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā laika posmā no 2018. gada novembra līdz 2020. gada maijam.

Atslēgvārdi: PDI A17, AGR2, KMR, 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC, Leakadīns, aziridīna cikls, proteīna-liganda mijiedarbība.

## SUMMARY

The aim of bachelor's theses is to study the structural and functional properties of PDI A17 (AGR2) isoform within the framework of a project of searching the selective inhibitors of pro-oncogenic protein disulfide isomerases (PDI). To fulfil the project, develop a protocol to obtain PDI A17 in its active form and adjust protein for studies by means of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Investigate the bind between non-activated and activated azidine-2-carboxylic acid derivatives and PDI A17 isoform.

This thesis describes the optimization of production of PDI A17 isoform, explains the choice of conditions and methods for protein-ligand binding studies by 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC experiments. This work also illustrates the first results of binding of azidine-2-carboxylic acid N-sulfonyl derivatives to PDI A17 active site.

The research was carried out in Latvian Institute of Organic Synthesis in the period from November 2018 to May 2020.

Keywords: PDI A17, AGR2, NMR, 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC, Leakadine, aziridine cycle, protein-ligand binding.

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

1D – viendimensiju

2D – divu dimensiju

3D – trīs dimensiju

AGR2 – Anterior Gradient protein homolog 2

PDI – proteīnu disulfid izomerāze (angl. *Protein Disulfide Isomerase*)

ppm – miljonās daļas (angl. *part-per-million*)

KMR – kodolu magnētiskā rezonanse

TRX – tioredoksīns

HGNC – Cilvēka gēnu nomenklatūras komiteja (angl. *Human Gene Nomenclature Committee*)

NCBI – Nacionālais centrs priekš bioteholoģijas informācijas (angl. *National Centre for Biotechnology Information*)

His-tag – poli-histidīnu birka

HSQC – Heteronukleārā viena kvanta koherence (angl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

TEV – *Tobacco Etch* vīrusa proteāze

OD – optiskais blīvums (angl. *optical density*)

rpm – apgriezieni minūtē (angl. *revolutions per minute*)

C – cisteīns

K – lizīns

Q – glutamīns

S – serīns

Y – tirozīns

P – fenilalanīns

E – glutamīnskābe

H – histidīns

D – aspartātskābe

L – leicīns

A – alanīns

T – treonīns

SPRINP – viena praimera paralēlā polimerāzes ķēdes reakcija (angl. *Single Primer in Parallel*)

ER – endoplazmātiskais tīkls

ERSE – endoplazmātiskā tīkla stresa atbildes elementi (ERSE, angl. *Endoplasmic Reticulum Stress Response Elements*)

BLASTP – vispārējais lokālās līdzināšanas meklēšanas rīks proteīniem (angl. *Basic Local Alignment Search Tool for proteins*)

BLASTN – vispārējais lokālās līdzināšanas meklēšanas rīks nukleotīdiem (angl. *Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides*)

MALLS – multileņķa lāzera gaismas skenēšana (angl. *MultiAngle Laser Light Scattering*)

PDB – proteīnu databāze

ELISA – imūnufermentatīvā analīze (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

DTT – Ditiotrietols

TCEP – Trīs(2-karboksietil)fosfīns

MES – 4-morfolīnetānsulfonskābe

Tris – Trīs(hidroksimetil)aminometāns

IPTG – Izopropil-β-D-tiogalaktozīds

SDS – nātrija dodecil sulfāts

DMSO – dimetil sulfoksīds

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

# SATURS

Ievads .....	8
1. Literatūras apskats .....	9
1.1.    Proteīnu disulfīda izomerāzes .....	9
1.2.    AGR2 proteīns .....	12
1.3.    Aziridīna cikla reakcijas ar nukleofiliem .....	15
1.4.    Proteīna 2D <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC KMR .....	17
1.5.    Proteīna molekulmasas noteikšana no rotācijas korelācijas lika, $\tau_c$ . <sup>15</sup> N T <sub>1</sub> un T <sub>2</sub> relaksācijas laika noteikšana.....	18
2. Metodika .....	20
2.1.    Materiāli.....	20
2.1.1. Reaģenti .....	20
2.1.2. Buferi un barotnes .....	21
2.1.3. Izmantota aparatūra .....	22
2.1.4. Trauki un materiāli .....	23
2.1.5. Baktērijas celmi, plazmīdas un praimerī.....	23
2.2.    Eksperimentālās metodes .....	24
2.2.1. AGR <sub>41-175</sub> E60A plazmīdas iegūšana.....	24
2.2.2. <sup>15</sup> N iezīmēta AGR2 proteīna ekspresija.....	24
2.2.3. AGR2 proteīna attīrīšana .....	25
2.2.4. His-tag šķelšana ar TEV proteāzi .....	26
2.2.5. Paraugu sagatavošana un parametri spektra uzņemšanai.....	26
2.2.6. KMR parauga dialīze. ....	28
2.2.7. Datu analīzes metodes .....	28
3. Rezultāti un Diskusija.....	29
3.1.    AGR <sub>21-175</sub> , AGR <sub>41-175</sub> un AGR <sub>241-175</sub> E60A proteīna producēšana. ....	29
3.2.    AGR <sub>241-175</sub> E60A proteīna šķelšana ar TEV-proteāzi. Optimālo apstākļu meklējumi.....	32
3.3.    Bufera sastāva izvēle un reducējošo aģentu ietekme. ....	32
3.4.    AGR <sub>21-175</sub> un AGR <sub>41-175</sub> proteīnu KMR pētījumi .....	34
3.5.    AGR <sub>241-175</sub> E60A proteīna KMR pētījumi .....	35
3.5.1. AGR <sub>241-175</sub> _E60A Relaksācijas laika analīze .....	35
3.5.2. <sup>15</sup> N iezīmētā AGR <sub>241-175</sub> E60A salīdzinājums ar literatūras datiem.....	38
3.5.3. <sup>15</sup> N iezīmētā AGR <sub>241-175</sub> E60A proteīna ar un bez His-tag salīdzinājums.	
3.6.    AGR <sub>241-175</sub> E60A mijiedarbība ar ligandiem.....	41
4. Secinājumi .....	47

5. Pateicība.....	48
6. Literatūras saraksts .....	49
Pielikumi .....	52

# IEVADS

Mūsdienās vēža slimības ir viens no galvenajiem nāves cēloņiem visā pasaulē. Vēža ārstēšana nemitīgi attīstās, tiek meklēti jauni vēža saslimšanas cēloņi un jauni zāļu vielu mērķi.

Priekšējā gradienta proteīna 2 homologs (AGR2, angl. *Anterior Gradient Protein 2 homolog*) ir proteīnu disulfīdu izomerāzes (PDI, angl. *Protein Disulfide Isomerase*) A17 izoforma (PDI A17). Šis proteīns producējas pārkumā vairākos vēža audzēju šūnu tipos. AGR2 pozitīvi ietekmē vēža šūnu migrāciju un dzīvotspēju. Rezultātā, tas ir izvirzīts kā jaunais mērķa proteīns pretvēža preparātu dizainam. Bez tam, selektīvie PDI inhibitori varētu kalpot kā antitrombotiskie līdzekļi. Kombinētā pretvēža un antitrombotiska jauno potenciālo PDI inhibitoru aktivitāte varētu uzlabot vēža slimnieku izdzīvošanu vēnu tromboembolijas gadījumā.

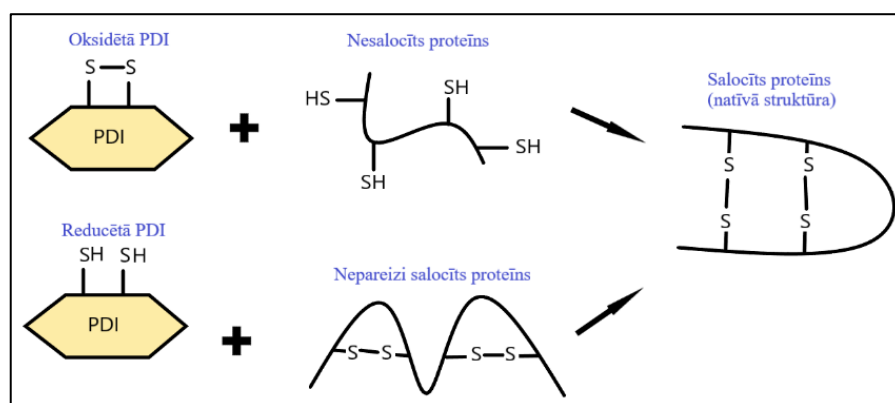
Bakalaura darba mērķis ir izpētīt AGR2 proteīna struktūras īpatnības un izstrādāt protokolu AGR2-ligandu mijiedarbības izpētei ar kodolu magnētiskās rezonanses (KMR) spektroskopiju, kā arī pārbaudīt AGR2 mijiedarbību ar neaktivētiem un aktivētiem aziridīn-2-karbonskābes fragmentiem. Darba mērķu sasniegšanai izvirzīti sekojošie darba uzdevumi:

- ✓ AGR2<sub>wt21-175</sub>, AGR2<sub>41-175</sub> un AGR2<sub>41-175</sub> E60A ekspresijas un attīrīšanas protokola izstrāde, izmantojot *E. Coli* ekspresijas sistēmu.
- ✓ Pēc atstrādāta protokola noekspresēt un attīrīt <sup>15</sup>N-iezīmētus AGR2<sub>wt21-175</sub>, AGR2<sub>41-175</sub> un AGR2<sub>41-175</sub> E60A KMR pētījumiem.
- ✓ Salīdzināt iegūtos KMR datus ar literatūras datiem, adoptēt un pārsignēt proteīnu pamatķēdi apo-formai un proteīna-liganda kompleksam.
- ✓ Uzņemt KMR spektrus proteīna-liganda kompleksiem ar neaktivētiem un aktivētiem aziridīn-2-karbonskābes atvasinājumiem. Definēt potenciālo PDI A17 inhibitoru saistības vietu.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Proteīnu disulfīda izomerāzes

Proteīnu nepareizā salocīšanās izraisa vairākas slimības, piemēram, Alcheimera slimību, emfizēmu, cistisko fibrozi [1]. Proteīnu disulfīda izomerāzes (PDI) ir proteīni, kas palīdz proteīniem pareizi salocīties, oksidējot un reducējot disulfīda saites proteīnos, tādā veidā pārkārtojot tās līdz proteīns ieņem pareizo formu (1. attēls) [2]. Šīs funkcijas nosaka PDI šaperonu aktivitāti [3].



1. attēls. PDI funkcijas shematiskais attēlojums (Adoptēts no [4]).

Figure 1. Schematic representation of PDI function. (Adopted from [4]).

Iz zināmas 21 cilvēka PDI izoformas (1. tabula) [5]. Vairāki PDI līdz ar savu šaperonu funkciju rezidē endoplazmātiskajā tīklā. 2. attēlā [5] shematiski atspoguļoti PDI izoformu veidojošie domēni. Katrai izoformai N-galā ir aminoskābju sekvence (angl. *signalling peptide*), kas atbild par proteīnu lokalizāciju endoplazmātiskajā tīklā, un tiek nošķelta pēctranslācijas modifikācijas gaitā. Lielākai daļai PDI izoformu ir vismaz viens aktīvs (t.i. spēj pildīt oksidēšanas/reducēšanas funkcijas) tioredoksīnam (TRX) raksturīgs katalītiskais centrs (-C-X-X-C-). AGR2, AGR3, TXNDC12, ERP29, TMX1, TMX2, TMX3, TMX4 proteīni satur vienu aktīvo TRX katalītisko centru; ERP27 satur divus neaktīvus TRX katalītiskos centrus. CASQ1, CASQ2, ERP44, PDIA6, TXNDC5 proteīni satur trīs TRX katalītiskos centrus. CASQ1, CASQ2 visi centri ir neaktīvi, ERP44 ir viens aktīvs centrs, PDIA6 ir divi aktīvi centri, savukārt TXNDC5 visi trīs centri ir aktīvi. P4HB, PDIA2, PDIA3, PDIA5, PDILT ir četri aktīvi centri. P4HB, PDIA2, PDIA3, PDILT divi no centriem ir aktīvi, PDIA5 – trīs. DNAJC10, PDIA4 satur piecus katalītiskos centus, no tiem DNAJC10 ir četri aktīvi un PDIA4 ir trīs aktīvi. PDI saimē dažiem proteīniem TRX raksturīgie katalītiskie centri variē. AGR2, AGR3 un ERP44 ir (-C-X-X-S-) centrs. TMX2 ir (-S-X-X-C-) centrs. PDILT abi aktīvi katalītiskie centri ir netipiski – (-

S-K-Q-S-) un (-S-K-K-C-). C-gala endoplazmātiskā tīkla aiztures motīvi (angl. *Endoplasmic reticulum retention segments*) (K-D-E-L, K-T-E-L, Q-S-E-L u.c.) PDI proteīniem variē, un nav sastopami tikai četrām no PDI (CASQ1, CASQ2, TMX1, TMX4). Dažas PDI satur negatīvi lādēto aminoskābju reģionu Ca<sup>2+</sup> jonu saistībai.

1. tabula

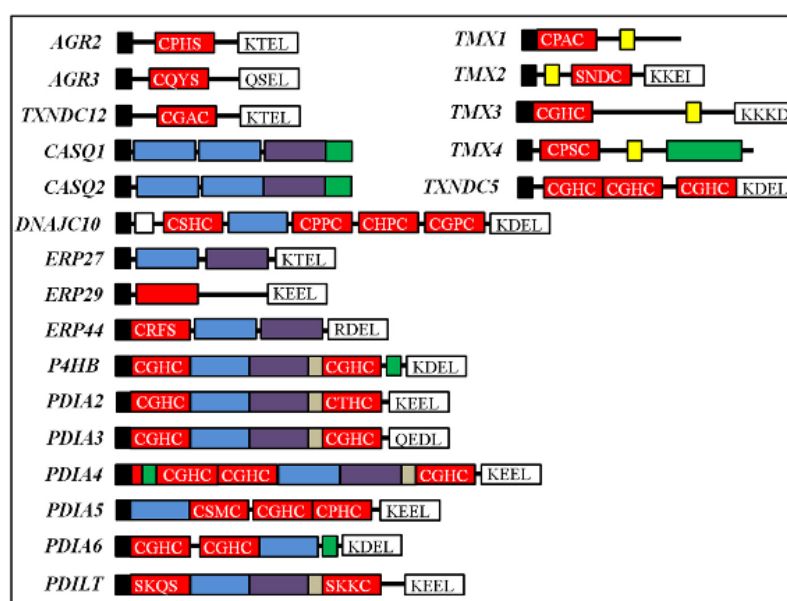
Cilvēka PDI gēni no Cilvēka gēnu nomenklatūras komitejas (HGNC, angl. *Human Gene Nomenclature Committee*) datubāzes. (Adoptēts no [5])

Table 1.

Human genes of PDI proteins from Human Gene Nomenclature Committee (HGNC) database. (Adopted from [5])

Gēna nosaukums	Citi nosaukumi	Proteīna nosaukums, angl.	Lokuss hromosomā	Aminoskābju skaits
AGR2	XAG-2, HAG-2, AG2, PDI A17	<i>Anterior gradient protein 2 homolog</i>	7p21.3	175
AGR3	HAG3, hAG-3, BCMP11, PDI A18	<i>Anterior gradient protein 3 homolog</i>	7p21.1	166
CASQ1	PDI B1	<i>Calsequestrin-1</i>	1q21	396
CASQ2	PDI B2	<i>Calsequestrin-1</i>	1p13.3-p11	399
DNAJC10	MTHr, ERdj5	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10</i>	2q32.1	793
ERP27	FLJ32115, ERp27, PDI A8	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 27</i>	12p12.3	273
ERP29	ERp28, ERp31, ERp29, PDI-DB, PDI A9	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 29</i>	12q24.13	261
ERP44	KIAA0573, PDIA10	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 44</i>	9q22.33	406
P4HB	DIA1, PROHB, DSI, GIT, PDI, PO4HB, P4Hb	<i>Protein disulfide isomerase</i>	17q25	508
PDIA2	PDA2, PDIp	<i>Protein disulfide isomerase A2</i>	16p13.3	525
PDIA3	P58, ERp61, ERp57, ERp60, GRP57, Pi-PLC, HsT17083	<i>Protein disulfide isomerase A3</i>	15q15	505
PDIA4	ERP70, ERP72	<i>Protein disulfide isomerase A4</i>	7q35	645
PDIA5	PDIR, FLJ30401	<i>Protein disulfide isomerase A5</i>	3q21.1	519
PDIA6	P5 ERp5	<i>Protein disulfide isomerase A6</i>	2p25.1	440
PDILT	PDI A7, ERp65	<i>Protein disulfide isomerase-like protein of the testis</i>	16p12.3	584
TMX1	TMX, PDI A11	<i>Thioredoxin-related transmembrane protein 1</i>	14q22.1	280

Gēna nosaukums	Citi nosaukumi	Proteīna nosaukums, angl.	Lokuss hromosomā	Aminoskābju skaits
TMX2	PDI A12	<i>Thioredoxin-related transmembrane protein 2</i>	11cen-q22.3	296
TMX3	FLJ20793, KIAA1830, PDI A13	<i>Protein disulfide isomerase TMX3</i>	18q22	454
TMX4	DJ971N18.2, KIAA1162, PDI A13	<i>Thioredoxin-related transmembrane protein 4</i>	20p12	349
TXNDC5	MGC3178, FLJ21353, FLJ90810, EndoPDI, Hcc-2, ERp46, PDI a15	<i>Thioredoxin-domain-containing protein 5</i>	6p24.3	432
TXNDC12	TLP19, ERP18, ERP19, hAG-1, AGR1, PDI A16	<i>Thioredoxin-domain-containing protein 12</i>	1p32.3	172



2. attēls. PDI gēnu saimes proteīnu izoformu domēnu kompozīcijas shematisks atspoguļojums. Visi proteīni satur N-gala signāla sekvenci (melns). Aktīvi TRX raksturīgie katalītiskie centri apzīmēti ar sarkano. Neaktīvi TRX raksturīgie katalītiskie centri apzīmēti ar zilo un violeto krāsu. Ar zaļo krāsu ir attēloti Ca<sup>2+</sup> saistīšanas domēni. Ar pelēko krāsu atzīmēti linkeru (angl. *linker*) reģioni. Transmembrānas domēni atzīmēti ar dzeltenu krāsu. C-gala endoplazmātiskā tīkla aiztures motīvi atzīmēti ar balto krāsu. Sekvenču analīze balstīta uz Nacionālā Biotehnoloģijas informācijas centra (NCBI) datubāzes. (Galligan Petersen 2012).

Figure 2. Scheme of the domain composition of the 21 PDI gene family protein isoforms. N-terminal signal sequence (black). Active catalytic TRX centres (red), inactive catalytic TRX centres (blue and purple), Ca<sup>2+</sup>-binding domains (green), linker regions (gray); transmembrane domains (yellow); C-terminal ER-retention sequences (white). Sequence analysis based on National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database. (Galligan Petersen 2012).

Papildus iepriekš minētajām īpašībām, dažu PDI proteīnu gēnu promotera reģionā ir endoplazmātiskā tīkla stresa atbildes elementi (ERSE, angl. *Endoplasmic Reticulum Stress Response Elements*). Tās ir sekvences, kas ir raksturīgas gēniem, kas kodē proteīnus, pastiprināti producētos  $\text{Ca}^{2+}$  trūkuma endoplazmātiskā tīklā un proteīnu glikozilācijas bloķēšanas gadījumos [5–7]. PDI ir loma  $\text{Ca}^{2+}$  jonu regulācijā [9]. PDI piedalās arī estrogēna sintēzes regulācijā [10].

Ir zināms, ka dažas PDI izoformas lielā daudzumā producējas vēža šūnās un var kalpot kā marķieri agrīnā vēža diagnostikā [5].

## 1.2. AGR2 proteīns

AGR2 proteīns (angl. *Anterior gradient 2 homolog*, HAG-2, AG2, GOB-4) ir neparasts PDI ģimenes loceklis. AGR2 gēns identificēts kā homologs *Xenopus laevis* XAG-2 (angl. *Xenopus anterior gradient*) gēnam [11], kas piedalās ķermeņa ass organizācijā *Xenopus laevis* embrionālajā stadijā [12].

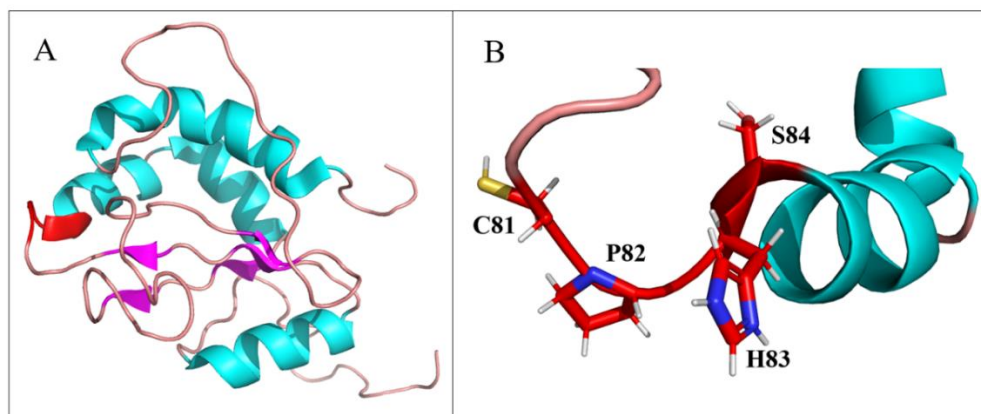
AGR2 gēns atrodas 7p21.3 cilvēku hromosomas lokusā, satur septiņus eksonus. Blakus AGR2 lokusam atrodas AGR3 gēns, kas ir cits PDI gēnu saimes loceklis un kodē proteīnu līdzīgu (radniecīgu) AGR2 proteīnam. Tāpēc ir pamatojums uzskatīt AGR2 un AGR3 gēnus par polilokusu polimorfismu [12-13].

AGR2 proteīna piederību PDI saimei pierādīja S. Persons *et al.* (2005), analizējot sekvences no NCBI ar Vispārējā Lokālā līdzināšanas meklēšanas rīku proteīniem (BLASTP, angl. *Basic Local Alignment Search Tool for proteins*) un Vispārējā Lokālā līdzināšanas meklēšanas rīku nukleotīdiem (BLASTN, angl. *Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides*) programmām [15]. Šajā pētījumā meklētas aminoskābju un nukleotīdu sekvences, kas satur TRX raksturīgu katalītisko centru un endoplazmātiskā tīkla aiztures signālu. AGR2 proteīnam identificēts gan TRX centrs (-C-P-H-S-), gan endoplazmātiskā tīkla aiztures signāls (K-T-E-L) (sk. 2. pielikumu). Kaut arī -C-P-H-S- nav tipiskais TRX līdzīgs katalītiskais centrs (-C-X-X-C), tomēr tam ir disulfīda saišu izomerizācijas un šaperona aktivitāte [16].

Pateicoties proteīnu signālu sekvenču atpazīšanas programmas analīzes datiem, ir pierādīts, ka pirmās 20 aminoskābes AGR2 aminoskābju sekvencē atbild par proteīna nogādāšanu endoplazmātiskajā tīklā un ir atšķelta nobriedušajam proteīnam [17].

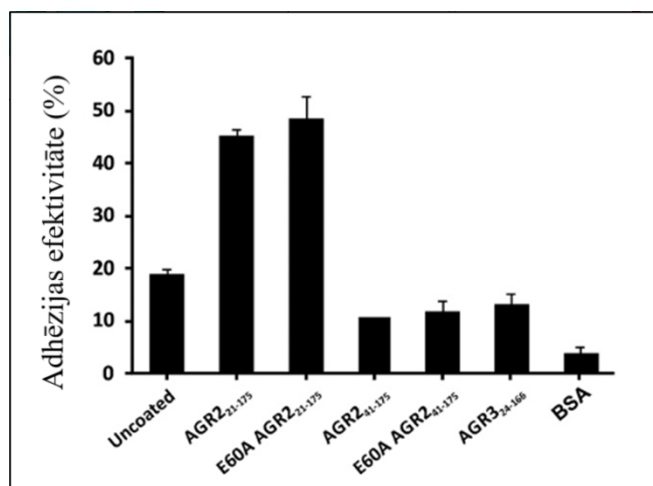
P. Patels *et al.* (2013) izpētīja AGR2 proteīna struktūru (3. attēls) [18]. Kopumā AGR2 proteīnam ir tioredoksīnam līdzīgs *fold*s ar četrām  $\alpha$ -spirālēm un vienu  $\beta$ -virtni proteīna kodolā. Lai pierādītu AGR2 proteīna struktūras elementu funkcionālas īpašības, pētījumā bija uztaisīti vairāki proteīna mutanti. AGR2<sub>21-175</sub> proteīns tika uzskatīts par dabisko formu, jo, kā iepriekš bija minēts, pirmās 20 aminoskābes nobriedušajam proteīnam ir atšķeltas. AGR2<sub>21-175</sub> E60A,

AGR2<sub>21-175</sub> Y63A, AGR2<sub>41-175</sub>, AGR2<sub>41-175</sub> C81S, AGR2<sub>41-175</sub> K64A un AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīnu mutanti bija izveidoti, lai uzzinātu E60, Y63, C81 un K64 aminoskābju lomu AGR2 dimērizācijā, šūnu adhēzijā un to ietekmi uz AGR2 aktivitāti. Izmantojot KMR, atklāts, ka AGR2<sub>21-40</sub> reģions ir nestrukturēts, un šūnu adhēzijas testi pierādīja, ka tas veicina šūnu adhēziju (4. attēls).



3. attēls. AGR2<sub>41-175</sub> E60A monomēra 3D struktūra. Ar dažādām krāsām apzīmēti otrējās struktūras elementi ( $\alpha$ -spirāle – gaiši zils;  $\beta$ -ķēde – violets; cilpa – rozā) C-P-H-S motīvs attēlots ar sarkanu krāsu (A) Pilnā proteīna struktūra. (B) Pietuvināta C-P-H-S aktīvā centra struktūra. (2LNT struktūra no Proteīnu datubāzes (PDB, angl. *Protein Database*) [18]).

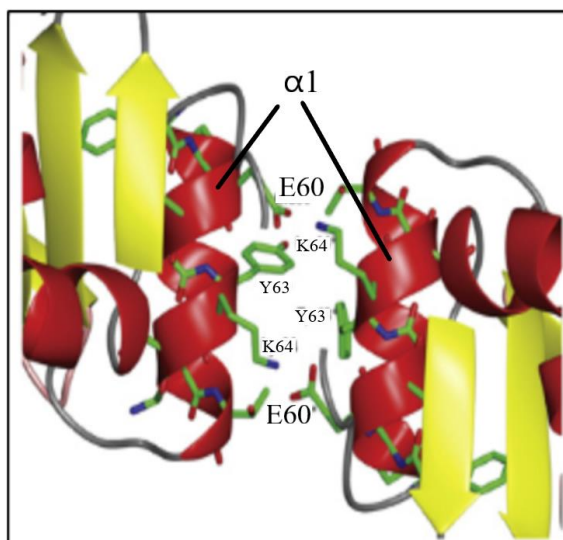
Figure 3. 3D structure of AGR2<sub>41-175</sub> E60A monomer (2LNT) Different colours represent secondary structure elements ( $\alpha$ -helix – cyan;  $\beta$ -sheet – magenta; loop – pink), the C-P-H-S motif represented as sticks (red). (A) Total protein structure. (B) Zoomed C-P-H-S active centre structure. (2LNT structure from Protein Database (PDB) [18]).



4. attēls. AGR2 proteīna un to mutantu aktivitāte šūnu adhēzijas testos. 21 – 40 AGR2 aminoskābes ir nepieciešamas, lai uzlabotu šūnu adhēziju. Adhēzijas efektivitāte izmērīta procentos. (Šūnas, kas saistījas pie substrāta, kam bija pielikts noteikts proteīns, pret visām pievienotām šūnām) [18].

Figure 4. Activity of AGR2 protein and its mutants in cell adhesion tests. AGR2 protein 21 – 40 residues promote cell adhesion. Adhesion counted in percent of adhered cells with certain protein from all added cells [18].

Tajā pašā pētījumā ar multileņķa lāzera gaismas skenēšanu (MALLS, angl. *MultiAngle Laser Light Scattering*) un analizējošo ultracentrifugāciju ir noskaidrots, ka AGR2<sub>21-175</sub> un AGR2<sub>41-175</sub> ir stabili homodimēru proteīni, savukārt AGR2<sub>21-175</sub> E60A un AGR2<sub>41-175</sub> E60A ir monomēri proteīni, kas nozīmē, ka glutamīnskābe 60, E60, nosaka proteīna dimerizāciju. AGR2 proteīna dimēru veidojošās mijiedarbības ir parādītas 5. attēlā.



5. attēls. AGR2 dimērs.  $\alpha 1$  spirāle satur dimerizācijai svarīgas aminoskābes (E60, K64, Y63), tās parādītās ar zaļām nūjiņām. Sāls tiltiņi starp karboksil E60 un amino K64 grupām veido galveno mijiedarbību starp AGR2 dimēra subvienībām. Y63-Y63 hidrofobā mijiedarbība arī ietekmē dimēra stabilitāti. (Adoptēts no [18]).

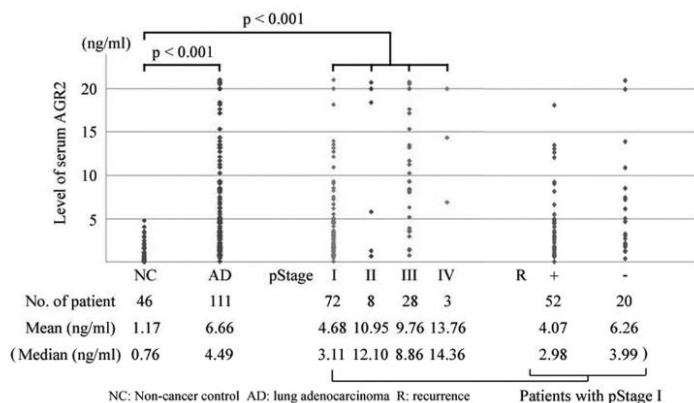
Figure 5. AGR2 dimer. Important for dimerization amino acids (E60, K64, Y63) in  $\alpha 1$  helix are represented as sticks. Carboxil group of E60 and amino group from K64 form salt bridges. Y63-Y63 stabilizes dimer through hydrophobic interaction. (Adopted from [18]).

Pirmajā pētījumā, kurā tika identificēts AGR2 gēns, ir pierādījumi AGR2 gēna koekspresijai ar estrogēna receptora gēnu krūšu vēža šūnās [11]. Tas nosaka īpašu interesi AGR2 proteīna izpētē saistībā ar vēža slimībām. AGR2 paaugstināta ekspresija ir detektēta vairākos vēža audu veidos. Pētījumā ar plaušu adenokarcinomas sēruma imūnufermentatīvās analīzes (ELISA angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) parādīja paaugstinātu AGR2 proteīna saturu vairākās vēža stadijās (6. attēls) [19].

Šajā pētījumā ir atrasti pierādījumi ARG2 sekrēcijai no šūnām, to pozitīvā ietekme uz adenokarcinomas izdzīvošanu. Tā kā AGR2 lielā daudzumā ekspresējās vēža šūnās pat agrajās stadijās, AGR2 proteīnu varētu izmantot kā vēža marķeri.

V. Ramašandrana *et al.* (2008) pētījumi apraksta AGR2 proteīna produkciju un ekspresiju aizkuņģa dziedzerā vēža attīstībā un pozitīvo ietekmi uz vēža šūnu izdzīvošanu [20]. AGR2 ir ekspresēts prostatas vēža šūnās un sekmē metastāžu migrāciju [21].

Eksperiments ar pelēm bija pierādīts, ka AGR2 proteīns veido heterodisulfīda saites ar lielu zarnu gļotu glikoproteīnu MUC2, kas ir bagāts ar cisteīnu [16]. Tādā veidā, pirmkārt, pierādīta disulfīdu izomerāzes AGR2 funkcija, otrkārt, pierādīts, ka AGR2 proteīnam ir arī loma zarnu aizsargmehānismu veidošanā.



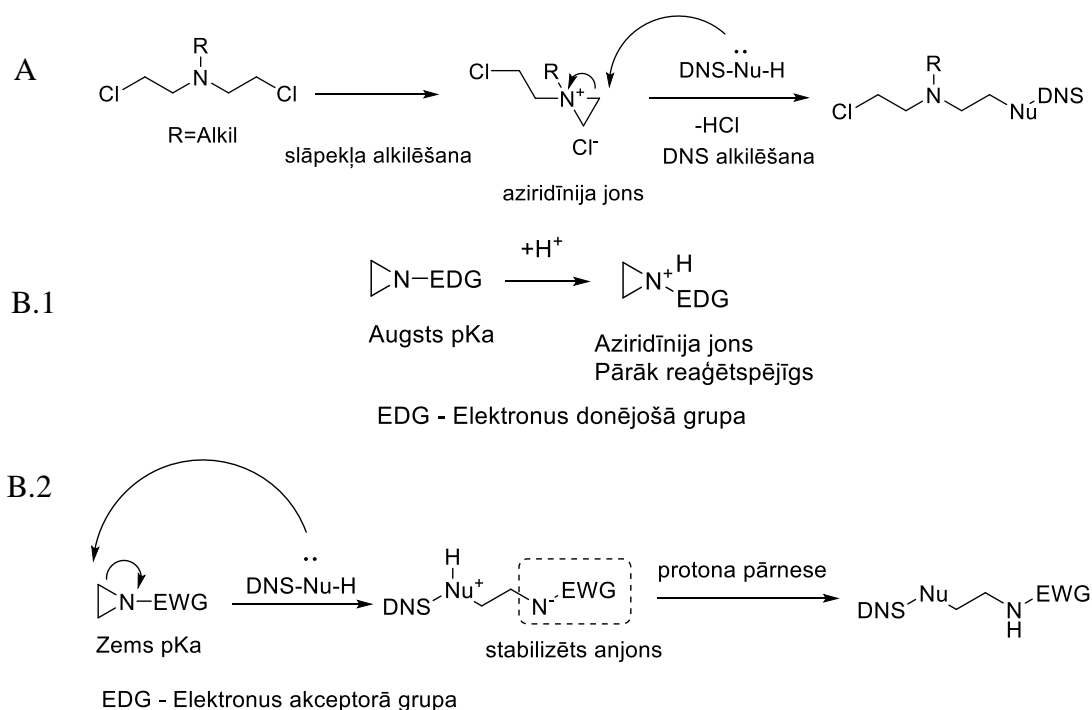
6. attēls. Grafiks, kas parāda detektētu (ELISA metode) AGR2 proteīna daudzumu pacientiem ar plaušu adenokarcinomu un kontroles paraugiem (nav vēža). Vidējais AGR2 līmenis daudz augstāk bija serumam no pacientiem ar plaušu adenokarcinomu salīdzinājumā ar kontroles grupu. NC: kontroles paraugi bez vēža; AD: plaušu adenokarcinoma; R: recidīvs. (Chung *et al.* 2011)

Figure 6. Scheme of serum AGR2 levels in lung adenocarcinoma patients and patients with no cancer, detected by ELISA In the serum of patients with lung adenocarcinoma AGR2 level is significantly higher as compared to patients with no cancer. NC means non-cancer control; AD meanslung adenocarcinoma, R means recurrence. (Chung *et al.* 2011)

### 1.3. Aziridīna cikla reakcijas ar nukleofiliem

Aziridīni ir trīs locekļu slāpekļi saturošie heterocikli, kuriem piemīt augsts cikla spriegums un alkilējošās īpašības. Vēsturiski pirmie pretvēža preparāti bija bis-β-hloretilamīna atvasinājumi. To citotoksicitāte balstās uz aziridīnija jona veidošanos *in situ* un tālāko DNS alkilēšanu (7. attēls) [22]. Tomēr aziridīnija jons ir pārāk reaģētspējīgs, lai panāktu vēlamos terapeitiskos efektus.

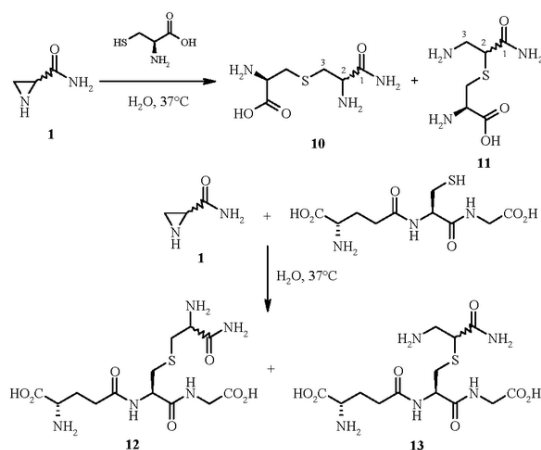
Lai iegūtu vēlamo reaģētspēju aziridīna elektroniskās īpašības ir jāpielāgo: elektron-donorās grupās uz slāpekļa atoma paaugstina slāpekļa atoma bāziskumu, tas ūdens vidē protonējas, veidojot aziridīnija katjonu, kas atkal ir pārāk reaģētspējīgs. Savukārt elektron-akceptorās grupas pilnīgi novērš aziridīna slāpekļa protonēšanos, joprojām saglabājot elektrofilo aziridīna raksturu, pateicoties alkilēšanas produkta anjona stabilizēšanai. (*“Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs”*, Avendano, Menendez, 2008).



7. attēls. Reakcijas ar aziridīnu. (A) DNS alkilēšana ar bis-beta-hloretilamīna atvasinājumiem. (B.1, B.2) Aziridīna elektronisko īpašību ietekme uz reaģētspēju. (Adoptēts no [23])

Figure 7. Reactions with aziridines. (A) DNA alkylation with bis-beta-chloroethylamine derivatives. (B.1, B.2) Impact of aziridine electronic properties on reactivity. (Adopted from [23])

Viens no aziridīna klases savienojumiem ir Leakadīns (aziridīn-2-karboksamīds). Tas var reaģēt ar cisteīnu, reakcijā atvērās aziridīna cikls un cisteīns kovalenti saistās ar Leakadīnu (8. attēls).



8. attēls. Leakadīna reakcija ar cisteīnu [24].

Figure 8. Reaction of Leakadine with cysteine [24]

#### 1.4. Proteīna 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC KMR

2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC ir 2D heterokodolu viena kvantu koherences (HSQC, angl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) KMR eksperimenta veids, kur tiek apskatīta <sup>1</sup>H un <sup>15</sup>N ķīmisko nobīžu korelācija. 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC ir divdimensionālais KMR eksperiments, kas tiek bieži lietots proteīnu KMR spektroskopijā

2D HSQC metodes pamatā ir magnetizācijas pārnese no kodola I (jūtīgs kodols, kuru precesiju magnētiskajā laukā var izraisīt signāli ar augstāko frekvenci, tas bieži ir <sup>1</sup>H) uz kodolu S (nejūtīgs kodols, kuru precesiju magnētiskajā laukā var izraisīt signāls ar zemāko frekvenci, tas bieži ir <sup>15</sup>N vai <sup>13</sup>C), tad magnetizācija tiek pārnesta atkal uz I kodolu un tad notiek signāla detekcija [25]. Metode dod iespēju stipri palielināt spektra jutīgumu, taču ir nepieciešama precīza spektra parametru uzstādīšana.

2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC spektrā x ass ir tiešā veidā noteiktās <sup>1</sup>H nobīde, bet y ass ir <sup>15</sup>N nobīdes. Spektra signāli ir veidoti no transformētiem kvadrupliem, kas iegūti neatkarīgu plakņu signālu detekcijas dēļ. Katrs signāls atspoguļo protona signālu, kas caur vienu saiti ir saistīts ar slāpekli. Tas īpaši ir derīgi proteīnu KMR, jo katrai aminoskābei (izņemot prolīnu, P) ir vismaz viena N-H saite pamatķēdē. Līdz ar ko 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC spektrā var redzēt pa vienam signālam (*crosspeak*) no katras aminoskābes, ka arī divus signālus no glutamīna un asparagīna NH<sub>2</sub> grupām sānu ķēdēs. Šis spektra tips ir it īpaši jūtīgs uz minimālām izmaiņām proteīna struktūrā, piem. atsevišķo aminoskābju protonēšanās/deprotonēšanās atkarībā no vides pH, oksidēšanas/reducēšanas, ka arī liganda/substrāta saistības izraisītas konformacionālās vai elektrostatiskās izmaiņas.

Visērtāk salīdzināt 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC novērojamās nobīžu atšķirības starp diviem spektriem var pēc formulas (1).

2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC <sup>15</sup>N iezīmēto proteīnu KMR spektru signālu nobīžu salīdzinājuma formula [26]:

$$d = \sqrt{\frac{1}{2} [\delta_H^2 + (\alpha \cdot \delta_N)^2]}$$

(1)

kur,  $\delta_H$  – <sup>1</sup>H nobīde,

$\delta_N$  – <sup>15</sup>N nobīde

$\alpha$  – N nobīžu mērogošanas koeficients (angl., *scaling factor*).

### 1.5. Proteīna molekulmasas noteikšana no rotācijas korelācijas laika, $\tau_c$ . $^{15}\text{N}$ $T_1$ un $T_2$ relaksācijas laika noteikšana

$T_1$  un  $T_2$  relaksācijas laiki raksturo molekulu dinamikas parametrus magnētiskajā laukā [27].

$T_1$  ir relaksācijas laiks, kad kodola magnetizācija pēc  $180^\circ$  impulsa atgriežas stāvoklī, kur tā ir paralēla pastāvīgā magnētiskā lauka virzienam.  $T_1$  relaksāciju vēl sauc par spina-režģa relaksāciju, jo spini relaksē no augstākā nelīdzsvarotā enerģētiskā līmeņa termodinamiskā līdzsvara stāvoklī ar apkārtni, režģi.  $T_1$  relaksācija ir eksponenciāls process, ko var izrēķināt pēc vienādojuma (2). Relaksācija ir jo ātrāka tad, kad kodola kustības sakrīt ar Larmora frekvenci (<https://radiopaedia.org/articles/t1-relaxation-time>). Rezultātā  $T_1$  relaksācija ir atkarīga no magnētiskā lauka stipruma, kas arī nodrošina Larmora frekvenci. Augstākos magnētiskos laukos  $T_1$  būs ilgāka.

$$M_t = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) \quad (2)$$

kur  $M_t$  – magnetizācija laikā  $t$  pēc  $90^\circ$  pulsa iedarbības;

$M_0$  – maksimālā magnetizācija pēc pilnas reģenerācijas;

$1/T_1$  –  $T_1$  relaksācijas ātrums (*relaxation rate*),  $R_1$ .

$T_2$  ir relaksācijas laiks, kad kodolu precesijas, izraisītās ar  $90^\circ$  impulsu vienlīdzīgi izkliedējās  $xy$  plaknē (perpendikulāra ārējām magnētiskām laukam). Šis process notiek tāpēc, ka katrs kodols molekulā atrodas savā lokālajā magnētiskajā laukā, ko veido blakus esošie kodoli, tāpēc  $T_2$  relaksāciju vēl sauc par spina-spina relaksāciju. Notiekot enerģijas pārnesei starp spiniem vai dipoliem, kas novietoti paralēli vai antiparalēli ārējam magnētiskam laukam, novēro dipola apvērsumu (*flip*) pretējā orientācijā. Tīram ūdenim  $T_2$  ir ilgs un sasniedz 3-4 s, taču makromolekulām  $T_2$  ir daudz īsāks un ir atkarīgs no molekulas izmēra. To var aprēķināt pēc vienādojuma (3) (<https://radiopaedia.org/articles/t2-relaxation?lang=gb>).

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (3)$$

kur  $M_{xy}$  – magnetizācija  $xy$ -plaknē pēc  $90^\circ$  pulsa iedarbības;

$M_0$  – maksimālā magnetizācija pēc pilnas reģenerācijas;

$1/T_2$  –  $T_2$  relaksācijas ātrums (*relaxation rate*),  $R_2$ .

Noteicot  $T_1$  un  $T_2$ , var atrast molekulas rotācijas korelācijas laiku (*rotational correlation time*),  $\tau_c$ , kas raksturo vidējo laiku, kurā molekula šķīdumā pagriežas par 1 radiānu [28].

Proteīnu molmasa labi korelē ar  $\tau_c$  vērtību, ko var aprēķināt no vienādojuma (4). Rezultātā to var izmantot, lai aprēķinātu aptuvenas proteīnu molekulārās masas. Izmantojot Stoksa likumu un pieņemot, ka globulārie proteīni ir sfēriski,  $\tau_c$  var aprēķināt pēc sekojošās formulas (izvedums netiek radīts) [29], [30]:

$$\tau_c \approx \frac{1}{4\pi v_N} \sqrt{6 \frac{T_1}{T_2} - 7}$$

(4)

kur  $v_N$  –  $^{15}\text{N}$  frekvence, Hz;

$T_1$  un  $T_2$  –  $^{15}\text{N}$  spina-režģa un  $^{15}\text{N}$  spina-spina relaksācija. Šī metode ir derīga aptuvenas masas noteikšanai globulāriem proteīniem ar masu līdz 25 kDa. Precīzi  $^{15}\text{N}$   $T_2$  mērījumi kļūst sarežģīti lielākiem proteīniem.

## 2. METODIKA

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Reaģenti

2. tabula

Izmantotie pētījumā reaģenti.

Table 2.

Reagents used in the research.

Reaģenta nosaukums	Tīrība, %	Ražotājs	Ražošanas valsts
Tris (Trīs(hidroksimetil)aminometāns)	≥99	Sigma-Aldrich	Ķīna
NaCl Natrija hlorīds	≥99.5	Thermo Fisher	ASV
Raugu ekstrakts	-	Acros	Ķīna
DTT (Ditiotrietols)	≥99.5	Thermo Fisher	Beļģija
TCEP(Trīs(2-karboksietil)fosfīns)	≥ 98.0	Glentham	Lielbritānija
2-beta-mercaptoetanols	≥99	Acros	Vācija
L-cisteīns	≥99	Acros	Spānija
MES (4-morfolīnetānsulfonskābe)	≥98	Thermo Fisher	ASV
Etanols	≥98.5	Latvijas Balzams	Latvija
Agarozē	≥99	Thermo Fisher	ASV
Tripton		Thermo Fisher	ASV
alfa-D-glikoze	≥99	Acros	Beļģija
VIT-MIX	-	Sigma-Aldrich	ASV
ampicilīns	-	Thermo Fisher	Beļģija
IPTG (Izopropil-β-D-tiogalaktozīds)	≥99	Thermo Fisher	Itālija
Etīdija bromīds	“High”	Thermo Fisher	ASV
Ētiķskābe	≥99.9	Latvijas Kimija	Latvija
SDS (nātrijs dodecil sulfāts)	≥99	Thermo Fisher	Japāna
Imidazols	≥99	Flourochem	Lielbritānija
Deitērija oksīds	≥99.9	Eurisotop	Lielbritānija
NaN <sub>3</sub> Natrija azīds	≥99	Acros	Indija
Agars	-	Thermo Fisher	Meksika
Glicerīns	≥99.5	Thermo Fisher	ASV
Bromfenols zilais	-	Thermo Fisher	Indija
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O Natrija hidrofosfāta heptohidrāts	≥99	Acros	ASV
Kālija dihidrofosfāts	≥99.0	Thermo Fisher	ASV
Simply Blue Safestain (SDS-PAGE krāsviela)	-	Invitrogen	ASV
NaOH (Nātrijs hidroksīds)	≥98.5	Acros	Zviedrija
ZnCl <sub>2</sub> (cinka hlorīds II)	≥98.5	Acros	Beļģija

Reaģenta nosaukums	Tīrība, %	Ražotājs	Ražošanas valsts
FeCl <sub>3</sub> (dzelzs hlorīds III)	-	Thermo Fisher	Lielbritānija
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (vara hlorīda dihidrāts)	≥99	Acros	Indija
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (kobalta hlorīda seksta hidrāts)	-	Acros	Čehija
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> (borskābe)	≥99.5	Acros	Izraēla
MnCl <sub>2</sub> (mangāna hlorīds II)	≥97	Acros Organics	Ķīna
Amonija hlorīds <sup>15</sup> N iezīmēts	≥99	Cmbrige Isotop Laboratories	Lielbritānija
Tiamīna hidrohlorīds	≥99	Sigma-Aldrich	Vācija
DMSO (dimetīl sulfoksīds)	≥99	Sigma-Aldrich	Lielbritānija
HCl (hlorskābe)	35-38%	Chempur	Latvija
DNS marķieris	-	Thermo Scientific	Lietuva
SDS-PADE protein ladder	-	Thermo Fisher	Lietuva

### 2.1.2. Buferi un barotnes

3. tabula

Izmantotie pētījumā buferi.

Table 3.

Buffers used in the research.

Bufera nosaukums	Bufera sastāvdaļas un pH
Buferis A	20 mM Tris-Cl, 500mM NaCl, 20 mM Imidazols, 2mM DTT, pH 7.5
Buferis B	20 mM Tris-Cl, 500mM NaCl, 500 mM Imidazols, 2mM DTT, pH 7
Buferis C	10 mM MES, 50 mM NaCl, 4 mM DTT, pH 6.5
M9 barotne 1 L	15 g glikoze, 4g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 3.5g <sup>15</sup> N (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 30g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 15g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.5g NaCl, 1.5 ml Trace elements
LB barotne 1 L	10 g NaCl, 10g triptons, 5g reugu ekstrakts

### 2.1.3. Izmantota aparatūra

4. tabula

Izmantotā pētījumā aparatūra.

Table 4.

Equipment used in the research.

Aparāts	Modelis	Izgatavotājs
Pipete m3	mLine single	Biohit
Pipete m200	mLine single	Biohit
Pipete m20	mLine single	Biohit
Pipete m1000	mLine single	Biohit
Svari	plj-750-3n	Kern
Analītiskie svāri	abt 120-5dm	Kern
Hromatogrāfs	acta purifier	Ge Health Care
Centrifūga	allegra x-30	Beckman Coulter
Centrifūga/vortekss	multi-spin mcs-6000/mcs-3000	Biosan
Avanti centrifūga	J-E	Beckman Coulter
centrifūga	5418	Eppendorf Ag
Kratītājs-termostatsmēģenēm ar dzēsēšanas funkciju	ts-100c	Biosan
Personālā iekārta vortekss	V-1 plus	Biosan
Mini magnētiskais maisītājs	MS-3000	Biosan
Termostatiskā ūdens vanna	WB 2s	Biosan-Grant
Inkubators	<i>CH-4103 Bottmingen</i>	Infors
Inkubators ar gravitācijas konvekciju	BD 53	Binder Gmbh
Mastercycler PQR ierīce	nexus gradient	Eppendorf Ag
Sonorex super sonifikators	RK 255 H	Bandelin
Eleptiskais klātītājs	psu-oi	Biosan
Spectrofotometrs	NanoDrop 2000c	Thermo Scientific
Autoklāvs	DX-65	Systec Gmbh
Bioloģiskās drošības skapis	streamline sc class II bsc	Esco
Elektroforēzes ierīce	cs-300V	Cleaver Scientific
Mini-gel vannīņa	-	Invitrogen
Horizontālā gēlu vannīņa	msmidi	Cleaver Scientific
Ultrasonic procesors	UP200Ht	Hielsher
Kodolmagnētiskās rezonances aparāts	800 MHz Bruker Avance III HD	Bruker
Niķeļa afinitātes hromatogrāfijas kolonna	HisTrap HP 5 ml	Ge Healthcare
Gelfiltrācijas kolonna	HiLoad Superdex 75 prep grade	Ge Healthcare
Dialīzes ierīce	Float-A-Lyzer, 8-10 kDa, 1 mL	Spectrum Laboratories, Inc.

#### 2.1.4. Trauki un materiāli

5. tabula

Izmantotā pētījumā aparatūra.

Table 5.

Equipment used in the research.

Vienreizējie instrumenti	Izgatavotājs	Valsts	Apraksts
Filtri	Sarstedt	Vācija	plastmasa filtropur s
Stobriņi 2 ml	Sarstedt	Vācija	plastmasa, safeseal micro tube 2ml
Cilindri 50 ml	Sarstedt	Vācija	plastmasa, 114x28mm pp
Cilindri 15 ml	Sarstedt	Vācija	plastmasa, 120x17mm pp
Stobriņi 1.5 ml	Sarstedt	Vācija	plastmasa
Koncentratori “Amicon Ultra 15”	Merck Millipore Ltd	Īrija	plastmasa
multiply-pro trauciņš 0.2ml, pp	Sarstedt	Vācija	plastmasa
Pipešu uzgaļi 1000 µl	Sarstedt	Vācija	plastmasa
Pipešu uzgaļi 200 µl	Sarstedt	Vācija	plastmasa
Pipešu uzgaļi 20 µl	Sarstedt	Vācija	plastmasa
Seroloģiskās pipetes, 25 ml	Sarstedt	Vācija	plastmasa, sterilā
Petri plates	Sarstedt	Vācija	plastmasa, sterilā
Izmeklēšanas cimdi	Medeco B.V.	Malāzija	latekss bez talka, teksturēti
“Sartorius” pipetes uzgaļi 1ml	Sartorius	Somija	plastmasa
Inokulācijas cilpa 1 ul	Sarstedt	Vācija	plastmasa
Inokulācijas līdzinātājs	Sarstedt	Vācija	plastmasa
Cilindrs 13 ml	Sarstedt	Vācija	plastmasa, sterilā, 100x16mm, pp
Svērlaiviņas lielas	Heathrow Scientific	Ķīna	plastmasa
Svērlaiviņas mazas	Heathrow Scientific	Ķīna	plastmasa
«GenJet spin columns & collection tubes»	Thermo Scientific	Vācija	plastmasa
Gatavas SDS-PAGE gēla kasetes NuPAGE	Novex Life Technologies	ASV	4-12% bis-tris
5 mm KMR ampulas	-	-	stikls

#### 2.1.5. Baktērijas celmi, plazmīdas un praimerī

Proteīnu AGR<sub>21-175</sub>, AGR<sub>241-175</sub> un AGR<sub>241-175</sub> E60A ekspresijai izmantots *E. Coli* BL21(DE3) celms, transformēts ar pET-Duet-1 vektoru, kas satur atbilstošo gēnu, plazmīdas kartes ir pielikumā 1.

AGR<sub>241-175</sub>\_E60A mutācijas ieviešanai izmantotie praimerī:

Tiešais – Fw\_E60A: 5’P-GACTTACGAAGCGGCGCTGTATAAG-3’

Reversais – Rv\_E60A: 5’P-CTTATACAGCGCCGCTTCGTAAGTC-3’

## 2.2. Eksperimentālās metodes

### 2.2.1. AGR<sub>41-175</sub> E60A plazmīdas iegūšana

Dabīgā (angl. *wild type*) AGR<sub>21-175</sub> un AGR<sub>241-175</sub> proteīnu sekvences ar N-gala pievienotu poli histidīna birku (His-tag) un TEV proteāzes restrikcijas saiti nopirkti no Eurofin Genomics pEX-A258 vektora veidā un pārklonētas pET\_Duet-1 vektorā izmantojot *XhoI* un *NdeI* restrikcijas saites. Izmantojot vietas virzītas mutāģenēzes palīdzību SPRINP metodi [31] esošā AGR<sub>241-175</sub> konstruktā ieviestā sekojošā mutācija E60A.

### 2.2.2. <sup>15</sup>N iezīmēta AGR2 proteīna ekspresija

Metode balstās uz P. Patela (2009) pētījuma un mūsu laboratorijas pieredzi.

- 1) Sagatavot 1 L <sup>15</sup>N iezīmēto M9 un 7 mL LB sterilās barotnes, abās pievienot 0.1 mg/mL ampicilīna.
- 2) No Petri plates ar svaigi transformētām *E. Coli* BL21(DE3) šūnām, kas satur atbilstošo plazmīdu, ar inokulācijas cilpas palīdzību paņemt vienu koloniju un inokulēt sterilo LB barotni ar ampicilīnu 13 mL sterilajā mēģenē.
- 3) Ievietot mēģeni inkubatorā pie 37 °C un 200 rpm . Audzēt aptuveni sešas, astoņas stundas (dienas kultūra) līdz optiskais blīvums (OD, angl. *Optical Density*) pie 600 nm ir lielāks par 1.5-2.5 (OD<sub>600</sub> > 1.5-2.5.)
- 4) Uzsildīt līdz 37 °C inkubatorā divas 13 mL mēģenes ar 7 mL M9 barotni ar ampicilīnu.
- 5) Pārvietot 70 μL (1 % v/v) no LB barotnes katrā no sterilajām mēģenēm ar M9.
- 6) Atstāt nakts kultūru uz 16 stundām 13 mL mēģenes ar inficēto M9 inkubatorā pie 37 °C un 200 rpm.
- 7) Uzsildīt atlikušo M9 barotni līdz 37 °C stacionārajā inkubatorā.
- 8) Pēc 16 stundām 1 % (v/v) no nakts kultūras pievienot atlikušai M9 barotnei un sadalīt to pa četrām 2 L kolbām, lai katrā būtu 250 mL M9.
- 9) Ielikt 2 L kolbas inkubatorā pie 37 °C un 200 rpm, audzēt līdz M9 sasniegs 0.4-0.5 OD<sub>600</sub>, pārvietot kolbas inkubatorā pie 20 °C un 200 rpm.
- 10) Kad absorbcijas vērtība sasniegs 0.6-0.7 OD<sub>600</sub>, pievienot 1 mM IPTG katrā kolbai.
- 11) Pēc 24 stundām saliet M9 četrās, iepriekš nosvērtās, 500 mL centrifūgas burkā un nocentrifūgē pie 7400x g pie 4 °C.
- 12) Noliet supernatantu, nosvērt šūnas un sasaldēt tos pie -20 °C.

### 2.2.3. AGR2 proteīna attīršana

#### 2.2.3.1. Šūnu apvalku sagraušana

Līzi veikt ultrasonificējot. Sasalušās šūnas resuspendē ledus aukstajā buferī A (pievienot 10-15 mL bufera A uz 1 g šūnu) un ielej stikla glāzē. To novieto kastē ar ledu un ievieto ultraskaņas aparātā. Ultraskaņas aparāta zondi iegremdē šūnu suspensijā tā, lai līdz glāzes dibenam būtu ~0.5 cm.

Uzsāk 50 minūšu ultrasonifikāciju ar 70% jaudu un amplitūdu, kas ir atkarīga no šūnu suspensijas tilpuma (ja tilpums ir mazāks par 20 mL, tad amplitūda ir 40%, ja tilpums ir starp 20 mL un 40 mL, tad amplitūda ir 50%, ja tilpums ir starp 40 mL un 70 mL, tad amplitūda ir 70%, ja tilpums ir lielāks par 70 mL, tad amplitūda ir 90%). Līzes laikā pārlicinās, lai ledus neizkūstu.

Pēc tam, šūnu lizātu centrifūgē 45 minūtēs pie 4 °C un 27000x g 15 mL centrifūgas burkā Superantantu nolej 50 mL mēģenē. 10 µL no supernatanta sajauc ar 10 µL 2x *Laemmli* bufera (1:1 attiecība) priekš SDS-PAGE analīzes, bet nogulsnes no lizāta resuspendē DDI ūdenī līdzīgā tilpimā un arī 10 µL paņem priekš SDS-PAGE analīzes.

#### 2.2.3.2. Niķeļa afinitātes hromatogrāfija uz HisTrap™ kolonnas.

Sagatavo hromatogrāfu (AKTA Purifier) priekš niķeļa afinitātes hromatogrāfijas (ieslēdz hromatogrāfu un *UNICORN* programmu, izmazgā parauga ievadišanas kontūru (angl. *Superloop*), vadus; izmazgāt sūkņus ar *Pump wash basic* komandu un pieslēdz HisTrap kolonnu).

Izmazgā HisTrap kolonnu ar ūdeni 10 kolonnas tilpumus, ar buferi B – 5 kolonnas tilpumus, un ar buferi A – 10 kolonnas tilpumus.

Supernatantu manuālinofiltrē izmantojot 0.2 µm filtru. Uzpilda ievadišanas kontūru ar supernatantu un ievada to kolonnā ar ātrumu 1.0-1.5 ml/min, lai maksimizētu proteīna afinitāti pret NiNTA sveķiem.

Kad viss supernatants izies cauri kolonnai, eluē proteīnu ar buferi B (100% gradients), savāc visas frakcijas, kas eluējas no kolonnas. Frakcijas pārbaudīt uz SDS-PAGE gēla. Frakcijas ar mērķa proteīnu sakoncentrē ar *3K Amicon* ultrakoncentratora palīdzību līdz 3-5 ml pie 4 °C un 5000x g.

#### 2.2.3.3. Gelfiltrācija ar Superdex 75 pg 16/600 kolonnu.

Sagatavo hromatogrāfu eksperimentam un pieslēgt *Superdex 75pg 16/600* kolonnu, izmazgā kolonnu ar vismaz 150 mL ūdens, un ar vismaz 150 mL bufera C. Iekoncentrētās frakcijas ievada kolonnā. Eksperimentu veic ar ātrumu 1.0 ml/min. Savāc eluētās frakcijas. .

Attīrītu proteīnu pārbauda ar SDS-PAGE analīzi, iekoncentrē līdz 0.5-1.0 mM koncentrācijai. Īstermiņā – proteīnu glabā 4 °C temperatūrā. Ilgtermiņa glabāšanai proteīna paraugu sadala alikvotos, 500-550 µM, sasaldē šķidrā slāpekļī un glabā -80 °C.

#### 2.2.4. His-tag šķelšana ar TEV proteāzi

6. tabula.

TEV proteāzes (angl. *Tobacco Etch Virus protease*) šķelšanas testu tabula.

Table 6.

TEV protease cleavage test table.

Testa parauga numurs	TEV proteāzes un proteīna attiecība, mg/ml	Buferis	Inkubācijas temperatūra, °C	Inkubācijas laiks, h
1.	1:10	10 mM MES pH 6.5, 50 mM NaCl, 4 mM DTT	23	4
2.	1:5		23	4
3.	1:10		23	16
4.	1:5		23	16
5.	1:10		16	16
6.	1:10		4	16
7.	1:5		4	16

#### 2.2.5. Paraugu sagatavošana un parametri spektra uzņemšanai

Paraugu sastāvs:

- 1) 570 µM <sup>15</sup>N-AGR2<sub>21-175</sub> iezīmēts proteīns ar poli-histidīna birku (His-tag), 20 mM MES pH 6.5, 50 mM NaCl, 4 mM DTT, 7% D<sub>2</sub>O, 0.03 % NaN<sub>3</sub>.
- 2) 603 µM <sup>15</sup>N-AGR2<sub>41-175</sub> iezīmēts proteīns ar His-tag, 20 mM MES pH 6.5, 50 mM NaCl, 4 mM DTT, 7% D<sub>2</sub>O, 0.03 % NaN<sub>3</sub>.
- 3) 512 µM <sup>15</sup>N-AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A iezīmēts proteīns ar atšķeltu His-tag, 20 mM MES pH 6.5, 50 mM NaCl, 4 mM DTT, 7% D<sub>2</sub>O, 0.03 % NaN<sub>3</sub>.
- 2) 635-315 µM <sup>15</sup>N-AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A iezīmēts proteīns ar His-tag 10 mM MES, 50 mM NaCl, 4 mM DTT, pH 6.5, 7% D<sub>2</sub>O, 0.03 % NaN<sub>3</sub>.

Spektru parametri:

- 1) T<sub>1</sub> relaksācijas laika mērīšanas spektra uzņemšanas parametri:

Pulsa sekvenca – hsqct1etf3gpsi3d, eksperiments – pseudo-3D, uzkrājumu skaits – 8, punktu skaits – 4096.

2) T<sub>2</sub> relaksācijas laika mērīšanas spektra uzņemšanas parametri:

Pulsa sekvenču – hsqct2etf3gpsi3d, eksperiments – pseudo-3D, uzkrājumu skaits – 4, punktu skaits – 4096.

3) 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC spektra uzņemšanas parametri:

Pulsa sekvenču – hsqcxfp3gpphwg, eksperiments – 2D, uzkrājumu – skaits 4 vai 8, spektrometra frekvence – 800.254 Hz, punktu skaits – 2048x256.

7. tabula.

KMR paraugu sastāvs priekš reducējošo aģentu mijiedarbības ar cisteīnu pārbaudi.

Table 7.

Composition of NMR samples for testing reaction of reducing agents and cysteine.

Parauga numurs un nosaukums	Bufēris	Reducējošais aģents	L-Cisteīns	D <sub>2</sub> O
Tris_Cys	10 mM Tris-Cl, pH 7.5	-	1 mM	10%
Tris_DTT	10 mM Tris-Cl, pH 7.5	2 mM DTT	-	10%
Tris_merc	10 mM Tris-Cl, pH 7.5	5 mM 2-β-merkaptotanolis	-	10%
Tris_TCEP	10 mM Tris-Cl, pH 7.5	1 mM TCEP	-	10%
Tris_DTT_Cys	10 mM Tris-Cl, pH 7.5	2 mM DTT	1 mM	10%
Tris_merc_Cys	10 mM Tris-Cl, pH 7.5	5 mM 2-β-merkaptotanolis	1 mM	10%
Tris_TCEP_Cys	10 mM Tris-Cl, pH 7.5	1 mM TCEP	1 mM	10%
MES_Cys	10 mM MES, pH 6.5	-	1 mM	10%
MES_DTT	10 mM MES, pH 6.5	2 mM DTT	-	10%
MES_merc	10 mM MES, pH 6.5	5 mM 2-β-merkaptotanolis	-	10%
MES_TCEP	10 mM MES, pH 6.5	1 mM TCEP	-	10%
MES_DTT_Cys	10 mM MES, pH 6.5	2 mM DTT	1 mM	10%
MES_merc_Cys	10 mM MES, pH 6.5	5 mM 2-β-merkaptotanolis	1 mM	10%
MES_TCEP_Cys	10 mM MES, pH 6.5	1 mM TCEP	1 mM	10%

1D <sup>1</sup>H KMR spektri: spektra platums 12820.5 Hz, laiks starp impulsu secībām 5 s, uzkrājumu skaits 64, uzkrāšanas ilgums 1.27 min.

Uzņemšana notika svaigi pagatavotam paraugam, 0 h, pēc 19 stundām un pēc 85 stundām glabājot paraugu istabas temperatūrā.

### 2.2.6. KMR parauga dialīze.

Dialīzei izmantoja mikro-tilpuma dialīzes kasetes, Float-A-Lyzer. Pirms izmantošanas, membrānu iemērcē DDI ūdenī uz 30 min istabas temperatūrā. Dialīzes membrānā ar šlirces palīdzību ievieto parauga šķīdumu. Paraugu dialīzē pret buferi C veicot vismaz trīs bufera maiņas, lai sasniegtu pietiekoši lielu atšķaidījumu (vismaz 10 000 reizēs). Dialīzi veic 4 °C temperatūrā, maisot šķīdumu uz magnētiskā maisītāja. Pirmās divas maiņas veic pēc 3-4 h, pēdējo porciju atstāj dializēties pa nakti, 16 h.

### 2.2.7. Datu analīzes metodes

1D spektru apstrādei un analīzei izmantota programma *MestReNova v.12.0.0*.

Proteīnu KMR spektru apstrādei un analīzei izmantotas programmas *TopSpin 4.0.6*. un datora palīglīdzekli rezonanses asignēšanai (CARA, angl. *Computer Aided Resonance Assignment*) *CARA 1.9.1*.

<sup>15</sup>N T<sub>1</sub> un T<sub>2</sub> relaksācijas laika aprēķiniem izmantotas *Mestrenova 12.0.0* un *Excel* programmas. Metodes pamatā instrukcijas ([www.nmr2.buffalo.edu/](http://www.nmr2.buffalo.edu/)) [30].

Proteīnu sekvenču salīdzināšanai izmantota *Clustal Omega* interneta serveris [32].

Proteīnu molmasas, ekstinkcijas koeficienta, pI aprēķināšanai izmantota *ExPASy ProtParam* programma [33].

Attēlu rediģēšanai ir izmantotas *Paint* un *Gimp 2.0* programmas.

Proteīna 3D attēli iegūti ar *PyMOL* programmu. (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. AGR<sub>21-175</sub>, AGR<sub>41-175</sub> un AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīna producēšana.

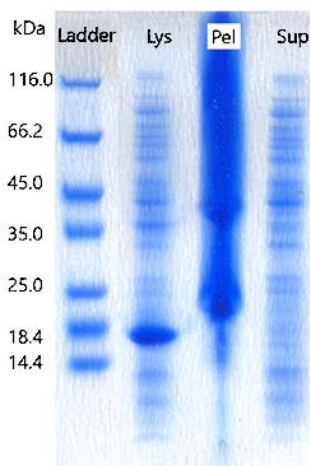
Visi trīs AGR2 variācijas (AGR<sub>21-175</sub>, AGR<sub>41-175</sub> un AGR<sub>241-175</sub> E60A) N-galā satur sešu histidīnu virkni (His-tag) un TEV proteāzes šķelšanas saiti (MAHHHHHHENLYFQS), kas nepieciešams priekš proteīna attīrīšanas ar niķeļa afinitātes hromatogrāfiju.

Visi proteīni ekspresēti un attīrīti pēc protokoliem, kas ir detalizēti aprakstīti eksperimentālā metodes nodaļā.

AGR<sub>21-175</sub> un AGR<sub>41-175</sub> proteīni tika ekspresēti un attīrīti pēc nedaudz modificēta protokola [18] un iznākumi no viena litra M9 barotnes bija 42 mg un 57 mg proteīna attiecīgi.

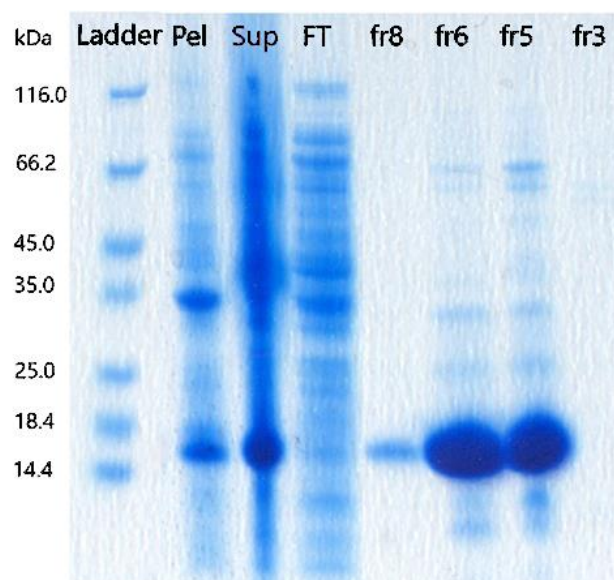
Izmantojot vietas virzītas mutāģenēzes metodi pET-Duet1\_AGR<sub>241-175</sub> konstruktā ir ieviesta E60A mutācija, kas novērš šī proteīna dimērizāciju.

AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīns no sākuma ir producēts LB barotnē pie 37 °C un SDS-PAGE analīzes rezultāti pierādīja, ka proteīns nav šķīstošs (9. attēls). Tad AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīns tika producēts zemākā temperatūrā, 20 °C un SDS-PAGE analīzes rezultāti pierādīja, ka proteīns ir šķīstošs (10. attēls). 11. un 12. attēlos var redzēt attiecīgi niķeļa afinitātes un gelfiltrācijas hromatogrammas. No 1 L LB barotnes sanāca attīrīt 120 mg proteīna. Pēc tam proteīns tika ekspresēts M9 barotnē, pie 20 °C, tas iznākums bija 90 mg proteīna no 1 L M9 barotnes.



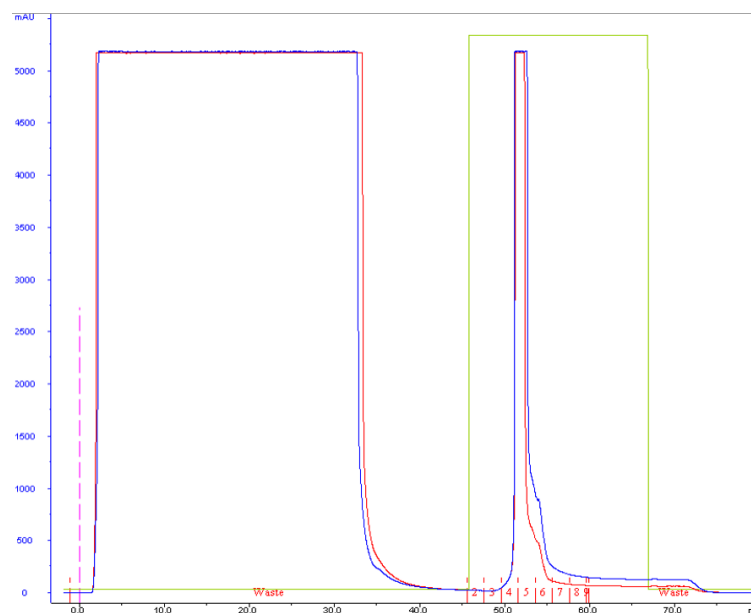
9. attēls. AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīna līzes SDS-PAGE analīze. Ladder – proteīna marķieris, Lys – paraugs pēc līzes, Pel – paraugs no nogulsnēm pēc līzēto šūnu centrifugācijas. Sup – paraugs no suprenatanta pēc līzēto šūnu centrifugācijas. AGR<sub>241-175</sub> E60A ekspresija 37 °C.

Figure 9. SDS-PAGE analysis of AGR<sub>241-175</sub> E60A protein lysis. Ladder – protein mass ruler, Lys – sample after lysis, Pel – pellets sample after lysate centrifugation. Sup – supernatant after lysate centrifugation. AGR<sub>241-175</sub> E60A expression at 37 °C.



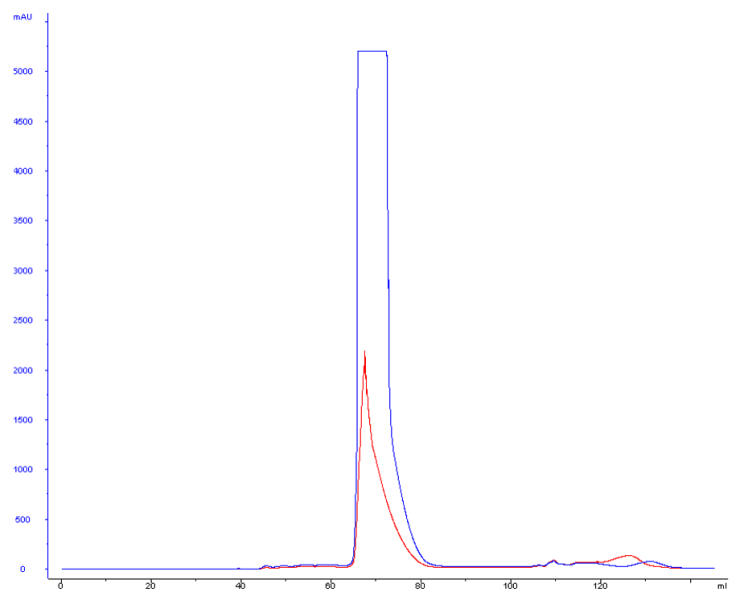
10. attēls. AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna līzes SDS-PAGE analīze. Ladder – proteīna marķieris, Lys – paraugs pēc līzes, Sup – paraugs no suprenatanta pēc līzēto šūnu centrifugācijas, Pel – paraugs no nogulsniem pēc līzēto šūnu centrifugācijas, FT – suprenatants, kas izgāja caur HisTrap kolonnu; fr8, fr6, fr5, fr3 – frakcijas, kas tika eluētas no HisTrap kolonnas. AGR2<sub>41-175</sub> E60A ekspresija 20 °C.

Figure 10. SDS-PAGE analysis of AGR2<sub>41-175</sub> E60A protein lysis. Ladder – protein mass ruler, Lys – sample after lysis, Pel – pellets sample after lysate centrifugation. Sup – supernatant after lysate centrifugation. FT – flow through from HisTrap column; fr8, fr6, fr5, fr3 – fractions of the eluted protein from HisTrap column. AGR2<sub>41-175</sub> E60A expression at 20 °C.



11. attēls. HisTrap hromatogramma AGR2<sub>41-175</sub> E60A ekspresētam 20°C. mAU<sub>280nm</sub> – zilā līnija; mAU<sub>254nm</sub> – sarkanā līnija; B bufera gradients – zaļā līnija.

Figure 11. HisTrap chromatogram of AGR2<sub>41-175</sub> E60A expressed at 20 °C. mAU<sub>280nm</sub> – blue curve; mAU<sub>254nm</sub> – red curve; gradient of B buffer – green curve.

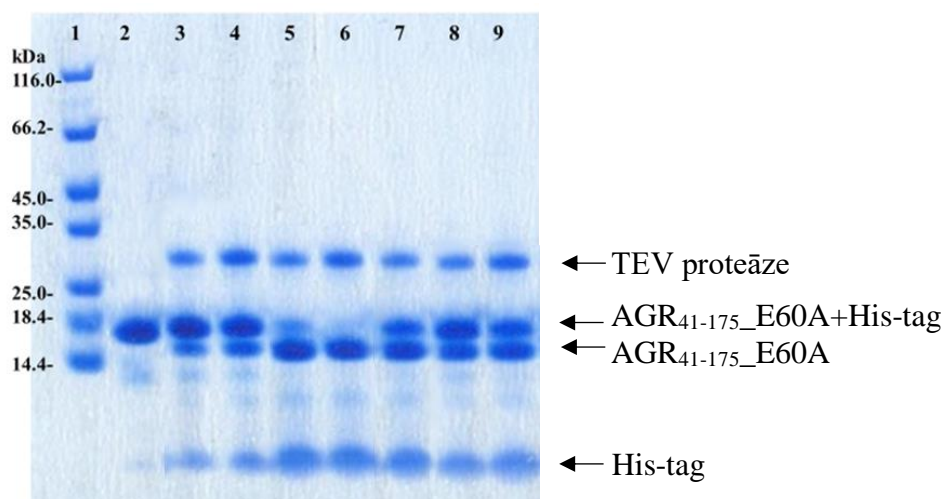


12. attēls. Gelfiltrācijas hromatogramma AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A ekspresētā 20 °C. mAU<sub>280nm</sub> – zilā līnija; mAU<sub>254nm</sub> – sarkanā līnija.

Figure 12. Gelfiltration chromatogram of AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A expressed at 20 °C. mAU<sub>280nm</sub> – blue curve; mAU<sub>254nm</sub> – red curve.

### 3.2. AGR241-175 E60A proteīna šķelšana ar TEV-proteāzi. Optimālo apstākļu meklējumi.

Lai apskatītu KMR spektrā dabisko proteīna AGR2<sub>41-175</sub> E60A formu His-tag tika atšķelts. Atrasti optimāli apstākļi His-tag šķelšanai. Tie ir 1 mg/ml proteīna šķīdums 10 mM MES, 50 mM NaCl, 4 mM DTT, pH 6.5 buferī, kas ir samaisīts ar TEV-proteāzi attiecībās 1:5 (TEV-proteāze parakumā), noinkubēts, 16 stundas istabas temperatūrā, 23 °C (13. attēls).



13. attēls. SDS-PAGE analīze TEV proteāzes šķelšanas testu rezultātiem. 1. proteīnu masas marķieris. 2. – AGR2<sub>41-175</sub> proteīns pirms šķelšanas. 3. – šķelšanas paraugs 1. (1:10, 23 °C, 4 h). 4. – šķelšanas paraugs 2. (1:5, 23°C, 4 h). 5. – šķelšanas paraugs 3. (1:10, 23 °C, 16 h) 6. – šķelšanas paraugs 4. (1:5, 23°C, 16 h) 7. – šķelšanas paraugs 5. (1:10, 16 °C, 16 h) 8. – šķelšanas paraugs 6. (1:10, 4°C, 16 h) 9. – šķelšanas paraugs 7. (1:5, 4 °C, 16 h).

Figure 13. SDS-PAGE analysis of TEV protease cleavage test results. 1 – protein mass ladder; 2 – AGR2<sub>41-175</sub> protein before cleavage. 3 – cleavage sample 1. (1:10, 23 °C, 4 h). 4 – cleavage sample 2. (1:5, 23°C, 4 h). 5 – cleavage sample 3. (1:10, 23 °C, 16 h). 6 – cleavage sample 4. (1:5, 23°C, 16 h). 7 – cleavage sample 5. (1:10, 16 °C, 16 h). 8 – cleavage sample 6. (1:10, 4 °C, 16 h). 9 – cleavage sample 7. (1:5, 4 °C, 16 h).

### 3.3. Bufēra sastāva izvēle un reducējošo aģentu ietekme.

AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna KMR spektru uzņemšanai un proteīna testiem ar ligandiem nepieciešams izvēlēties buferi, kurā proteīns ir stabils un aktīvs. Tris buferī (pH intervāls 7.0 – 9.0 (pēc <https://www.sigmaaldrich.com/>)) ar pH 8 pēc aktivitātes testiem ir zināms, ka proteīns ir stabilāks, bet maz aktīvs, salīdzinot ar MES buferi ar pH 6.5. (pH 8.0 – aktivitāte  $41.0 \cdot 10^{-4}$  vien/mg/min, pH 6.5 – aktivitāte  $61.5 \cdot 10^{-4}$  vien/mg/min pēc insulīna testiem) Tāpēc AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna testēšanai ar ligandiem ir izvēlēts 10 mM MES buferis ar pH 6.5.

Papildus priekšroka skābāka bufera izmantošanai ir fakts, ka bieži audzēju audos ir pazemināts pH [34].

Līdz ar to, ka AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna aktīvais centrs satur cisteīnu un reakcijās ar substrātu piedalās šī aminoskābe, svarīgi ir izvēlēties reducējošo aģentu, kas paturēs cisteīnu (C81) sastāvā reducētajā stāvoklī. Lai izvēlēties labāko reducētāju proteīnam ir uzmodelēts testa eksperiments ar *L*-cisteīnu un potenciāliem reducējošiem aģentiem.

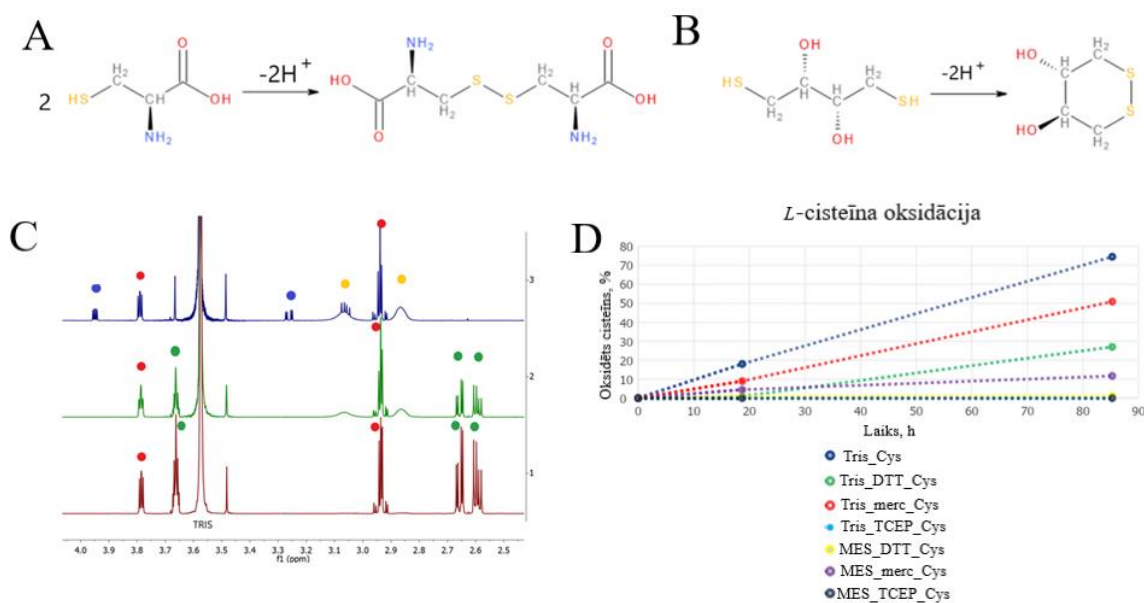
Analizējot 1 mM *L*-cisteīna oksidācijas tempus atkarībā no reducējoša aģenta klātbūtnes un bufera komponentes, speciāli tika izvēlētas ekvivalentas pēc reducēšanas potenciāla reducējošo aģentu koncentrācijas (1 mM TCEP, 2 mM DTT un 5 mM 2-β-mercaptoetanolis).

Testētus apstākļus var sakārtot pēc oksidētā *L*-cisteīna daudzuma pēc 85 stundām istabas temperatūrā (no mazāka uz lielāku) (14. attēls):

1. TCEP+10 mM Tris-Cl, pH 7.5/ TCEP+10 mM MES, pH 6.5
2. DTT+10 mM MES, pH 6.5
3. 2-β-mercaptoetanolis+10 mM MES, pH 6.5
4. DTT+10 mM Tris-Cl, pH 7.5
5. 2-β-mercaptoetanolis+10 mM Tris-Cl, pH 7.5
6. 10 mM Tris-Cl, pH 7.5/10 mM MES, pH 6.5.

TCEP salīdzinot ar DTT var būt neizmantojams testos ar noteiktiem ligandiem, papildus tam 2 mM DTT+10 mM MES, pH 6.5 paraugā *L*-cisteīna oksidēšanas pakāpe nebija ļoti atšķirīga no 1 mM TCEP+10 mM Tris-Cl, pH 7.5/ 1 mM TCEP+10 mM MES, pH 6.5 paraugiem (14. attēls (D)). Tāpēc optimālākais bufers priekš AGR2 proteīna testiem ar ligandiem ir 4 mM DTT+10 mM MES, pH 6.5.

Truklāt, bufera sastāvā ir 50 mM NaCl, kas palīdz proteīna stabilizācijai un ir optimālā koncentrācija priekš proteīnu KMR.

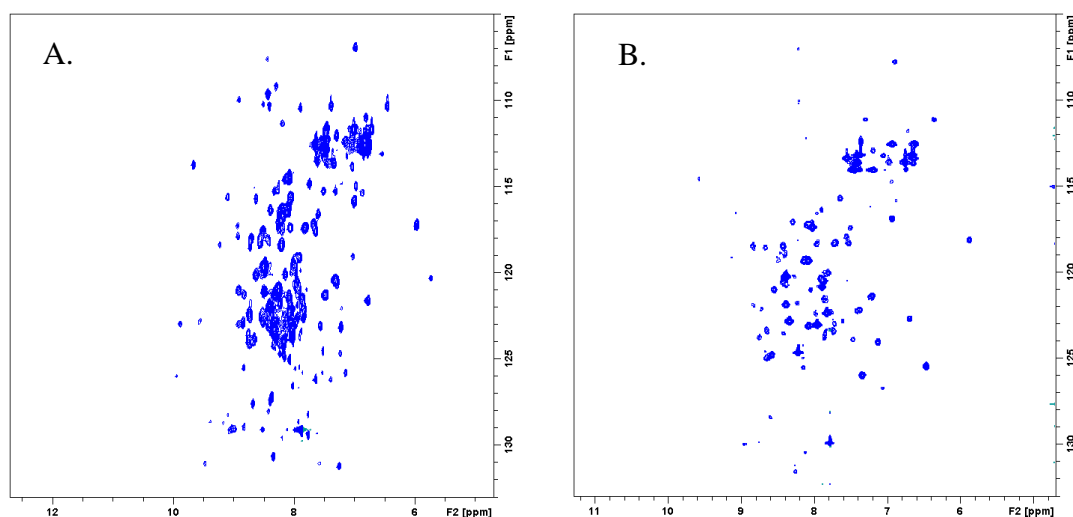


14. attēls. (A) *L*-cisteīna oksidēšanas reakcija, veidojot cistīnu. (B) DTT oksidēšanas reakcija. (C) 1.0 mM *L*-cisteīna oksidēšanas spektrs 2 mM DTT klātbūtnē (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1D  $^1\text{H}$  KMR spektrs). Reducētās *L*-cisteīna formas signāli – sarkani aplīši, oksidētās formas *L*-cisteīna signāli – zili aplīši. Reducētās DTT formas signāli – zaļi aplīši, oksidētās formas DTT signāli – dzeltenī aplīši. (D) *L*-cisteīna oksidēšanas pakāpe atkarībā no laika dažādi reducējošu aģentu klātbūtnē, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5 un 10 mM MES-Cl, pH 6.5.) (No FEBS3+ 2019 konferences 31. postera)

Figure 14. (A) *L*-cysteine oxydation reaction, formation of cystine. (B) DTT oxydation reaction (C) 1.0 mM *L*-cysteine oxydation spectrum in the presence of 2 mM DTT (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1D  $^1\text{H}$  NMR spectrum). Reduced *L*-cysteine signals – red circles, oxydased *L*-cysteine signals – blue circles. Reduced DTT signals – green circles, oxydased DTT signals – yellow circles. (D) *L*-cysteine oxydation level depending on time in the presence of different reducing agents (10 mM Tris-Cl, pH 7.5 and 10 mM MES-Cl, pH 6.5.) (From FEBS3+ 2019 conference poster 31.)

### 3.4. AGR<sub>21-175</sub> un AGR<sub>41-175</sub> proteīnu KMR pētījumi

Tā kā AGR2 pirmās 20 aminoskābes ir signālu sekvenca un nobriedušajam proteīnam ir atšķelta [17], mēs izvēlējamies AGR<sub>21-175</sub> kā pirmo pētījuma objektu. AGR<sub>21-175</sub> teorētiskā molekulmasa ir 19.98 kDa. Literatūras dati [18] paredz, ka tam jāveido stabilo dimēru ar molekulmasu 39.96 kDa, kas pārsniedz šķidrums KMR proteīnu molmasas limitu. Rezultātā, AGR<sub>21-175</sub> proteīns izrādījās nepiemērots KMR pētījumiem. Uzņemti spektri ir ar zemu izšķiršanu, līdz ar to, ka proteīna masa 30 kDa ietekmē spektru, palielinot pīķu platumu, un to nevar kvalitatīvi salīdzināt ar literatūras datiem (15. attēls, A). Šis proteīns (neiezīmētā formā) tālāk bija nodots mūsu kolēģiem no Farmaceutiskās Farmakoloģijas laboratorijas aktivitātes testiem.



15. attēls. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  1H-15N-HSQC KMR spektri. (A)  $^{15}\text{N}$ -iezīmēta - AGR<sub>21-175</sub> proteīna spektrs. (B)  $^{15}\text{N}$ -iezīmēta - AGR<sub>41-175</sub> proteīna spektrs.

Figure 15. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  1H-15N-HSQC NMR spectra. (A) Spectrum of  $^{15}\text{N}$  labelled AGR<sub>21-175</sub> protein. (B) Spectrum of  $^{15}\text{N}$  labelled AGR<sub>41-175</sub> protein.

Ar mērķi uzlabot spektra kvalitāti, izveidots AGR<sub>241-175</sub> proteīna konstrukts. Pēc Patela (2009) datiem ir zināms, ka 21-40 AGR2 proteīna aminoskābju reģions ir nestrukturēts un neietekmē proteīna aktivitāti, bet iespējams atbild par šūnu adhēzijas uzlabošanu. Pie kam, šis fragments neietekmē CPHS aktīvo centru. AGR<sub>241-175</sub> spektri arī ir ar nepietiekamu kvalitāti (15. attēls. B). Šeit spektra izskatu arī ietekmē AGR2 proteīna spēja veidot homodimērus, līdz ar to proteīna masa spektra uzņemšanas laikā ir nevis 17.4 kDa (monomēra teorētiskā masa), bet 34.8 kDa.

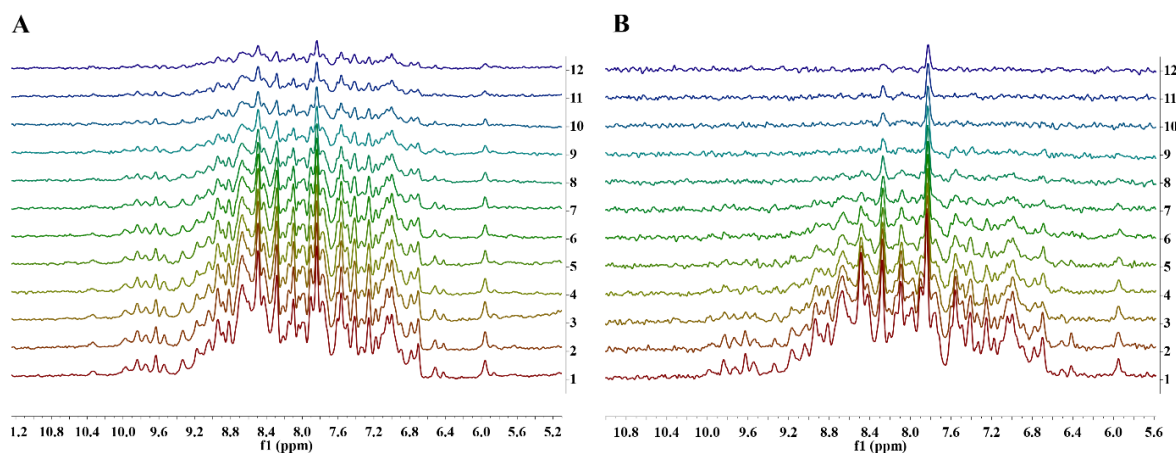
### 3.5. AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīna KMR pētījumi

#### 3.5.1. AGR<sub>241-175</sub>\_E60A Relaksācijas laika analīze

Lai pierādītu AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīna monomēro formu, proteīnam ar atšķeltu His-tag uzņemti  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -pseido 3D spektri  $^{15}\text{N}$   $T_1$  un  $T_2$  relaksācijas laika noteikšanai (16. attēls). Pēc spektru integrāļu analīzes, izmantojot vienādojumus (2) un (3) aprēķināti  $^{15}\text{N}$   $T_1$  un  $T_2$  relaksācijas laiki:  $T_1 = 718,42$  ms (17. attēls) un  $T_2 = 86,82$  ms (18. attēls).

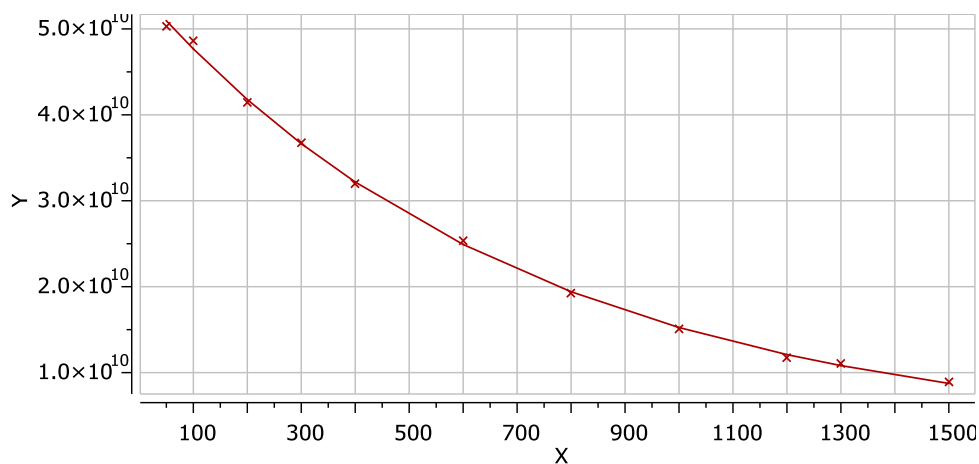
Tālāk iegūtas  $^{15}\text{N}$   $T_1$  un  $T_2$  vērtības tika izmantotas vienādojumā (4)  $\tau_c$  vērtības aprēķinam. Šeit  $\tau_c$  ir 8.6 ns. Pēc  $\tau_c$  atkarības no proteīnu masas grafika (pēc [www.nmr2.buffalo.edu/](http://www.nmr2.buffalo.edu/)) ir atrasta teorētiskā proteīnu molmasa, kas ir aptuveni 14.1 kDa (19. attēls).

Iegūtā teorētiskā masa 14.1 kDa ir tuva reālai  $^{15}\text{N}$  iezīmēta AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A masai (15.6 kDa) tas pierāda, ka AGR2<sub>41-175</sub> E60A šķīdumā ir monomērs.



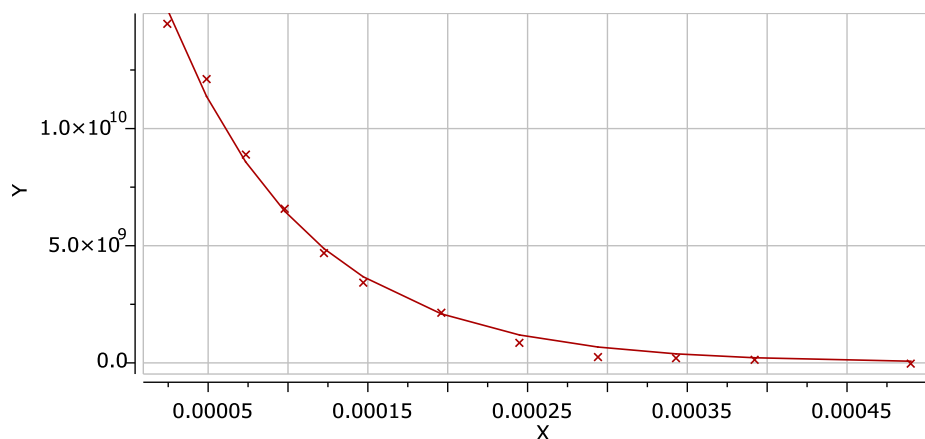
16. attēls. AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A proteīna ar atšķeltu His-tag KMR spektri T<sub>1</sub> un T<sub>2</sub> relaksācijas laiku atrašanai. **A.** Pulsa sekvenca *1H-15N-HSQCt1etf3gpsi3d* T<sub>1</sub> relaksācijas laika atrašanai. **B.** Pulsa sekvenca *1H-15N-HSQCt2etf3gpsi3d* T<sub>2</sub> relaksācijas laika atrašanai.

Figure 16. AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A with cleaved His-tag protein NMR spectrum for T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> relaxation time finding. **A.** Pulse sequence *1H-15N-HSQCt1etf3gpsi3d* for T<sub>1</sub> relaxation time. **B.** Pulse sequence *1H-15N-HSQCt2etf3gpsi3d* for T<sub>2</sub> relaxation time.



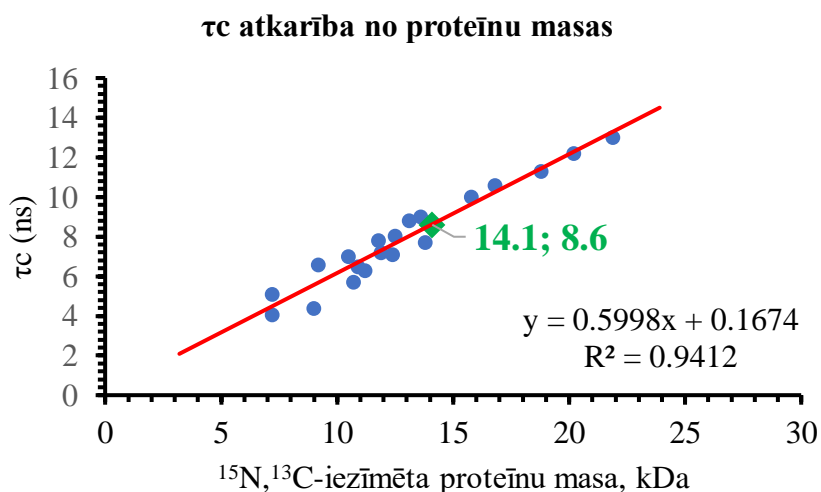
17. attēls. Grafiks T<sub>1</sub> relaksācijas laika aprēķināšanai. Integrāļi paņemti 10-8.5 ppm reģionā. Y – absolūtā integrāļa vērtība; X – mainīgā aizture.

Figure 17. Plot for T<sub>1</sub> relaxation time finding. Y – integrals of 10-8.5 ppm region. X variable delay.



18. attēls. Grafiks  $T_2$  relaksācijas laika aprēķināšanai. Integrāļi paņemti 10-8.5 ppm reģionā. Y – integrāļa vērtība; X – mainīgā aiztures atkārtošana.

Figure 18. Plot for  $T_2$  relaxation time finding. Y – integrals of 10-8.5 ppm region. X variable counter.

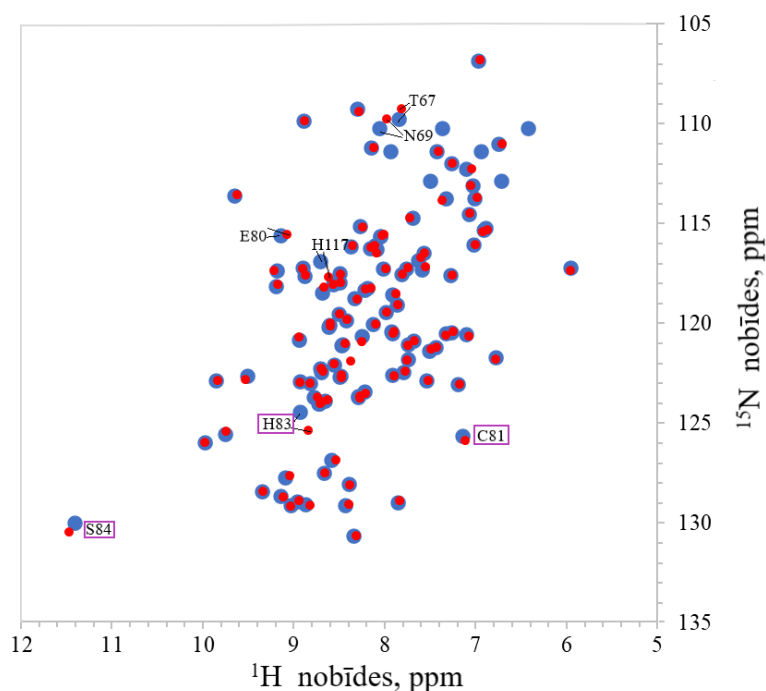


19. attēls.  $\tau_c$  atkarības no proteīnu masas grafiks (adoptēts no [www.nmr2.buffalo.edu/](http://www.nmr2.buffalo.edu/)). Ar sarkanu krāsu ir parādīta tendences līkne līnija. Ar ziliem aplīšiem apzīmēti dažādu proteīnu masas un  $\tau_c$  dati. Uz grafika ir parādīts trenda līnijas vienādojums un  $R^2$  vērtība. Ar zaļo rombiņu ir parādīti AGR2<sub>41-175</sub> E60A ar atšķelto His-tag dati.

Figure 19. Plot of  $\tau_c$  versus protein mass ([www.nmr2.buffalo.edu/](http://www.nmr2.buffalo.edu/)). Trendline is shown in red. Equation and  $R^2$  value are shown on plot. Blue circles – different protein data points. Green rhombus – AGR2<sub>41-175</sub> E60A with cleaved His-tag data point.

### 3.5.2. $^{15}\text{N}$ iezīmētā AGR2<sub>41-175</sub> E60A salīdzinājums ar literatūras datiem.

$^{15}\text{N}$  iezīmētam AGR2<sub>41-175</sub> E60A ar un bez His-tag ir uzņemti 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektri, kā arī 3D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-NOESY- $^{15}\text{N}$ -HSQC un [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-TOCSY- $^{15}\text{N}$ -HSQC spektri, lai adoptētu pamatķēdes asignēšanu un salīdzinātu mūsu iegūtos datus ar literatūras datiem. Rezultātā var redzēt, ka mūsu proteīna struktūra neatšķirās no publicētiem datiem, ko ieguva Patels (2009). Gan Patel (2009) pētījumā nebija atrasti visu aminoskābju signāli, gan arī mūsu iegūtajos spektros trūkst dažu pierādīto aminoskābju signālu (N34, Y76), tomēr spektri labi sakrīt (20. attēls).



20. attēls. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC KMR spektru simulācija uztaisīta *Excel* programmā. Ar ziliem punktiem ir apzīmēti AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna signāli, kas iegūti Patela pētījumā ([www.bmrb.wisc.edu](http://www.bmrb.wisc.edu)) (20 mM fosfāts (pH 6.0), 150 mM NaCl, 3 mM DTT, 0.3 – 1.2 mM proteīns), ar sarkaniem punktiem ir apzīmēti mūsu darbā iegūtie signāli (10 mM MES (pH 6.5), 50 mM NaCl, 4 mM DTT, 0.5 mM proteīns). Ar violetiem kvadrātiem apzīmēti signāli no aminoskābēm, kas atrodas aktīvajā centrā (C81; H83; S84), signālu no prolīna-82, kas arī atrodas aktīvajā centrā nevar redzēt 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC spektros. Zili signāli, kas nepārklājās ar sarkaniem un nav apzīmēti nāk no aminoskābes blakusķēdes un nebija ņemti vērā mūsu pētījumā.

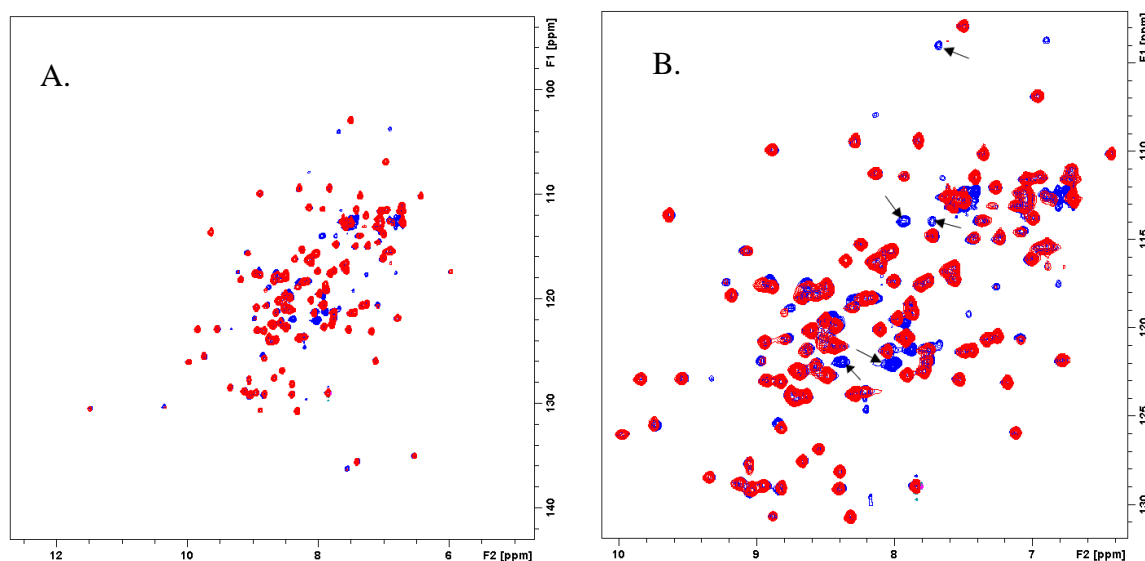
Figure 20. Simulation of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC NMR spectra was performed with *Excel* program. Blue dots indicate AGR2<sub>41-175</sub> E60A protein signals from the Patela study ([www.bmrb.wisc.edu](http://www.bmrb.wisc.edu)) (20 mM phosphate (pH 6.0), 150 mM NaCl, 3 mM DTT, 0.3 - 1.2 mM protein), with red dots indicate the signals obtained in our work (10 mM MES (pH 6.5), 50 mM NaCl, 4 mM DTT, 0.5 mM protein). Purple squares indicate signals from amino acids in the active site (C81; H83; S84), signals from proline-82, which are also in the active site, cannot be seen in the 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC spectra. Blue signals that did not overlap with red and were not labeled came from amino acid residues side chains and were not considered in our study.

Pārsvarā nobīžu atšķirības ir novērojamas aminoskābēm no aktīvā centra (C81; H83; S84) un blakus esošā (E80). Pamatojums tādai atšķirībai var būt buferu atšķirība un proteīnu dažāda oksidācijas pakāpe, jo tieši tioredoksīnam līdzīgs domēns ir visvairāk jūtīgs uz reducēšanas-oksidēšanas reakcijām.

### 3.5.3. $^{15}\text{N}$ iezīmētā AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna ar un bez His-tag salīdzinājums.

Lai pārbaudītu, ka His-tag stipri neietekmē pamatķēdes nobīdes un negatīvi neietekmē proteīna aktivitāti, bija uztaisīti divi AGR2<sub>41-175</sub> E60A: ar un bez His-tag. Abām proteīna versijām

bija uzņemti 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC spektri, un pēc tam salīdzinātas ķīmiskās nobīdes (21. attēls). Lielākoties spektri sakrīt, tomēr AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīnam ar His-tag parādās jauni signāli, kuri visdrīzāk atbilst N-gala His-tag vai TEV proteāzes šķelšanas aminoskābju sekvencei. Lai noteiktu, kādām aminoskābēm atbilst jaunie signāli, nepieciešams iegūt dubultiezīmētu  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīnu un tam uzņemt HNCA, HNCO un HN(CA)CO spektru komplektu pamatķēdes asinēšanai..



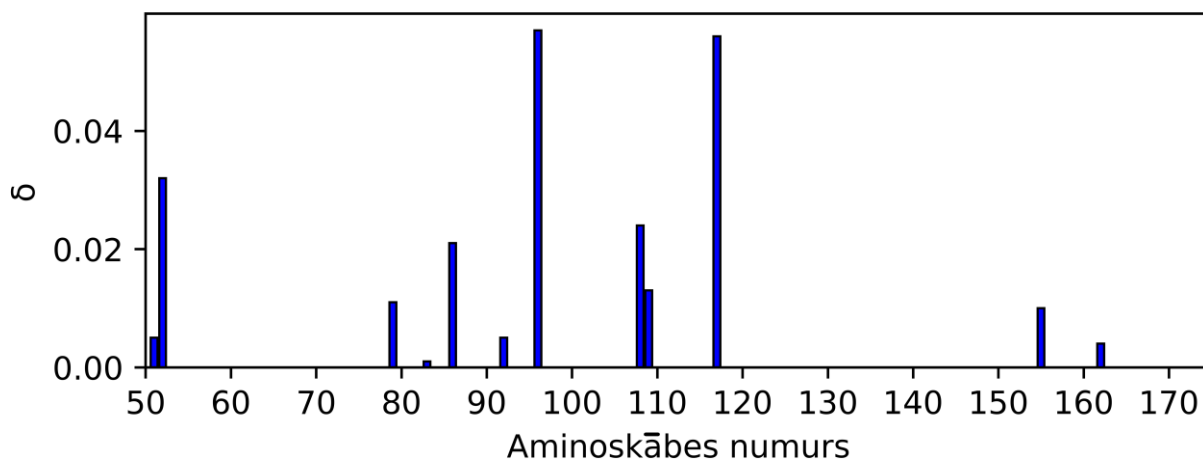
21. attēls.  $^{15}\text{N}$  iezīmētu AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīnu 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC KMR spektru salīdzinājums. Ar zilo krāsu ir apzīmēti AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna ar His-tag signāli. Ar sarkanu krāsu apzīmēti AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna bez His-tag signāli. (A) Pilnais spektrs. (B) Palielinātais spektrs. Ar melnām bultiņām apzīmēti signāli, kuru nav abos spektros.

Figure 21. Comparison of 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC NMR spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteins. The AGR2<sub>41-175</sub> E60A protein with His-tag signals marked in blue. AGR2<sub>41-175</sub> E60A protein without His-tag signals marked in red. (A) Full spectrum. (B) Zoomed spectrum. Signals that are not present in both spectra are indicated with black arrows.

Lai salīdzinātu nobīžu atšķirības AGR2<sub>41-175</sub> E60A ar un bez His-tag, ir veikta <sup>1</sup>H un <sup>15</sup>N ķīmisko nobīžu salīdzināšana pēc Williamsona (2013) [26] metodes ar *python 2.7*. skriptu un izveidots grafiks (22. attēls). Mēs novērojam, ka nobīžu atšķirības galvenokārt ir lādētām aminoskābēm (K95, K116) un polārām (Q51, Q85, N108) un arī trim liecinām (L78, L107, L161). Attēlā 23. ir parādīts, kur telpiski proteīna atrodas šīs aminoskābes.

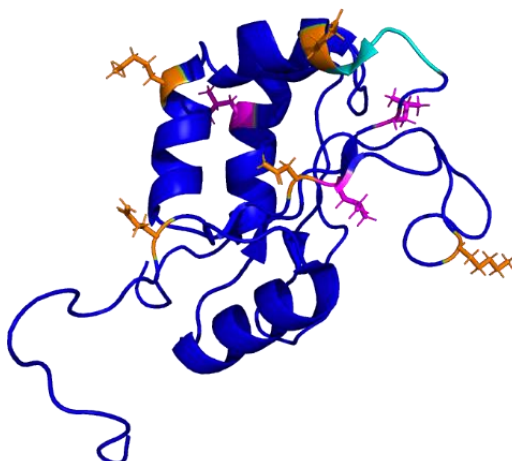
Lādēto un polāro aminoskābju nobīdes var izskaidrot ar iespējamo buferu pH neprecizitāti, tas ka atšķirīgi aminoskābju signāli atrodas pārsvarā uz proteīna virsmas, atbalsta šo teoriju. Pagaidām mums nav skaidrs, kas varēja stipri ietekmēt leicina ķīmiskas nobīdes izmaiņu. Iespējams, ka N-terminālā aminoskābju skevence ielocās tam blakus un izmaina apkārtējo vidi.

Tā kā izmaiņas spektrā ir minimālās, tālākie proteīna-liganda mijiedarbības pētījumi veikti izmantojot nešķelto proteīna versiju, jo TEV proteāzes šķelšana var negatīvi ietekmēt proteīna aktivitāti tādēļ, ka proteīns tiek 16 stundas inkubēts istabas temperatūrā. Par to arī liecina aktivitātes testi (šķeltā AGR2<sub>41-175</sub> E60A aktivitāte –  $30.6 \cdot 10^{-4}$  vien/mg/min, nešķeltā AGR2<sub>41-175</sub> E60A aktivitāte –  $61.5 \cdot 10^{-4}$  vien/mg/min pēc insulīna testiem)



22. attēls. <sup>1</sup>H un <sup>15</sup>N ķīmisko nobīžu salīdzinājuma grafiks AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A proteīniem ar un bez His-tag.

Figure 22. Plot of <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N chemical shift comparison for AGR241-175\_E60A proteins with and without His-tag.

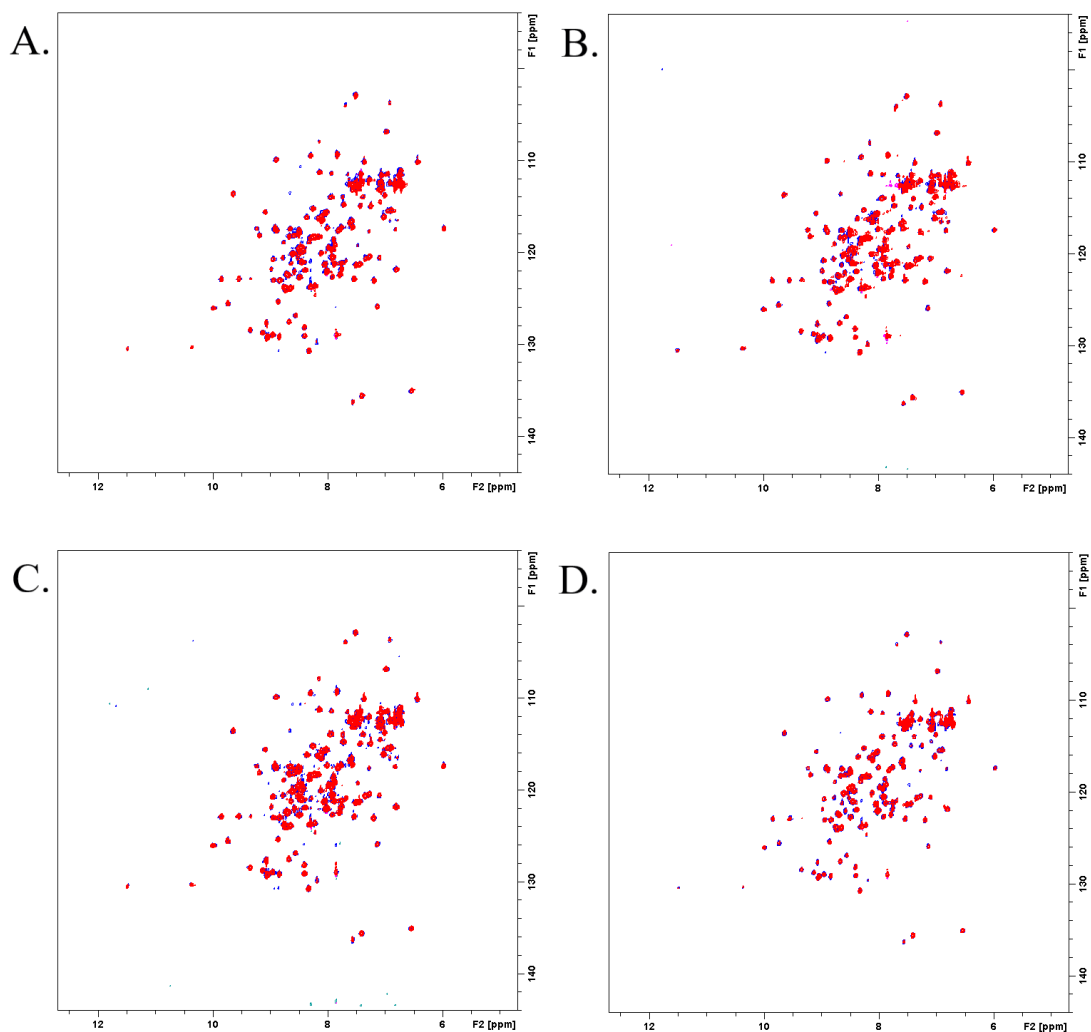


23. attēls. PyMOL simulēta (PDB ID 2LNT) AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīna struktūra ar atzīmētām aminoskābēm, kam tika novērota vislielākā atšķirība ķīmiskajās nobīdēs, salīdzinot proteīnu ar un bez His-tag. Ar oranžo krāsu atzīmētas polāras un lādētās aminoskābes, ar violeto krāsu atzīmēti leicīni, ar gaiši zilu krāsu apzīmēts aktīvais centrs.

Figure 23. The structure of the PyMOL simulated (PDB ID 2LNT) AGR<sub>241-175</sub> E60A protein with labeled amino acids, that had the largest difference in chemical shifts compared to the protein with and without His-tag. Polar and charged amino acids are marked in orange, leucines are marked in purple, and the active site is marked in cyan.

### 3.6. AGR<sub>241-175</sub> E60A mijiedarbība ar ligandiem

<sup>15</sup>N iezīmētam AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīnam ar His-tag ir uzņemti 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC spektri kopā ar Leakadīnu un aziridīn-2-karbonskābes N-sulfonil atvasinājumu (struktūra netiek radīta). Pēc spektru analīzes noskaidrots, ka Leakadīns, kas satur neaktivēto aziridīna ciklu, nereaģē ar AGR<sub>241-175</sub>\_E60A (12. attēls). Leakadīna pievienošana parakumā (līdz 4 ekvivalentiem) arī neizraisīja proteīna-liganda mijiedarbību (24. attēls, C). Paraugā inkubācija istabas temperatūrā uz 24 h (24. attēls, D) arī nesekmēja reakciju. Izskatās, ka pie pH 6.5 aziridīna cikla atvēršana ir palēnināta, ka arī Leakadīna elektrofilās īpašības ir vājas, lai izraisītu reakciju ar C81 kā nukleofilu.



24. attēls. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC spektri AGR2<sub>41-175</sub>\_E60A un Leakadīna testēšanai 10 mM MES (pH 6.5), 50 mM NaCl, 4 mM DTT buferī. Ar zilo krāsu apzīmēti signāli no proteīna apo formas, ar sarkano krāsu apzīmēti signāli proteīnam ar noteikto liganda koncentrāciju. (A), 0.6 mM proteīns, 0.3 mM Leakadīns 1:0.5; (B), 0.6 mM proteīns, 0.6 mM Leakadīns, 1:1; (C), 0.6 mM proteīns, 2.4 mM leakadīns, 1:4; (D), 0.6 mM proteīns, 2.4 mM Leakadīns, 1:4, pēc 24 stundu inkubācijas 23°C.

Figure 24. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC spectra for AGR2<sub>41-175</sub> E60A and leakadine testing. Blue indicates signals from leakadine-free protein, red indicates signals with a defined ligand concentration. (10 mM MES (pH 6.5), 50 mM NaCl, 4 mM DTT, 0.6 mM protein) (A), 0.6 mM protein, 0.3 mM Leakadine 1: 0.5; (B), 0.6 mM protein, 0.6 mM Leakadine, 1: 1; (C), 0.6 mM protein, 2.4 mM leakadine, 1: 4; (D), 0.6 mM protein, 2.4 mM Leakadine, 1: 4, after 24 hours incubation at 23 ° C.

Testos ar aktivēto aziridīn-2-karbonskābes N-sulfonil atvasinājumu (struktūra netiek rādīta) tika novērota proteīna-liganda mijiedarbība (25. attēls). Ir pamanīts, ka AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīna klātbūtnē ir palielinājusies šī savienojuma šķīdība, jo parasti ūdens šķīdumos tas izkrīt nogulsnēs pie 450  $\mu\text{M}$  koncentrācijas, tomēr ar AGR2<sub>41-175</sub> E60A proteīnu nogulsnes

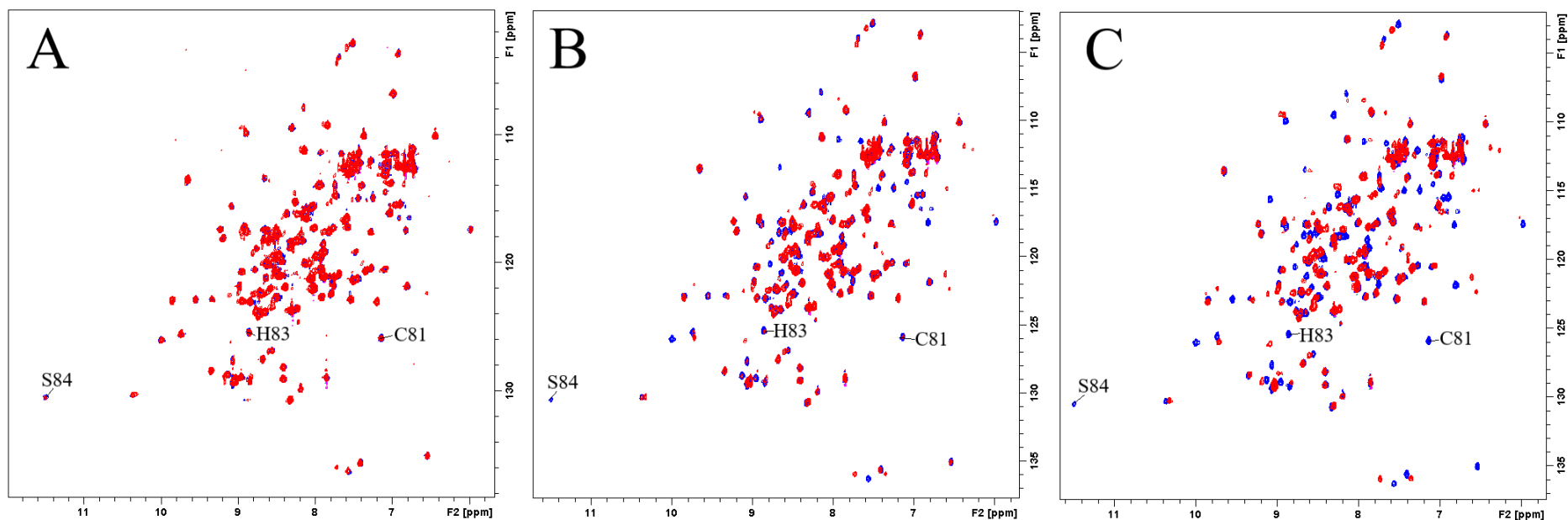
netika novērotas arī sasniedzot 640  $\mu\text{M}$  koncentrāciju. AGR<sub>241-175</sub> E60A reakcijā ar aziridīn-2-karbonskābes N-sulfonil atvasinājumu ir izmaiņas tika novērotas tikai sasniedzot proteīna-liganda attiecību 1:2 (25. attēls, B). Attiecībās 1:1 spektrs neatšķiras no apo-formas spektra (25. attēls, A). Kad proteīna-liganda attiecība bija 1:2, spektrā stipri samazinājās intensitāte trim signāliem (L169, L78, K88), kā arī četri signāli pazuda (E80, C81, H83, S84 – aktīvais centrs). Attēlā 28. var redzēt 3D AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīna modeli, kur attēloti, kam visvairāk izmainījās aminoskābju nobīdes, kad proteīna-liganda attiecība bija 1:2.

Titrojot proteīnu ar ligandu tālāk, spektrā novēro vēl vairāk izmaiņu (25. attēls, C, attiecība 1:3). Vēl vairāk signālu vai nu stipri pārbīdījās, vai arī izzuda no spektra. Tā kā parauga pH pēc titrēšanas izmainījās tikai par 0.3 un nogulšņu veidošanās nebija novērota, mēs uzskatām, ka notika papildus reakcija starp proteīnu un ligandu. Iespējams, ka proteīnā ir vēl viens aktīvais centrs, kas varētu veikt nukleofīlo aziridīna cikla atvēršanu. Taču tam, visticamāk, ir zemākā afinitāte nekā CPHS katalītiskai sekvencei. Lai apstiprinātu šo hipotēzi ir plānots uztaisīt dubultiezīmēto <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīnu, piesātināt to ar aktivēto aziridīn-2-karbonskābes atvasinājumu un asīgnēt pamatķēdi proteīna-liganda kompleksam.

Uz doto brīdi asīgnēto aminoskābju ķīmisko nobīžu starpība ir atspoguļota 26. (proteīna-liganda attiecība 1:2) un 27. (proteīna-liganda attiecība 1:3) attēlos.

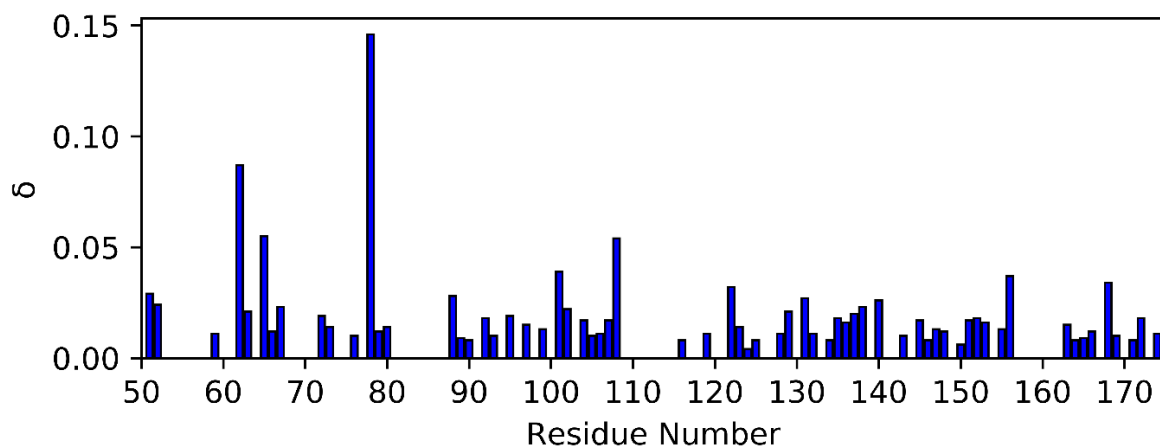
Lai novērstu iespējamību, ka novērojamās izmaiņas ir saistītas ar bufera pH maiņu, kā arī lai pārbaudītu vai ligands saistās pie proteīna kovalenti, pēc reakcijas tika uztaisīta proteīna-liganda kompleksa dialīze izmantojot membrānu ar 10 kDa poru izmēru. Spektrs pēc dialīzes neatšķiras no spektra pirms dialīzes, kas pierada liganda kovalento saistību. Turklāt, ņemot vērā ļoti stipras izmaiņas spektrā, iespējams ka proteīna ir divi aktīvie centri, kas saista ligandu kovalenti.

Tālākos pētījumos par AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīnu mijiedarbību ar ligandiem ir plānots notestēt vairākus aktivētus aziridīna atvasinājumus un izpētīt to saistības mehānismu.



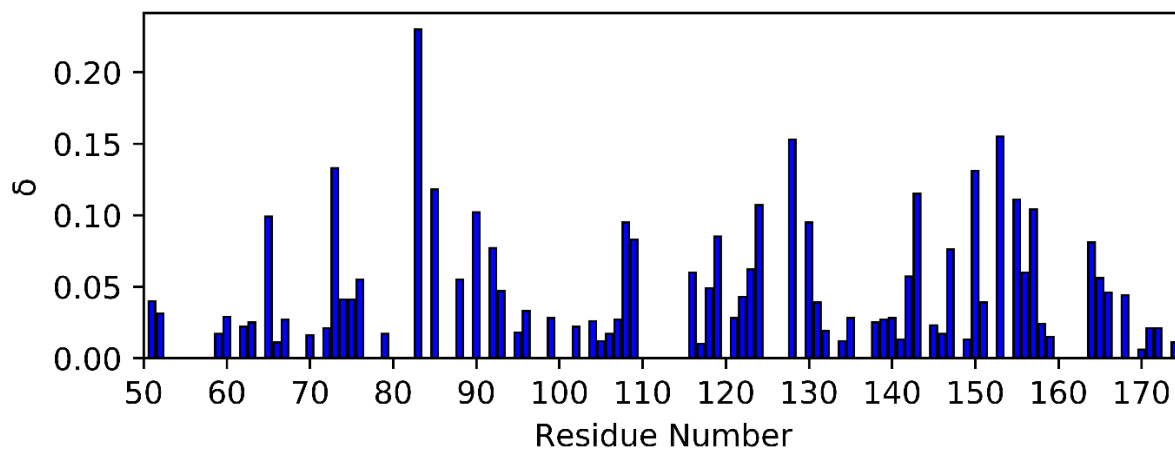
25. attēls. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC spektri AGR2<sub>41-175</sub> E60A un aziridīn-2-karbonskābes N-sulfonyl atvasinājuma testēšanai. Ar zilo krāsu apzīmēti signāli no proteīna apo formas, ar sarkano krāsu apzīmēti signāli proteīnam ar ligandu. (10 mM MES (pH 6.5), 50 mM NaCl, 4 mM DTT, 0.3 mM proteīns). (A) Proteīna un liganda koncentrāciju attiecība 1:1. (B) Proteīna un liganda koncentrāciju attiecība 1:2. (C) Proteīna un liganda koncentrāciju attiecība 1:3.

Figure 25. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of AGR2<sub>41-175</sub> E60A tests with aziridine-2-carboxylic acid N-sulfonyl derivative. Protein apo form – blue, protein after adding ligand – red (10 mM MES (pH 6.5), 50 mM NaCl, 4 mM DTT, 0.3 mM protein). (A) Protein to ligand concentration 1:1. (B) Protein to ligand concentration 1:2. (C) Protein to ligand concentration 1:3.



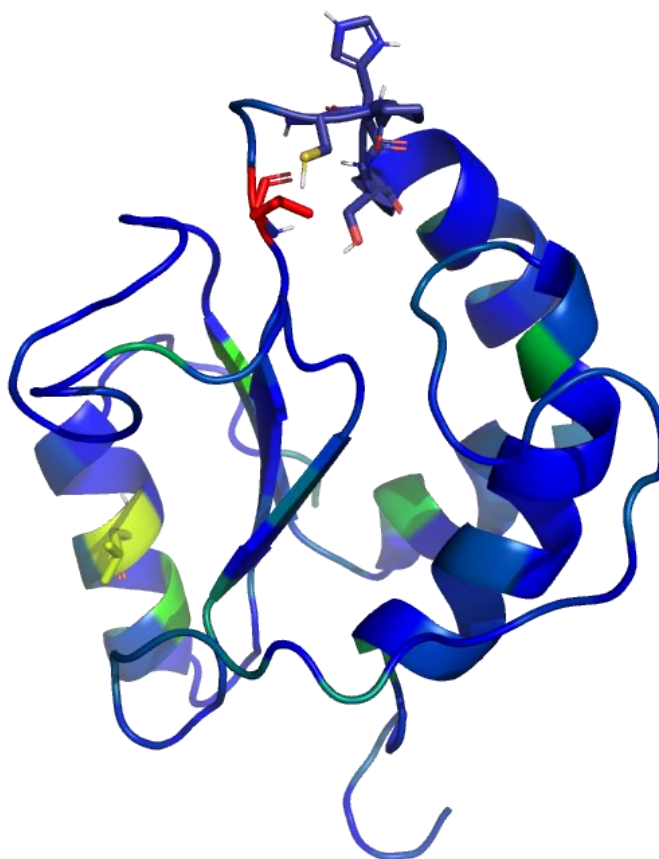
26. attēls. <sup>1</sup>H un <sup>15</sup>N ķīmisko nobīžu salīdzinājuma grafiks AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīnam pirms un pēc reakcijas ar aziridīn-2-karbonskābes N-sulfonil atvasinājumu attiecībās 1:2.

Figure 26. <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N chemical shifts comparison plot for AGR<sub>41-175</sub> E60A protein before and after the reaction with aziridine-2-carboxylic acid N-sulfonyl derivative at ratio 1:2.



27. attēls. <sup>1</sup>H un <sup>15</sup>N ķīmisko nobīžu salīdzinājuma grafiks AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīnam pirms un pēc reakcijas ar aziridīn-2-karbonskābes N-sulfonil atvasinājumu attiecībās 1:3.

Figure 27. <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N chemical shifts comparison plot for AGR<sub>41-175</sub> E60A protein before and after the reaction with aziridine-2-carboxylic acid N-sulfonyl derivative at ratio 1:3.



28. attēls. PyMOL simulēta (PDB ID 2LNT) AGR<sub>241-175</sub> E60A proteīna struktūra ar atzīmētām aminoskābēm (nūjiņas), kam tika novērota vislielākā atšķirība ķīmiskajās nobīdēs pēc 1:2 proteīna-liganda reakcijas. Krāsas temperatūra korelē ar nobīžu izmaiņu (sarkanā krāsa – vislielākās nobīdes izmaiņas, zilā krāsa - vismazākās).

Figure 28. PyMOL simulated (PDB ID 2LNT) AGR<sub>241-175</sub> E60A protein structure with labeled amino acids (sticks), for which the largest difference in shifts was observed after 1:2 protein-ligand reaction. Color temperature correlates with the change in shifts (red for the largest change in shifts, blue for the least).

## 4. SECINĀJUMI

1. Izstrādāts protokols AGR2<sub>21-175</sub>, AGR2<sub>41-175</sub> un AGR2<sub>41-175</sub> E60A iegūšanai no *E. Coli* šūnām aktīvā un stabilizētā formā.
2. AGR2 reducētās formas uzturēšanai vislabāk darbojas DTT vismaz divreizējā parakumā.
3. Atrasti optimālai apstākļi AGR2 proteīnu His-tag nošķelšanai ar TEV-proteāzi.
4. Iegūtas primārās zināšanas un iemaņas darbam ar KMR spektrometru.
5. His-tag minimāli ietekmē AGR2<sub>41-175</sub> E60A struktūru, un neietekmē tas aktivitāti.
6. Leakadīns, un, iespējams, citi lignadi ar neaktivēto aziridīna ciklu nevar būt AGR2 inhibitori.
7. Līgandi ar aktivēto aziridīna ciklu kovalenti piesaistās pie AGR2 aktīvā centra, visticamāk – caur nuklefila, C81, reakciju ar aziridīna ciklu.
8. DTT pārākums paraugā netraucē aziridīn-2-karbonskābes N-sulfonil atvasinājuma kovalentai reakcijai ar AGR2<sub>41-175</sub> E60A.

## 5. PATEICĪBA

Darba autors izsaka pateicību Latvijas Organiskas sintēzes institūta KMR laboratorijas vadītājam, Kristapam Jaudzemam, par iespēju izstrādāt bakalaura darbu viņa vadītajā laboratorijā, un Ivaram Kalviņam par iespēju līdzdarboties jauno pretvēža preparātu dizainā. Kā arī autors pateicas Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centram par plazmīdu sekvenēšanu un Latvijas Organiskas sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijai par aktivitātes testiem.

Autors pateicas FLPP-143 projektam “Izoformu selektīvi PDI inhibitori: dizains, sintēze un struktūras-aktivitātes likumsakarības” par finansiālo atbalstu.

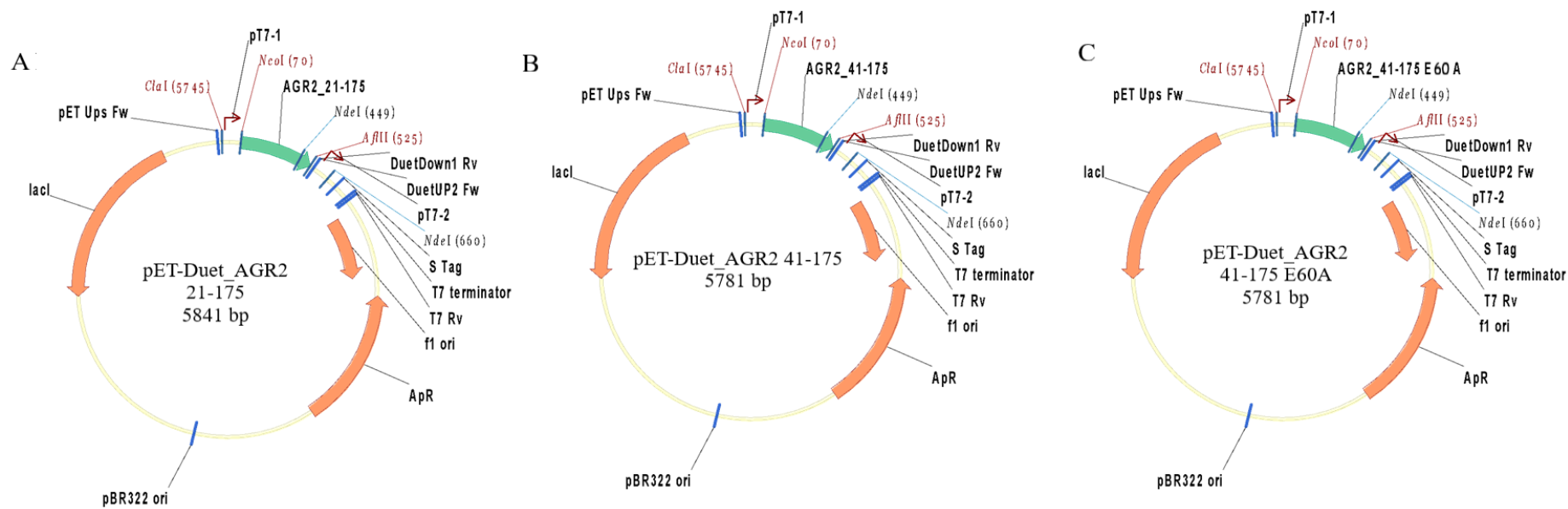
## 6. LITERATŪRAS SARAKSTS

- [1] B. Wilkinson and H. F. Gilbert, "Protein disulfide isomerase," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1699, no. 1–2, pp. 35–44, 2004.
- [2] K. J. Woycechowsky and R. T. Raines, "The CXC motif: A functional mimic of protein disulfide isomerase," *Biochemistry*, vol. 42, no. 18, pp. 5387–5394, 2003.
- [3] C.-C. Wang and C.-L. Tsou, "Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes," *FEBS Lett.*, vol. 425, no. 3, pp. 382–384, Apr. 1998.
- [4] S. Parakh and J. D. Atkin, "Novel roles for protein disulphide isomerase in disease states: A double edged sword?," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 3, no. MAY, pp. 1–11, 2015.
- [5] J. J. Galligan and D. R. Petersen, "The human protein disulfide isomerase gene family," *Hum. Genomics*, vol. 6, no. 1, 2012.
- [6] B. Roy and A. S. Lee, "The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex," *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 6, pp. 1437–1443, 1999.
- [7] J. A. Vekich, P. J. Belmont, D. J. Thuerauf, and C. C. Glembotski, "Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 53, no. 2, pp. 259–267, Aug. 2012.
- [8] S. Mkrtchian, C. Fang, U. Hellman, and M. Ingelman-Sundberg, "A stress-inducible rat liver endoplasmic reticulum protein, ERp29," *Eur. J. Biochem.*, vol. 251, no. 1–2, pp. 304–313, 1998.
- [9] D. W. Shin *et al.*, "A retrograde signal from calsequestrin for the regulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in skeletal muscle," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 5, pp. 3286–3292, 2003.
- [10] X.-M. Fu and B. T. Zhu, "Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDIp) is an intracellular estrogen-binding protein that modulates estrogen levels and actions in target cells," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 115, no. 1–2, pp. 20–29, May 2009.
- [11] D. A. Thompson and R. J. Weigel, "hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 251, no. 1, pp. 111–116, 1998.
- [12] F. Aberger, G. Weidinger, H. Grunz, and K. Richter, "Anterior specification of embryonic ectoderm: The role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2," *Mech. Dev.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 115–130, 1998.

- [13] K. W. E. Petek, C. Windpassinger, H. Egger, P.M. Kroisel, “Localization of the human anterior gradient-2 gene (AGR2) to chromosome band 7p21.3 by radiation hybrid mapping and fluorescence in situ hybridisation,” *Cytogenet. Cell Genet.*, vol. 89, no. 1–2, pp. 141–142, 2000.
- [14] С. С. Шишкин, Л. С. Еремина, Л. И. Ковалев, and М. А. Ковалева, “AGR2 , ERP57 / GRP 58 И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ПРОТЕИН-ДИСУЛЬФИДИЗОМЕРАЗЫ,” 2013.
- [15] S. Persson, M. Rosenquist, B. Knoblach, R. Khosravi-Far, M. Sommarin, and M. Michalak, “Diversity of the protein disulfide isomerase family: Identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family,” *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 36, no. 3, pp. 734–740, 2005.
- [16] S. W. Park *et al.*, “The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 17, pp. 6950–6955, 2009.
- [17] Z. Zhang and W. J. Henzel, “Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites,” *Protein Sci.*, vol. 13, no. 10, pp. 2819–2824, 2009.
- [18] P. Patel *et al.*, “Metastasis-promoting anterior gradient 2 protein has a dimeric thioredoxin fold structure and a role in cell adhesion,” *J. Mol. Biol.*, vol. 425, no. 5, pp. 929–943, 2013.
- [19] K. Chung *et al.*, “Serum AGR2 as an early diagnostic and postoperative prognostic biomarker of human lung adenocarcinoma,” *Cancer Biomarkers*, vol. 10, no. 2, pp. 101–107, 2011.
- [20] P. E. Bunney, A. N. Zink, A. A. Holm, C. J. Billington, and C. M. Kotz, “Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, Jul. 2017.
- [21] H. Bu *et al.*, “The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection,” *Prostate*, vol. 71, no. 6, pp. 575–587, 2011.
- [22] D. Sureshkumar, S. M. Koutha, and S. Chandrasekaran, “Chemistry of tetrathiomolybdate: Aziridine ring opening reactions and facile synthesis of interesting sulfur heterocycles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 37, pp. 12760–12761, 2005.
- [23] L. L. Chiang *et al.*, “Synthesis of canthardin sulfanilamides and their acid anhydride analogues via a ring-opening reaction of activated aziridines and their associated pharmacological effects,” *Molecules*, vol. 21, no. 1, 2016.
- [24] R. Aleksis, K. Jaudzems, J. Ivanova, R. Žalubovskis, I. Kalvinsh, and E. Liepinsh,

- “Reactivity of aziridine-2-carboxamide (leakadine) with nucleophiles in aqueous solutions,” *Chem. Heterocycl. Compd.*, vol. 49, no. 11, pp. 1589–1598, 2014.
- [25] G. Bodenhausen and D. J. Ruben, “Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 69, no. 1, pp. 185–189, 1980.
- [26] M. P. Williamson, “Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 73, pp. 1–16, 2013.
- [27] P. Luginbühl and K. Wüthrich, “Semi-classical nuclear spin relaxation theory revisited for use with biological macromolecules,” *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 40, no. 3, pp. 199–247, 2002.
- [28] D. Lankhorst, J. Schrieffer, and J. C. Leyte, “Determination of the Rotational Correlation Time of Water by Proton NMR Relaxation in H<sub>2</sub>O and Some Related Results,” *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie*, vol. 86, no. 3, pp. 215–221, 1982.
- [29] L. E. Kay, D. A. Torchia, and A. Bax, “Backbone Dynamics of Proteins As Studied by <sup>15</sup>N Inverse Detected Heteronuclear NMR Spectroscopy: Application to Staphylococcal Nuclease,” *Biochemistry*, vol. 28, no. 23, pp. 8972–8979, 1989.
- [30] N. A. Farrow *et al.*, “Backbone Dynamics of a Free and a Phosphopeptide-Complexed Src Homology 2 Domain Studied by <sup>15</sup>N NMR Relaxation,” *Biochemistry*, vol. 33, no. 19, pp. 5984–6003, 1994.
- [31] O. Edelheit, A. Hanukoglu, and I. Hanukoglu, “Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies,” *BMC Biotechnol.*, vol. 9, pp. 1–8, 2009.
- [32] F. Madeira *et al.*, “The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. W1, pp. W636–W641, 2019.
- [33] E. Gasteiger *et al.*, “The Proteomics Protocols Handbook,” *Proteomics Protoc. Handb.*, pp. 571–608, 2005.
- [34] I. F. Tannock and D. Rotin, “Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation,” *Cancer Res.*, vol. 49, no. 16, pp. 4373–4384, 1989.

# Pielikumi



1. attēls. pET-Duet-1\_AGR2<sub>21-175</sub> (A), pET-Duet-1\_AGR2<sub>41-175</sub> (B) un pET-Duet-1\_AGR2<sub>41-175</sub> E60A (C) vektoru kartes.

Figure 1. pET-Duet-1\_AGR2<sub>21-175</sub> (A), pET-Duet-1\_AGR2<sub>41-175</sub> (B) and pET-Duet-1\_AGR2<sub>41-175</sub> E60A (C) vector map

## Identificētie PDI/ER

Table 1.

## Identified PDIs/ERps

Valsts	Suga	Proteīns	Kods	Domēnu skaits	Domēna garums (amino-skābes)				ER-R
					Tx1	Tx2	Tx3	Tx4	
Protoctista	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Thioredoxin	AAA33258	1	99				
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	ERp5-like	AAO52262	1	106				KDEL
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	PDI-D	AAB86685	2	108	108			—
	<i>Giardia lamblia</i>	PDI1	AAD09365	1	108				—
	<i>Giardia lamblia</i>	PDI2	AAD09366	1	102				—
	<i>Giardia lamblia</i>	PDI3	EAA39666	1	102				—
	<i>Giardia lamblia</i>	PDI4	AAK27796	1	102				DKEL
	<i>Giardia lamblia</i>	PDI5	EAA37982	1	102				—
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Thioredoxin	NP_011725	1	104				
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MPD1	NP_014931	1					HDEL
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MPD2	NP_014553	1					HDEL
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Euglp	NP_010806	2	108	108			HDEL
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDI	NP_009887	2	106	107			HDEL
Viridiplantae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thioredoxin	NP_187483	1	112				
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ERp57a	NP_173594	2	106	106			KDEL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ERp57b	NP_177875	2	107	107			KDEL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PDIa	NP_191056	2	103	107			KDEL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PDIb	NP_1851234	2	107	107			KDEL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PDIc	NP_188232	2	107	107			KDEL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PDI d	NP_175636	2	107	107			KDEL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ERp5	NP_180851	2	104	105			KDEL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ERp5a	NP_171990	2	107	107			KDDL
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ERp5b	NP_182269	2	107	107			—
Metazoa	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Thioredoxin	NP_495626	1	104				
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERp18/19a	NP_496599	1	108				KKEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERp18/19b	NP_508381	1	105				KEEL

Valsts	Suga	Proteīns	Kods	Domēnu skaits	Domēna garums (aminoskābes)				ER-R
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERp44a	NP_501303	1	107				KSEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERp44b	NP_491589	1	107				KTEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERp57	NP_491995	2	106	106			KTEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	PDIA	NP_191056	2	107	107			HTEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	PDIB	NP_497746	2	105	105			HEEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERp5a	NP_499613	2	107	107			KTEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERp5b	NP_509190	2	107	107			KTEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERp72	NP_498775	3	101	105	107		KDEL
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ERdJ5	NP_493010	4	101	106	107	104	HDEL
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Thioredoxin	NP_572212	1	106				
	<i>Drosophila melanogaster</i>	ERp44a	NP_573111	1	107				KDEL
	<i>Drosophila melanogaster</i>	ERp44b	NP_649716	1	107				RDEL
	<i>Drosophila melanogaster</i>	ERp57	NP_725084	2	106	106			KTEL
	<i>Drosophila melanogaster</i>	PDI	NP_524079	2	105	105			KDEL
	<i>Drosophila melanogaster</i>	ERp5	NP_609792	2	105	108			KDEL
	<i>Drosophila melanogaster</i>	PDI-R	NP_609645	3	109	105	105		RTEL
	<i>Drosophila melanogaster</i>	ERp46	NP_572742	3	106	104	106		HDEL
	<i>Homo sapiens</i>	Thioredoxin	NP_003320	1	105				
	<i>Homo sapiens</i>	ERp18/19	NP_056997	1	107				EDEL
	<i>Homo sapiens</i>	HAG-2	NP_006399	1	103				KTEL
	<i>Homo sapiens</i>	HAG-3	NP_789783	1	104				QSEL
	<i>Homo sapiens</i>	ERp44	Q9BS26	1	103				RDEL
	<i>Homo sapiens</i>	ERp57	NP_005304	2	105	105			QEDL
	<i>Homo sapiens</i>	PDI	NP_000909	2	108	104			KDEL
	<i>Homo sapiens</i>	PDIP	NP_006840	2	106	106			KEEL
	<i>Homo sapiens</i>	ERp5	NP_005733	2	105	108			KDEL
	<i>Homo sapiens</i>	ERp72	NP_004902	3	105	105	107		KEEL
	<i>Homo sapiens</i>	PDI-R	NP_006801	3	108	106	107		KEEL
	<i>Homo sapiens</i>	ERp46	NP_110437	3	105	104	105		KDEL
	<i>Homo sapiens</i>	ERdJ5	NP_061854	4	103	100	106	103	KDEL

### 3. Pielikums

Proteīna sekvenca (ar sarkanu parādīts tioredoksīnam līdzīgs motīvs, ar dzelteni His-tag un ar zaļo TEV proteāzes šķelšanas saite):

```
      10      20      30      40      50      60
MAHHHHHHEM LYFQ|S PQTLS RGWGDQLIWT QTYEAALYKS KTSNKPLMII HHLDE CPHSQ
      70      80      90     100     110     120
ALKKVFAENK EIQKLAEQFV LLNLVYETTD KHLSPDGQYV PRIMFVDPSL TVRADITGRY
      130     140     150
SNRLYAYEPÄ DTALLLDNMK KALKLLKTEL
```

AGR<sub>41-175</sub> E60A parametri:

Molekulārā masa: 15623.01 kDa

Teorētiskais pI: 7.81

Ekstinkcijas koeficients: 21430

AGR<sub>41-175</sub> E60A ar His-tag parametri:

Molekulārā masa: 17442.99 kDa

Teorētiskais pI: 7.16

Ekstinkcijas koeficients: 22920

Clustal Omega AGR2<sub>41-175</sub>, AGR2<sub>41-175</sub> E60A un AGR2<sub>21-175</sub> salīdzinājums

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AGR2_uniprot      MEKIPVSAFLLLVALSYTLARDTTVKPGAKKDTKDSRPKLPQTLSRGWGDQLIWTQTYEE      60
E60A_cleaved     -----SPQTLSRGWGDQLIWTQTYEA      21
                  *****

AGR2_uniprot      ALYKSKTSNKPLMI IHHLDECPHSQALKKVFAENKEIQKLAEQFVLLNLVYETTDKHLSP      120
E60A_cleaved     ALYKSKTSNKPLMI IHHLDECPHSQALKKVFAENKEIQKLAEQFVLLNLVYETTDKHLSP      81
                  *****

AGR2_uniprot      DGQYVPRIMFVDPSLTVRADITGRYSNRLYAYEPADTALLLDNMKKALKLLKTEL      175
E60A_cleaved     DGQYVPRIMFVDPSLTVRADITGRYSNRLYAYEPADTALLLDNMKKALKLLKTEL      136
                  *****

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AGR2wt           MEKIPVSAFLLLVALSYTLARDTTVKPGAKKDTKDSRPKLPQTLSRGWGDQLIWTQTYEE      60
AGR2wt_21-175   -----RDTTVKPGAKKDTKDSRPKLPQTLSRGWGDQLIWTQTYEE      40
AGR2_41-175_E60A (2LNT) -----IDPFTPQTLSRGWGDQLIWTQTYEA      25
AGR2_41-175_E60A (our) -----SPQTLSRGWGDQLIWTQTYEA      21
                  *****

AGR2wt           ALYKSKTSNKPLMI IHHLDECPHSQALKKVFAENKEIQKLAEQFVLLNLVYETTDKHLSP      120
AGR2wt_21-175   ALYKSKTSNKPLMI IHHLDECPHSQALKKVFAENKEIQKLAEQFVLLNLVYETTDKHLSP      100
AGR2_41-175_E60A (2LNT) ALYKSKTSNKPLMI IHHLDECPHSQALKKVFAENKEIQKLAEQFVLLNLVYETTDKHLSP      85
AGR2_41-175_E60A (our) ALYKSKTSNKPLMI IHHLDECPHSQALKKVFAENKEIQKLAEQFVLLNLVYETTDKHLSP      81
                  *****

AGR2wt           DGQYVPRIMFVDPSLTVRADITGRYSNRLYAYEPADTALLLDNMKKALKLLKTEL      175
AGR2wt_21-175   DGQYVPRIMFVDPSLTVRADITGRYSNRLYAYEPADTALLLDNMKKALKLLKTEL      155
AGR2_41-175_E60A (2LNT) DGQYVPRIMFVDPSLTVRADITGRYSNRLYAYEPADTALLLDNMKKALKLLKTEL      140
AGR2_41-175_E60A (our) DGQYVPRIMFVDPSLTVRADITGRYSNRLYAYEPADTALLLDNMKKALKLLKTEL      136

```

Bakalaura darbs „Proteīndisulfidizomerāzes A17 izoformas strukturālie un funkcionālie pētījumi” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Sofija Matisone *paraksts* 04.06.2020.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: M. Sc. Diāna Zeļencova *paraksts* 04.06.2020.

Recenzents: *paraksts* M. Sc. Jēkabs Fridmanis

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 04.06.2020.

Lietvede: ..... *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr.           , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: