

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA



**Baktērijas *Borrelia burgdorferi* proteīna BBP28
strukturālie pētījumi**

Bakalaura darbs

Autors:

Jēkabs Fridmanis

Stud. apl. nr. jf14007

Darba vadītājs:

LOSI zinātniskais asistents, M. Sc. Mārtiņš Otiņš

Katedras vadītājs:

LU prof., BMC vad. pētn.,

Dr. biol. Kaspars Tārs

Recenzents:

LOSI zinātniskais asistents, M. Sc. Rihards Aleksis

RĪGA 2017

KOPSAVILKUMS

Laima slimība ir visizplatītākā ar vektoriem pārnēsātā slimība Amerikas Savienotajās Valstīs. Neraugoties uz tās plašo izplatību un smagajiem slimības simptomiem, pret to vēl aizvien nav pieejama vakcīna.

Darba mērķis bija ekspresēt Laima slimības izraisītājas, baktērijas (*Borrelia burgdorferi*), ar membrānu saistīto lipoproteīnu BBP28 un noteikt tā struktūru.

Izmantojot KMR datus, tika aprēķinātas divas BBP28 proteīna struktūras - viena pilna garuma un otra saīsinātai proteīna sekvencei, kas nesatur nestrukturēto 27 aa garo N gala segmentu. Strukturēto BBP28 daļu veido piecas α -spirāles un 14 aa gara virkne C-galā, kas kovalenti piesaistīta ar disulfīda saiti pie 4. un 5. α -spirāli savienojošās cilpas.

Izmantojot MALDI-TOF masspektrometriju, tika noteikts, ka BBP28 varētu veidot nekovalenti saistītus oligomērus, tomēr KMR T_1 un T_2 relaksācijas laika mērījumi pierādīja, ka šķīdumā BBP28 atrodas monomēra formā.

Darbs tika izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā no 2015. gada aprīļa līdz 2017. gada jūnijam.

Atslēgas vārdi: BBP28, *Borrelia burgdorferi*, Laima slimība, kodolu magnētiskā rezonanse, MALDI-TOF masspektrometrija.

SUMMARY

Lyme disease is the most widespread vector transmitted disease in United States of America. Despite its prevalence, a Lyme disease vaccine is not available yet.

The aim of bachelor's thesis is to produce Lyme disease causing bacteria (*Borrelia burgdorferi*) outer membrane lipoprotein BBP28, and determine its structure.

During the research two structures of BBP28 protein were determined using NMR data - one for full length BBP28 sequence, and the other for truncated version of BBP28, lacking the unstructured N-terminal segment consisting of 27 amino acids. Structured part of BBP28 consists of 5 α -helices and a 14 amino acid long C-terminal strand, covalently attached to a loop connecting helices 4 and 5.

MALDI-TOF analysis indicated that BBP28 could form oligomers via non-covalent interactions. Nonetheless, NMR T_1 and T_2 relaxation time measurements showed that in solution BBP28 is in monomeric state.

Research was carried out in Latvian Institute of Organic Synthesis, from April 2015 to June 2017.

Key words: BBP28, *Borrelia burgdorferi*, nuclear magnetic resonance, MALDI-TOF massspectrometry.

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

2D – divu dimensiju

3D – trīs dimensiju

aa – aminoskābe

nt - nukleotīds

B. burgdorferi - *Borrelia burgdorferi*

DTT – ditiotreitols

Da – daltons

E.coli – *Escherichia coli*

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe

HSQC - heterokodola viena kvanta koherence

IPTG – izopropil β-D-1 tiogalaktopiranozīds (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*)

KMR – kodolu magnētiskā rezonanse

LB – lītiskā barotne (*lysogenic broth*)

MALDI - matriksa asistētā lāzera desorbciija/ionizācija

NOE – kodolu Overhauzera efekts

OD_x - optiskais blīvums pie x nm

SDS-PAGE – nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gela elektroforeze (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SOC - *Super Optimal Broth* ar katabolītu represiju

TEV – tabakas gravējuma vīruss (*tobacco etch virus*)

TFA - trifloretiķskābe

TOF - lidojuma laiks (*Time-Of-Flight*)

Tris – 2-Amino-2-hidroksimetil-propān-1,3-diols

xg – gravitācijas vienības

Å – angstrēms

τ_c- rotācijas korelācijas laiks

mL – mililitrs

μL – mikrolitrs

mg – miligrams

g – grams

s – sekundes

mm – milimetrs

min - minūte

DMC – dialīzes membrānas kambaris

PDB – Proteīnu datu banka

BBP28(50-148) – BBP28 proteīna daļa no 50. līdz 148. aa, ar četrām papildus aa (glicīns, metionīns, alanīns un glicīns), tās N galā.

BBP28(23-148) – BBP28 proteīna daļa no 23. līdz 148. aa, ar četrām papildus aa (glicīns, metionīns, alanīns un glicīns), tās N galā.

His₆-TEV-BBP28(23-148) –BBP28 proteīna daļa no 23. līdz 148. aa ar sešiem histidīniem un TEV proteāzes šķelšanas sekvenci tās N galā.

SATURA RĀDĪTĀJS

1	levads	8
2	LiteratūrasApskats	9
2.1	<i>Laima slimības simptomi.....</i>	<i>9</i>
2.2	<i>Izplatītākie Laima slimības izraisītāji</i>	<i>10</i>
2.3	<i>Inficēšanās arBorrelia baktēriju</i>	<i>10</i>
2.4	<i>Laima slimības izplatība.....</i>	<i>10</i>
2.5	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>11</i>
2.6	<i>B. burgdorferigenoms un molekulārā ģenētika</i>	<i>11</i>
2.7	<i>B.Burgdorferivirsmas proteīni.....</i>	<i>12</i>
2.8	<i>B. burgdorferi dzīves cikls</i>	<i>13</i>
2.9	<i>Vakcīnas pret Laima slimību</i>	<i>14</i>
2.10	<i>B. Burgdorferi virsmas proteīns BBP28</i>	<i>15</i>
3	Materiāli un metodes.....	17
3.1	<i>Materiāli:</i>	<i>17</i>
3.1.1	<i>Baktēriju celmi un plazmīdas.....</i>	<i>17</i>
3.1.2	<i>Laboratorijā izmantotā aparatūra, iegādes vieta un ražotājvalsts</i>	<i>17</i>
3.1.3	<i>Izmantotā programmatūra, serveri un to izmantošanas mērķi</i>	<i>18</i>
3.1.4	<i>Izmantotās vielas un to iegādes vieta un ražotājs valsts.....</i>	<i>18</i>
3.1.5	<i>Izmantotie materiāli, to iegādes vieta un ražotājvalsts.....</i>	<i>20</i>
3.1.6	<i>Barotņu sagatavošana</i>	<i>21</i>
3.1.7	<i>Buferu sastāvs</i>	<i>23</i>
3.2	<i>Metodes:.....</i>	<i>25</i>
3.2.1	<i>Plazmīdu transformācija E.coli baktērijās ar Heat Shock metodi</i>	<i>25</i>
3.2.2	<i>Starta kultūra.....</i>	<i>25</i>
3.2.3	<i>Proteīna ekspresija</i>	<i>26</i>
3.2.4	<i>Niķeļa afinitātes hromatogrāfija.....</i>	<i>26</i>
3.2.5	<i>Proteīnu SDS-PAGE gela elektroforēze.....</i>	<i>27</i>
3.2.6	<i>Proteīna šķelšana ar TEV proteāzi</i>	<i>28</i>
3.2.7	<i>His-trap hromatogrāfija pēc proteīna šķelšanas ar proteāzi</i>	<i>28</i>
3.2.8	<i>Gelfiltrācijas hromatogrāfija.....</i>	<i>29</i>
3.2.9	<i>Kompetentu E.coli šūnu izveide ar RbCl metodi.....</i>	<i>30</i>
3.2.10	<i>Plazmīdu PCR.....</i>	<i>31</i>

3.2.11	Plazmīdu un PCR produktu šķelšana ar <i>NcoI</i> un <i>XhoI</i> <i>FastDigest</i> endonukleāzēm	31
3.2.12	DNS elektroforēze agarozes gelā	32
3.2.13	DNS izdalīšana no gela ar GenJET™ Gel Extraction Kit	32
3.2.14	DNS fragmentu ligēšana	33
3.2.15	Plazmīdu DNS izdalīšana no <i>E.Coli</i> baktērijām ar GenGET™ Plasmid Miniprep kit.....	33
3.2.16	DNS sekvencēšana.....	34
3.2.17	12.5 % Proteīnu SDS gela sagatavošana.....	35
3.2.18	Proteīnu kristalizēšana ar sēdošā piliena metodi.....	36
3.2.19	MALDI-TOF MS	36
3.2.20	Kodolu magnētiskā rezonanses vairākdimensiju eksperimenti	38
4	Rezultāti Un Diskusija	39
4.1	<i>BBP28</i> ekspresija un attīrīšana	39
4.2	<i>BBP28(23-148)</i>	41
4.2.1	<i>BBP28(23-148)</i> piemērotības izvērtēšana struktūras noteikšanai ar KMR.....	41
4.2.2	<i>BBP28(23-148)</i> stabilitātes pētījumi.....	42
4.2.3	Reducēta <i>BBP28(23-148)</i> otrējo ķīmisko nobīžu analīze.....	44
4.2.4	Oksidēta <i>BBP28(23-148)</i> strukturālie pētījumi.....	45
4.3	<i>His₆-TEV-BBP28(23-148)</i>	46
4.3.1	Otrējo ķīmisko nobīžu analīze.	46
4.3.2	<i>His₆-TEV-BBP28(23-148)</i> struktūras aprēķins	46
4.4	<i>BBP28(50-148)</i>	47
4.4.1	Vektora izveide.....	47
4.4.2	<i>BBP28(50-148)</i> kristalizācija	48
4.4.3	<i>BBP28(50-148)</i> struktūras noteikšana, izmantojot KMR	48
4.4.4	<i>BBP28</i> salīdzinājums ar citiem proteīniem	54
5	Secinājumi	56
6	Pateicības.....	57
7	Izmantotā literatūra.....	58

1 IEVADS

Laima slimība ir visizplatītākā ar vektoriem pārnēsātā slimība Amerikas Savienotajās Valstīs (Shapiro, 2014). Ik gadu Ziemeļamerikā to diagnosticē apmēram 15 500, bet Eiropā – 65 500 cilvēku (Hubalek, 2009). Līdz ar tās plašo izplatību un izraisītajiem daudzveidīgajiem akūtajiem simptomiem, kā artrīts, kardīts, meningīts, paralīze un citas neiroloģiskas problēmas, zinātnieki pret šo slimību cenšas izveidot vakcīnu (Pinto, 2002). Līdz šim tikai vienai kompānijai ir izdevies izveidot vakcīnu (LYMERix), kas bija pieejama tirgū 1998. gadā, bet tās izplatīšana tika pārtraukta jau pēc četriem gadiem (Willyard, 2014).

Bakalaura darba mērķis bija noteikt Laima slimības izraisītājas borēlijas (*Borrelia burgdorferi*) ārējās membrānas lipoproteīna BBP28 struktūru. Lai sasniegtu šo mērķi tika izvirzīti sekojoši darba uzdevumi:

- Noklonēt un ekspresēt potenciālo vakcīnas kandidātu - *Borrelia* ģints baktērijas virsmas lipoproteīnu BBP28, izmantojot *E.coli* proteīnu ekspresijas sistēmu;
- Uzņemt un analizēt nepieciešamos KMR spektrus BBP28 struktūras noteikšanai;
- No iegūtajiem KMR datiem aprēķināt BBP28 struktūru;
- Kristalizēt BBP28(50-148);
- No iegūtajiem kristāliem savākt rentgena difrakcijas datus un aprēķināt BBP28(50-148) struktūru.

2 LITERATŪRAS APSKATS

2.1 Laima slimības simptomi

Simptomus Laima slimībai parasti iedala trīs grupās pēc slimības attīstības stadijas. Pirmajā grupā ietilpst agrie lokalizētie simptomi. Tie parādās septiņas līdz 14 dienas, retāk, trīs līdz 30 dienas pēc ērces koduma. Vispamanāmākā pazīme, kura bieži ir vienīgais iemesls kāpēc Laima slimība tiek diagnosticēta agrīnā stadijā, ir eritēma migrans (Bratton et al., 2008).

Eritēma migrans ir ādas apsārtums, kas aptuveni 80% Laima slimnieku parādās ērces koduma vietā. Tā diametrs vidēji sasniedz 15 cm, bet ir konstatēti gadījumi, kad tas ir tikai 5 cm. Apsārtums parasti nav sāpīgs, bet var būt siltāks par apkārtējo ādu. Bieži tā centrālā daļa paliek tumši sarkana, biezāka un stingrāka salīdzinot ar apkārtējo daļu, kas ir gaiši sarkanā krāsā. Dažkārt daļa starp apsārtuma apkārtni un centru atgūst dabīgo ādas krāsu, un eritēma migrans sāk atgādināt vēršaci. Centrālā apsārtuma zona var kļūt ekhimotiska, kā rezultātā šajā vietā var veidoties nekroze (Bratton et al., 2008).

Pie agrīnajām pazīmēm pieskaita arī drudzi, drebuļus, miaļģiju, nogurumu un galvas sāpes, kas var parādīties pāris dienas pirms apsārtuma (Bratton et al., 2008).

Otrā grupa ir izplatīšanās simptomi. Parasti tie parādās no pāris dienām līdz nedēļām pēc ērces koduma. Pie simptomiem pieder vairāki (otrējie) eritēma migrani. Var arī parādīties muskoskeletāli, neiroloģiski un kardio-vaskulāri traucējumi (Pinto, 2002).

Muskoskeletāli simptomi parādās aptuveni 60% Laima slimnieku. Pie tiem pieder klejotāj–locītavu vai muskuļu sāpes ar vai bez uzpampuma (Pinto, 2002).

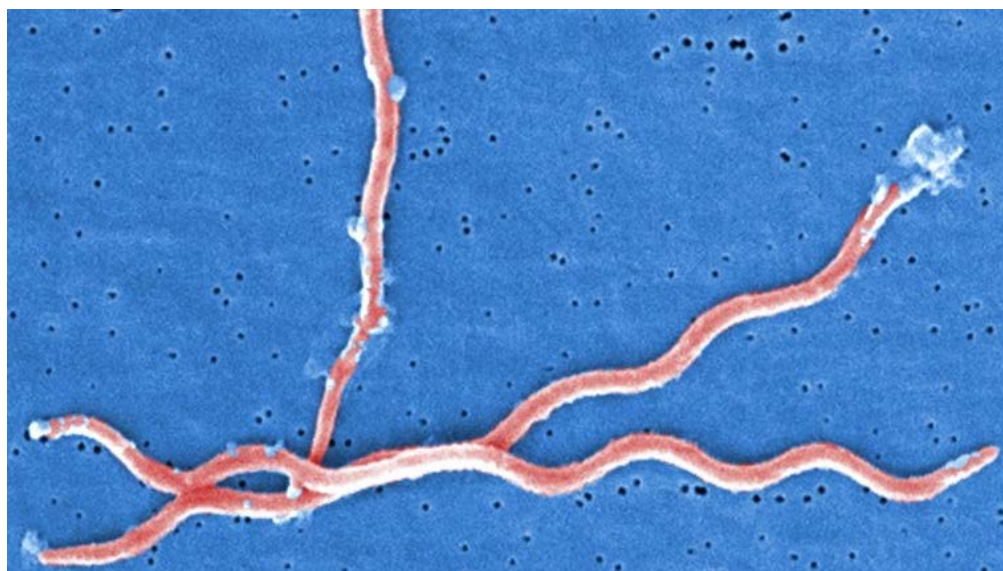
Neiroloģiskas problēmas, kas parādās aptuveni 15% inficēto, ir meningīts un sejas galvas nervu paralīze (Pinto, 2002).

Retāk sastopami ir kardiovaskulāri simptomi (aptuveni 8% slimnieku). Pie tiem pieskaita dažāda apmēra īslaicīgus atrio-ventrikulāros aizsērējumus (Pinto, 2002).

Trešajā grupā ir vēlīnās izplatīšanās simptomi. Tie parādās aptuveni 60% neārstētu Laima slimnieku (Steere, 1989). Pie šīs grupas simptomiem pieskaita intermitējošas sāpes un uzpampums vienā vai vairākās locītavās, visbiežāk ceļos vai gurnos. Retos gadījumos izveidojas hroniska polineuropātija vai encefalopātija, kas izraisa bezmiegu, nogurumu, grūtības koncentrēties un, dažos gadījumos, personības izmaiņas. Ja Laima slimība netiek ārstēta, pacientam var attīstīties būtiska invaliditāte. Retos gadījumos Laima slimība var būt arī letāla (Bratton et al., 2008).

2.2 Izplatītākie Laima slimības izraisītāji

Eiropā un Āzijā trīs *Borrelia* baktēriju sugas ir atbildīgas par lielāko daļu no Laima slimības gadījumiem - *B. burgdorferi sensu strictu* (s.s.), *B. garinii* un *B. afzelii*, kuras visas kopā sauc par *B. Burgdorferi sensu lato*. Amerikā Laima slimību izraisa viena suga - *B. burgdorferi* s.s. (skat. 1. att.) (Baranton et al., 1992). Klīniski visas trīs baktēriju sugas izraisa Laima slimību tikai ar dažiem vienādiem simptomiem, kā eritēma migrāna un gripai līdzīgiem simptomiem. Citi simptomi dažēji korelē ar slimības izraisošo baktēriju. Artrīts bieži ir sastopams cilvēkiem, kuriem Laima slimību izraisīja *B. burgdorferi sensu strictu*. Neuroloģiski simptomi parādās lielākoties cilvēkiem, kuri ir inficēti ar *B. garinii*, bet ādas problēmas ir tiem, kuri ir inficēti ar *B. afzelii*. Lai gan ir zināma korelācija starp slimības izraisošo baktēriju un slimības simptomiem, šī korelācija nav pilnīga – jebkura no sugām var izraisīt arī citai sugai raksturīgos simptomus (van Dam et al., 1993).



1. attēls. *Borrelia burgdorferi* (attēls uzņemts ar skenējošo elektronmikroskopu) (<http://www.bacteriainphotos.com/Borrelia%20burgdorferi%20electron%20microscopy.html>).

Figure 1. *Borrelia burgdorferi* (picture acquired with scanning electron microscope) (<http://www.bacteriainphotos.com/Borrelia%20burgdorferi%20electron%20microscopy.html>).

2.3 Inficēšanās ar *Borrelia* baktēriju

Borēlijas ģints baktēriju pārnese vektors uz cilvēka organismu ir *Ixodes* ģints ērces. Parasti ērci ir jābūt piesūkušai pie cilvēka 36 līdz 48 h, bet minimālais laiks var būt arī 24 h, pirms baktērijas var izplatīties uz jauno saimniekorganismu (Bratton et al., 2008).

Slimība nevar tikt iegūta no cita cilvēka, dzīvniekiem vai ar pārtiku (Bratton et al., 2008).

2.4 Laima slimības izplatība

Laima slimība ir ziemeļu puslodē visbiežāk sastopamā ar vektoru pārnēsājamā slimība. Tai ik gadu Eiropā tiek konstatēti aptuveni 65 500 slimības gadījumu. Patiesais Laima slimnieku

skaitis varētu būt arī daudz lielāks, jo daudzi Laima slimības gadījumi netiek diagnosticēti. ASV ik gadu tiek reģistrēti starp 15 500 slimības gadījumu (Hubalek, 2009).

2.5 *Borrelia burgdorferi*

Spirohēta *Borrelia burgdorferi* ir obligāts parazīts, kas pārvietojas no zīdītāja uz zīdītāju caur ērces vektoru. Tā bieži ir sastopama daudzos mazos dzīvniekos, kuri, atšķirībā no cilvēkiem, neslimo ar Laima slimību. Cilvēku saslimšanu izraisa to imunofizioloģiskā atbilde uz *B. burgdorferi*. Citiem slimību izraisītājiem lielāku ieguldījumu to infektivitātē dod virulences faktori, bet *B. burgdorferi* infektivitāti pastiprina tās faktori, kas ļauj dalīties un izdzīvot (Tilly et al., 2008). Lai šo teoriju apstiprinātu tika nosekvencēts tipiska baktēriju celma genoms, B31, no kā atklāja, ka šīm baktērijām trūkst vairāki, citām patogēnajām baktērijām raksturīgi faktori - liposaharīdi, toksīni un specializētas sekrēcijas sistēmas (Casjens et al., 2000).

2.6 *B. burgdorferi* genoms un molekulārā ģenētika

Lai gan ģenētiskās atšķirības starp *Borrelia* sugām, kas tām liek izraisīt dažādus simptomus, nav identificētas, ir nosekvencēti trīs *B. Burgdorferi* sugu genomi (Fraser et al., 1998, Glockner et al., 2004, Glockner et al., 2006). Šiem genomiem ir vairākas kopējas pazīmes, piemēram, visiem ir viena lineāra hromosoma un daudzas mazākas DNS molekulas (plazmīdas) no kurām dažas ir lineāras, bet citas – cirkulāras. DNS, kas sastāv no vienas lineāras hromosomas un daudzām mazām plazmīdām ir visai neparasta parādība baktēriju vidū (Tilly et al., 2008).

Neskatoties uz to, ka *B. burgdorferi* esošā hromosoma ir reti sastopama citu baktēriju vidū, lielākā daļa tajā esošo gēnu ir bieži atrodami citu baktēriju genomos. Turpretī gēni, kas ir iekodēti plazmīdās, ir mazāk atpazīstami, un lielākā daļa no tiem ir atrasti tikai *Borrelia* ģints pārstāvjos (Tilly et al., 2008). Ir pierādīts, ka daudzi no plazmīdās esošajiem gēniem ir vajadzīgi, lai baktērija būtu infekcioza, vai spētu izdzīvot ērces un zīdītāju organismos (Fraser et al., 1997).

Salīdzinot visus trīs nosekvencētos genomus, tiem tika atrasti vairāki kopīgi gēni. Daudziem no gēniem ir novērojamas sekvenses variācijas starpsugu un sugas ietvaros. Gēni, kuri ir nepieciešami infektivitātei vai izturībai mugurkaulniekos (kā *ospC* un *vlsE*), var ārkārtīgi atšķirties nt un aa sekvencē. Šī mainība minētajos gēnos sarežģī efektīvu vakcīnu izveidi, kas būtu balstīta uz šiem proteīniem (Tilly et al., 2008).

B. burgdorferi genoma sekvenses analīzes rezultātā tika noskaidrots, ka vairāk kā 6% no hromosomas gēniem ir saistīti ar baktēriju kustību un hemotaksi (Fraser et al., 1997). Atšķirībā no citiem viēnsūņiem ar ārējo flagellu, spirohētas flagella, kas ir paralēla tās šūnas ķermenim, atrodas zem ārējās membrānas. Šāds ļoti konservatīvās un imunogēnās flagellas novietojums

palīdz spirohetām to pasargāt no saimniekorganisma imūnreakcijas. Spirohētu morfolģija un kustģgums ļauj tām peldēt ļoti viskozā vidē, kurā citas baktģrijas nespģj pakustģties. Tādā veidā spirohetu patogģnās sugas spģj tikt cauri saimniekorganisma audiem (Kimsey and Spielman, 1990).

Atšķirģbā no brģvi dzģvojošajām baktģrijām, *B. burgdorferi* genoms ir relatģvi mazs. Tas droģi vien ir izskaidrojams ar to, ka *B. burgdorferi* ir obligāti patogģns organisms. Tās genomā nav iekodģtas sekvenģes, lai producģtu viegli atpazģstamu maģinģriju aa, nt, taukskābju un enzģmu kofaktoru sintģzei. Dzģvģbai nepiecieģamās sastāvdaļas tā iegģst no saimniekorganisma (Fraser et al., 1997). Limitģtās metabolisma kapacģtātes dģļ, *B. burgdorferi* ir vajadzģgas sareģģģitas un ķģmiski nenosakāmas augģšanas barotnes *in vitro* pavairoģšanai (Tilly et al., 2008).

2.7 *B. Burgdorferi* virsmas proteģni

B. Burgdorferi dzģves ciklā pielāgojas daģzādiem vides apstākļiem, no zemas temperatģras un pH 8 ģrcģs, līdz 37°C un pH 7 zģdģtājos. Liela nozģme pielāgoģšanās procesā ir borģlijas virsmas proteģnu nomaiņai uz videi piemģrotākiem proteģniem. Pģc novietojuma membrānā, borģlijas virsmas proteģni tiek iedalģti divās grupās – membrānas integrāļajos proteģnos un lipoproteģnos (Kenedy et al., 2012).

Lielākā daļa no *B. Burgdorferi* virsmas proteģniem ir lipoproteģni. No pāreģjiem virsmas proteģniem tos atģķir N termināļajā galā pievienotā triacilģlicerģna grupa, ar ko tie tiek noenkuroti pie borģlijas membrānas (Dowdell et al., 2017). Vairākiem *B. Burgdorferi* lipoproteģniem ir raksturģga nestrukturģta N gala sekvenģe. Tiek uzskatģts, ka daģzādaģs lipoproteģnu nesakārtoto N gala sekvenģu garums ļauj uz borģlijas virsmas izveidot vairāku stāvu modeli, kurā proteģni, ko ir vēlams aizsargāt no imģnsistģmas, atrodas apakģģjos stāvos (Bunikis and Barbour, 1999, Zuckert, 2013).

Laima slimģbas borģlijas lipoproteģnus pģc funkcģjas var iedalģt cģetrās grupās:

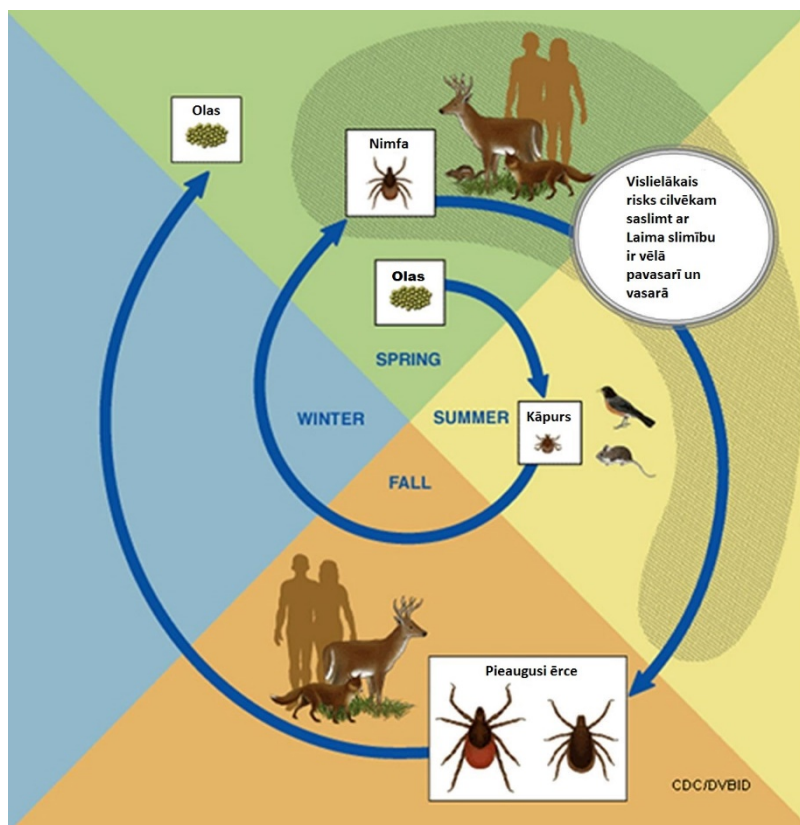
- 1) **Proteģni, kuriem ir loma *B. burgdorferi* izdzģvoģšanai ģrcģs.** Šģe proteģni saģstās ar ģrcģes iekģšpusģ esoģajām struktģrām un neļauj borģļģjai izkļģt no ģrcģes lģdz tā ir piesaģstģģjusģes zģdģtāģjam.
- 2) **Proteģni, kuriem ir loma pāreģjai *B. burgdorferi* uz zģdģtāģja organismu.** Lielākajai daļai no šģs grupas proteģniem nav zināma precģza funkcģja. Ir tikai noskaidrots, ka bez tiem borģļģja nespģj inficģt zģdģtāģjus. Pie šģs grupas pieder vairāki potenciāļi vakcģnu mģrķģ, kā OspC un BBA64.
- 3) **Saimniekorganisma ņunu adhezģni.** Tie saģstās ar daģzādām zģdģtāģju saģstaudos esoģajām molekulām. Eksperimentāļi ir pierādģts, ka šģe proteģni ir svarģģģi borģlijas spģģjai inficģt zģdģtāģjus.

- 4) **Proteīni, kas nodrošina izvairīšanos no saimniekorganisma imūnsistēmas.** Šīs grupas proteīniem ir novērotas dažādas funkcijas, sākot ar Vsl proteīnu, kas mainot savu uz borēlijas virsmas vērsto struktūru ļauj borēlijai izvairīties no imūnsistēmas uzbrukumiem, līdz komplementa regulatora-ieguves virsmas proteīnam CRASP, kas saistot asins serumā esošos šķīstošos proteīnus (faktoru viens H un faktoram H līdzīgo proteīnu), ļauj borēlijai izvairīties no komplementa izraisītas līzes (Kenedy et al., 2012).

Otra *B. burgdorferi* virsmas proteīnu grupa, membrānā integrētie proteīni, sastāda mazāk nekā desmito daļu no visiem borēlijas virsmas proteīniem. Atšķirībā no lipoproteīniem tiem netiek pievienots N terminālais lipīdu enkurs, bet pie membrānas tie ir piesaistīti ar transmembrānas proteīna sekvenci. Borēlijās tie veic vairākas funkcijas, kā šūnas proteīnu adhēziju un transportu, uzturvielu uzņemšanu, antibiotiku rezistenci un šūnas adhēziju. Atšķirībā no lipoproteīniem, pret *B. burgdorferi* integrālajiem membrānas proteīniem nav novērota spēcīga imūnā atbilde, kas ir apgrūtinājis šo proteīnu identificēšanu (Kenedy et al., 2012).

2.8 *B. burgdorferi* dzīves cikls

Ērces visbiežāk iegūst spirohētas kūniņas stadijā barošanās laikā no inficētajiem grauzējiem. Pēc kutikulas nomešanas, nimfas stadijā inficētās ērces barojas ar plašu dzīvnieku spektru. Tai skaitā ir grauzēji, kas kļūst par jauniem baktērijas rezervuāriem, tādējādi atjaunojot attīstības ciklu. Pēc nimfas attīstības uz pieaugušas ērces stadiju, tās barojas tikai no lielākiem dzīvniekiem, kas bieži nav *B. burgdorferi* saimniekorganismi (skat. 2. att.). Tā kā spirohētas tikai retos gadījumos tiek pārmantotas no mātes uz bērnu, kūniņu un nimfu barošanās ir ļoti nozīmīga to saglabāšanās sastāvdaļa. Gan nimfas, gan pieaugušas ērces dažreiz sūc cilvēku asinis. Mazais nimfu izmērs padara tās grūti pamanāmas. Tā rezultātā tām ir lielāka iespēja baroties no cilvēka pietiekami ilgi, lai spirohēta tiktu pārnesta no ērces uz cilvēka organismu (Tilly et al., 2008).



2. attēls. Ērces dzīves cikls (attēls aizgūts no <http://pedsinreview.aappublications.org/content/35/12/500>).
Figure 2. Ticks life cycle (picture adapted from <http://pedsinreview.aappublications.org/content/35/12/500>).

Ērcēs un zīdītājos ir atšķirīgas vides baktēriju augšanai. Zīdītāju ķermeņa temperatūras svārstās starp +37 - +39°C, kamēr ērcēs ir tāda pati, kā apkārtējā vidē (izņemot laikā, kad tās barojas no zīdītājiem). Zīdītāju iekšējās vides pH vērtība ir neitrāla, bet ērcēm tā ir bāziska. Lai spētu dzīvot divos dažādos organismos, *B. burgdorferi* izmaina savu gēnu ekspresiju, kas noved pie citu proteīnu veidošanas un fizioloģiskas pielāgošanās videi (Tilly et al., 2008).

2.9 Vakcīnas pret Laima slimību

Pirmo un vienīgo pret laima slimību cilvēkiem domāto vakcīnu "LIMErix" 1998. gadā izveidoja Smits Klīnē Bekhems. Tā pārbaudes laikā no saslimšanas ar Laima slimību pasargāja 76% pieaugušu cilvēku un 100% testēto bērnu, izraisot tikai vieglas līdz mērenas blaknes (Poland and Jacobson, 2001).

Neraugoties uz veiksmīgu pārbaudes laikā, 2002. gadā LIMErix tika izņemta no apgrozības Amerikas Savienoto Valstu tirgū. To veicināja vairāki iemesli, tai skaitā augstā vakcīnas cena, un iespējamā autoimūnās atbildes veidošanās vakcinētajiem cilvēkiem. Jāmin, ka izmeklēšanā tā arī netika pierādīts, ka LIMErix veicinātu autoimūno atbildi (Nigrovic and Thompson, 2007).

2.10 *B. burgdorferi* virsmas proteīns BBP28

BBP28 ir baktērijas *B. burgdorferi* virsmas lipoproteīns, kas atrodas cp32-1 plazmīdā un pieder pie mlp lipoproteīnu saimes (Yang et al., 1999).

Tas sastāv no 148 aa, no kurām pirmās 22 ir signālpeptīds. Pēctrasnslācības modifikāciju rezultātā BBP28, tāpat kā citiem *B. burgdorferi* lipoproteīniem, tiek atšķelta signālsekvence un pie N galā esošā cisteīna tiek pievienota triacilglicerīna grupa (Dowdell et al., 2017).

Lielākajai daļai *B. burgdorferi* proteīnu, tai skaitā BBP28, nav noskaidrota funkcija. Ik gadu tiek veikti vairāki eksperimenti borēlijas bioķīmijas izziņāšanai un tās komponentu klasificēšanai (Ojaimi et al., 2003).

Lai noskaidrotu, kuras plazmīdas (līdz ar to arī plazmīdu gēni) ir nepieciešami borēlijas izdzīvošanai pārejā no ērces uz zīdītāju, Džoijs E. Purser un Stīvens J. Norris veica eksperimentu, kurā audzēja un pārsēja *B. burgdorferi in vitro*, līdz tās zaudēja plazmīdas, kas tām vairāk nebija nepieciešamas barotnes apstākļos. Ar iegūtajām baktērijām tika inficētas C3H/HeN peles, un atlasītas tās borēlijas, kas spēj izdzīvot zīdītāja organismā. Iegūtajām baktērijām ar PCR un *Southern blot* metodi tika noskaidrots plazmīdu sastāvs. Eksperimenta rezultātā tika atklāts, ka visas baktērijas saglabāja cp32-1 plazmīdu arī pēc vairākkārtējas pārsēšanas no barotnes uz barotni. No iegūtajiem datiem nevar secināt vai plazmīda ir nepieciešama zīdītāju inficēšanā, bet tika pierādīts, ka tā ir nepieciešama borēlijas izdzīvošanai *in vitro* (Purser and Norris, 2000).

Borēlijas bioķīmijas izziņāšanā svarīgi ir noskaidrot, kuru proteīnu ekspresija tiek augšupregulēta vai bremzēta, baktērijām mainot dzīves vidi.

Lai noskaidrotu borēlijas proteīnu ekspresijas līmeņa izmaiņas, tām pārvietojoties no ērces uz zīdītāja organismu, tika veikts eksperiments, kurā izmantoja dialīzes membrānas kambarus (DMC) mikrorindu tehnoloģiju. Šajā darbā pētītā proteīna BBP28 ekspresija borēlijām, pārvietojoties uz zīdītāja organismu pēc 48 h adaptācijas perioda, palielinājās 6,3 reizes (Tokarz et al., 2004).

Borēlijas proteīnu, kuru ekspresijas līmenis mainās borēlijām nokļūstot citā dzīves vidē, tālākai klasificēšanai tika veikti eksperimenti, kuros pārbaudīja proteīnu ekspresijas izmaiņu atkarībā no atsevišķiem zīdītāja iekšējās vides faktoriem – temperatūras un ķīmiskajiem signāliem.

Eksperimentā, kurā pārbaudīja zīdītāja iekšējās vides signālu ietekmi uz borēliju, neizmainot vides temperatūru (atstājot to 23°C), tika secināts, ka 79% plazmīdu gēnu ekspresija pazeminās, kamēr 93% no gēniem hromosomā, kuru ekspresijas līmenis izmainījās, ekspresija palielinās. Vislielākās gēnu ekspresijas izmaiņas tika novērotas šūnas virsmas proteīniem, to

nozīmīgās lomas pielāgošanās procesā dēļ. *BBP28* gēna ekspresija zīdītāja iekšējās vides signālu ietekmē, salīdzinājumā ar ekspresiju ērcēs samazinājās 1,98 reizes (Brooks et al., 2003).

Citā eksperimentā tika pārbaudīta tikai temperatūras izmaiņas ietekme uz borēlijas proteīnu ekspresiju, neizmainot borēlijas apkārtējo vidi. Mainot temperatūru no 23 uz 37°C, *BBP28* ekspresija palielinājās 4,33 reizes (Ojaimi et al., 2003).

Liela daļa no borēlijas virsmas saistītajiem proteīniem ir lipoproteīni. Tie veido 8% no kopējā borēlijas proteīnu skaita. Tā kā tie ir potenciālie antigēni, kam varētu izraisīt imūnsistēmas reakciju, šie ar membrānu saistītie proteīni var tikt izmantoti vakcīnu izveidē. Lai noskaidrotu, kuri no membrānu proteīniem spēj izraisīt cilvēka imūnsistēmas atbildi uz Laima slimību, 90 dažādu lipoproteīnu reaktivitāte tika pārbaudīta ar proteīnu mikrorindu tehnoloģiju uz 13 Laima slimības pacientu serumiem, kuriem jau bija izteikti vēlīie simptomi. No 90 pētījumā izvēlētajiem proteīniem, tikai *BBP28* reaģēja ar visiem serumiem. Diemžēl reakcija norisinājās ar zemu C5/C3 intensitāti (reakcijas intensitātes attiecība pret fona reakcijas intensitāti). Otrajā vietā, pēc reakciju skaita, ierindojās trīs citi proteīni, kas reaģēja ar 12 serumiem. Mazāk nekā puse no pārbaudītajiem lipoproteīniem reaģēja ar sešiem vai vairāk pacientu serumiem (Luft et al., 2011).

3 Materiāli un metodes

3.1 Materiāli:

3.1.1 Baktēriju celmi un plazmīdas

- *E.coli* celmi:

BL21(DE3):*B F – dcm ompT hsdS (rk- mk+) dcm+ Tetr gal λ (DE3) [argU ileY leuW Camr]* (New England Biolabs, ASV)

DH5alfa:*F-, phi80dlacZDelta M15, Delta(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, hadR17(rk-, mk+), gal-, phoA, supE44, Lambda-, thi-1, gyrA96m relA1.*

Kompetentās šūnas uzglabātas pie –80°C TFBII šķīdumā.

- Plazmīdas:

pETM11 plazmīda ar *His-Tag* sekvenci pirms BBP28 proteīna kodējošās sekvences. Proteīns ir bez transmembranālās signālsekvences (konstrukcija iegūta no Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra Dr. biol. K. Tāra grupas)(1. pielikums).

3.1.2 Laboratorijā izmantotā aparatūra, iegādes vieta un ražotājvalsts

1. Vorteks V-1 plus, Biosan, Latvija
2. Multifunkcionāls orbitālais kratītājs PSU-20i, Biosan, Latvija
3. Ultrazemas temperatūras saldētava (-80°C) WUF-400, Witeg, Vācija
4. Centrifūga 5418, Eppendorf, Vācija
5. Orbitālais kratītājs ar regulējamu temperatūru, TS-100C, Biosan, Latvija
6. Vertikālā elektroforēzes sistēma: CS-300 OmniPAC, Cleaver Scientific, Apvienotā karaliste
7. Vertikālās elektroforēzes vanna, Invitrogen XCell SureLock, Fisher scientific, ASV
8. Nemaisoša, termoregulējama ūdens vanna, Grant WB-2S, Biosan, Latvija
9. Frakcionētājs, Frac-920, GE Healthcare Life Sciences, Zviedrija
10. Proteīnu hromatogrāfs: Akta purifier 10, GE Healthcare Life Sciences, Zviedrija
11. HisTrap HP hromatogrāfijas kolna, GE Healthcare Life Sciences, Zviedrija
12. Gelfiltrācijas kolonna – HiLoad 16/600 Superdex 75p, GE Healthcare Life Sciences, Zviedrija
13. MALDI-TOF masspektrometrs, Autoflex L, Bruker Daltonics, ASV
14. Centrifūga, Multispin Msc-6000, Biosan, Latvija
15. Ultraskaņas homogenizators, UP200Ht, Hielscher, Vācija

16. Inkubators-kratītājs, Multitron standard, Infors HT, Šveice
17. Autoklāvs: DX-65, Systec, Vācija
18. pH metrs: PB-11, Sartorius, Vācija
19. Centrifūga: Coulter, Avanti J-E, Beckman, Vācija
20. 600 MHz KMR spektrometrs, aprīkots ar četru kanālu kriozondi un z-ass gradientiem, Varian Unity Inova, Anglija
21. 800 MHz KMR spektrofotometrs: Avance III HD, aprīkots ar četru kanālu RT zondi (TXI) un z-ass gradientiem, Bruker, Vācija
22. Centrifūga: Allgra X-30R, Beckman coulter, Vācija
23. Mikrotilpumu UV/VIS spektrometrs: Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, ASV
24. Bioloģiskās drošības skapis (lamināra skapis): Streamline SC2-4A1, ESCO, Singapūra

3.1.3 Izmantotā programmatūra, serveri un to izmantošanas mērķi

1. UNICORN 5.31, Hromatogrāfijas veikšana
2. Nanodrop 2000, OD mērīšana
3. Bruker Daltonics flexControl 2.2, Massepektrometra spektru uzņemšana
4. Bruker Daltonics flexAnalysis 2.2, Massepektrometra datu analīze
5. Bruker Topspin, KMR spektru uzņemšana un apstrāde
6. CARA, KMR spektru analīze
7. NMR Pipe, KMR spektru procesēšana (Delaglio et al., 1995)
8. UNIO-ATNOS/CANDID proteīna struktūras aprēķināšana no KMR datiem (Herrmann et al., 2002, Herrmann et al., 2002, Serrano et al., 2012)
9. Cyana, proteīna struktūras aprēķināšana no KMR datiem (Güntert et al., 1997)
10. TALOS+, dihedrālo leņķu ierobežojumu noteikšana no HN, Ha, Ca, Cβ, C', N ķīmiskajām nobīdēm (Shen et al., 2009)
11. Relax, KMR relaksācijas datu analīze (Bieri et al., 2011)
12. CNS, iegūto struktūru enerģijas minimizēšana (Brunger, 2013)
13. FinchTV – Sangera sekvencēšanas datu apskate.
14. Dali – proteīna struktūras salīdzināšana ar citām struktūrām no PDB (Holm and Rosenström 2010).
15. Uniprot – proteīna sekvences salīdzināšana ar citām homologām sekvencēm (2017).

3.1.4 Izmantotās vielas un to iegādes vieta un ražotājs valsts

1. Nātrija hlorīds (NaCl), Fisher scientific, ASV
2. Rauga ekstrakts, Fisher scientific, ASV
3. Triptons, Fisher scientific, ASV

4. Agars, Fisher scientific, Meksika
5. Magnija sulfāts (MgSO₄), AppliChem, Vācija
6. D-Glikoze (C₆H₁₂O₆), Acros organics, ASV
7. ¹³C D-Glikoze (13C₆H₁₂O₆), Cambridge Isotope Laboratories, Inc., ASV
8. ¹⁵N Amonija hlorīds (15NH₄Cl), Isotec, ASV
9. Kālija dihidrogēn fosfāts (KH₂PO₄), Fisher scientific, ASV
10. Kalcija hlorīds (KCl), Fisher scientific, ASV
11. Tiamīna hidrochlorīds (C₁₂H₁₇N₄O₅Cl·HCl), Fisher scientific, Vācija
12. TEV proteāze, Producēta LOSI (Tropea et al., 2009), Latvija
13. SDS (nātrija dodecilsulfāts) (NaC₁₂H₂₅SO₄), Fisher scientific, Japāna
14. Bromfenol zilais (C₁₉H₁₀Br₄O₅S), Fisher scientific, Indija
15. Glicerīns (C₃H₅(OH)₃), Fisher scientific, ASV
16. IPTG (izopropil β-D-1 tiogalaktopiranozīds) (C₉H₁₈O₅S), Fisher scientific, Itālija
17. Imidazols (C₃H₄N₂), Acros organics, ASV
18. Nātrija dihidrogēnfosfāta heptahidrāts (NaH₂PO₄·7H₂O), Fisher scientific, ASV
19. DTT (C₄H₁₀O₂S₂), Fisher scientific, ASV
20. Kanamicīna sulfāts (C₁₈H₃₆N₄O₁₁·H₂SO₄), Fisher scientific, Ķīna
21. Nātrija azīds (NaN₃), Acros organics, ASV
22. Proteāžu inhibitoru kokteilis bez EDTA, Sigma-Aldrich, ASV
23. EDTA ((HOOCCH₂)₂NCH₂)₂), Acros organics, Beļģija
24. Tris bāze((CH₂OH)₃CNH₂), Fisher scientific, ASV
25. MES bezskābes monohidrāts (C₆H₁₃NO₄S·H₂O), Fisher scientific, Ķīna
26. Trifloretiķskābe (TFA), Sigma-Aldrich, ASV
27. 2,5-Dihidrokiacetofenons, Vācija
28. (2,5-DHAP), Bruker Daltonik, Vācija
29. Proteīnu kalibrācijas standarts II, Bruker Daltonik, Vācija
30. Deitērija ūdens (D₂O), Euro-top, Francija
31. EZ-Run Proteīnu marķieris, Fisher scientific, Lietuva
32. Simply blue SafeStan, Invitrogen, ASV
33. NaOH, Fisher scientific, ASV
34. Phusion augstas precizitātes polimerāzes kits, Thermo Scientific, ASV
35. Structure Screen 1 + 2 HT-96 precipitantu plate, Molecular Dimensions, ASV
36. JCSG+ precipitantu plate, Molecular Dimensions, ASV
37. FastDigest NcoI restriktāze, Thermofisher, ASV
38. FastDigest XhoI restriktāze, Thermofisher, ASV

3.1.5 Izmantotie materiāli, to iegādes vieta un ražotājvalsts.

1. 20 µl pipešu uzgaļi bez filtra, Starstedt, Vācija
2. 200 µl pipešu uzgaļi bez filtra, Starstedt, Vācija
3. 1000 µl pipešu uzgaļi bez filtra, Starstedt, Vācija
4. 50 mL centrifūgas tūbas, Starstedt, Vācija
5. 15 mL centrifūgas tūbas, Starstedt, Vācija
6. 0,2 µm šļircu filtri, Starstedt, Vācija
7. Amicon-ultra-15, 10K filtri, Merck Millipore, Īrija
8. Safeseal 2 mL mikromēģene, Starstedt, Vācija
9. 1,5 mL mikromēģene, Starstedt, Vācija
10. 25 mL seroloģiskās pipetes uzgaļi, Starstedt, Vācija
11. 13 mL tūba, Starstedt, Vācija
12. mm KMR ampula, Norell, ASV
13. mm KMR šigemi ampula, Shigemi, Japāna
14. Anchorchip 400/384(Part No.), Bruker Daltonics, Vācija
15. NuPAGE 4-12% 10 bedrīšu Bis-Tris gels, Novex by life technologies, ASV
16. NuPAGE 4-12% 15 bedrīšu Bis-Tris gels, Novex by life technologies, ASV
17. Spectra/Por3 Dialīzes membrāna. Standart RC Tubing: 3,5kD, Spectrum Laboratories, ASV
18. Petrī plates, Starstedt, Vācija
19. mLine mehāniskās pipete (0,1-3 µL), Sartorius, Vācija
20. mLine mehāniskās pipete (2-20 µL), Sartorius, Vācija
21. mLine mehāniskās pipete (20 – 200 µL), Sartorius, Vācija
22. mLine mehāniskās pipete (100 – 100 µL), Sartorius, Vācija
23. L izmēra Lateksa laboratorijas cimdi, Klinion protection, Nīderlande
24. Seroloģiskā pipete pipetboy, Integra, Šveice
25. Kristalizācijas plašu uzlīmes ClearVue Sheets, Molecular Dimensions, ASV
26. 96-well MRC Crystallisation plate, Molecular Dimensions, ASV

3.1.6 Barotņu sagatavošana

3.1.6.1 LB barotne (1L):

A. Nosver:

- 10g NaCl;
- 10g Triptona;
- 0,5g Rauga ekstrakta;

B. Pārviesto visas nosvērtās sastāvdaļas uz 2L stikla pudeli un šķīdina 1L dejonizēta ūdens;

C. Aizskrūvē pudeli ciet, bet ne līdz galam;

D. Autoklavē iegūto šķidrumu;

E. Pēc autoklavēšanas aiztaisa pudeli līdz galam un pārviesto uz lamināru;

3.1.6.2 LB-agara plates (100 mL)

A. Nosver:

- 1g NaCl
- 1g triptona
- 0,5g rauga ekstrakta
- 2g agara

B. Pārviesto visas nosvērtās sastāvdaļas uz 250 mL stikla pudeli un šķīdina 100 mL dejonizēta ūdens;

C. Aizskrūvē pudeli ciet, bet ne līdz galam;

D. Autoklavē iegūto šķidrumu;

E. Pēc autoklavēšanas aizskrūvē pudeli līdz galam pārviesto uz lamināra skapi;

F. Atdziest līdz 50°C un ja vajadzīgs, pievieno 100 µL 50 µg/mL kanamicīna;

G. Samaisa iegūto šķidrumu;

H. Četros petrītraukos iepilda katrā 25 mL pagatavotā šķīdumā;

I. Petrītraukus atstāj laminārā ar pa pusei noņemtiem vākiem, līdz tie atdziest.

3.1.6.3 M9 minimālā barotne (1L)

A. Nosver:

- 3 g KH_2PO_4
- 12,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g NaCl
- 1 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

B. Pārvieta visas nosvērtās sastāvdaļas uz 2 L stikla pudeli un šķīdina 1L dejonizēta ūdens;

C. Noregulē šķīduma pH uz 7,2 ar 10 M NaOH ;

J. Aizskrūvē pudeli ciet, bet ne līdz galam;

D. Autoklavē iegūto šķīdumu;

K. Pēc autoklavēšanas aiztaisa pudeli līdz galam ciet un pārvieta uz lamināra skapi;

E. Pēc barotnes atdzišanas tai pievieno:

- Autoklavētus 2 mL 1M MgSO_4
- Autoklavētus 100 μL 1M CaCl_2
- Caur 0,2 μm filtru filtrētu 1 mL 1 M tiamīna
- Caur 0,2 μm filtru filtrētus 10 mL 20% $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ šķīduma.

3.1.6.4 Psi barotne (100mL)

A. Nosver:

- 0,5 g MgSO_4 ;
- 2 g Triptona;
- 0,5 g Rauga ekstrakta;

B. Pārvieta visas nosvērtās sastāvdaļas uz 200 mL stikla pudeli un šķīdina 100 mL dejonizēta ūdens;

C. Aizskrūvē pudeli ciet, bet ne līdz galam;

D. Autoklavē iegūto šķīdumu;

E. Pēc autoklavēšanas aiztaisa pudeli līdz galam un pārvieta uz lamināru;

3.1.7 Buferu sastāvs

3.1.7.1 Niķeļa afinitātes hromatogrāfijas buferis A

- 20 mM NaPi
- 300 mM NaCl
- 15 mM imidazols
- Dejonizēts ūdens
- pH = 7,5

3.1.7.2 Niķeļa afinitātes hromatogrāfijas buferis B

- 20mM NaPi
- 300 mM NaCl
- 300 mM imidazols
- Dejonizēts ūdens
- pH = 7,5

3.1.7.3 Gelfiltrācijas buferis

- 150mM NaCl
- 20 mM NaPi
- Dejonizēts ūdens
- pH=6,8

3.1.7.4 KMR buferis

- 20mM NaPi
- 0,03% NaN₃
- 50 mM NaCl
- 1x Proteāžu inhibitoru kokteilis bez EDTA
- 0,5 mM EDTA
- Dejonizēts ūdens
- pH = 6,8

3.1.7.5 Laemly buferis 2X

- 0,125M Tris-Cl
- 20% glicerīns
- 4% SDS
- 5% DTT
- 0,01% bromfenol zilais

- Dejonizēts ūdens
- pH = 6,8

3.1.7.6 SDS-PAGE buferis

- 50 mM MES
- 50 mM Tris
- 1mM EDTA
- 0,1% SDS
- Dejonizēts ūdens
- pH = 7,3

3.1.7.7 Kristalizēšanas buferis

- 50 mM NaPi
- pH = 8

3.1.7.8 TFBI buferis

- 100 mM RbCl
- 50 mM MnCl
- 10 mM CaCl
- 30 mM CH₃COOK
- 15% glicerīns

3.1.7.9 TFBII buferis

- 10 mM MOPS
- 75 mM CaCl
- 10 mM RbCl
- 15 % glicerīns

3.2 Metodes:

3.2.1 Plazmīdu transformācija *E.coli* baktērijās ar *Heat Shock* metodi

- A. Laminārā 50 µl kompetentu *E.coli* šūnu suspensijai pievieno 2 µl 20ng/mL plazmīdu šķīduma;
- B. Šūnu suspensiju uzmanīgi samaisa pāris reizes uzsitot nelielu knipi pa mikromēģeni;
- C. Inkubē 20 min traukā ar ledu;
- D. Inkubē 45-60 s 42°C ūdens vannā (*Heat shock*);
- E. Ievieto mikromēģeni traukā ar ledu uz 2 min;
- F. Pārnes šūnu suspensiju uz 1mL istabas temperatūras SOC barotni;
- G. Inkubē šūnu suspensiju inkubatorā pie 37°C uz 1h;
- H. Centrifugē šūnu suspensiju 5 min pie 3000 xg;
- I. Laminārā nolej supernantu un pievieno suspendētajām šūnām 50 µl jaunas SOC barotnes;
- J. Suspensiju maisa pipetējot, līdz tas kļūst viendabīgs;
- K. Suspensiju uznes uz LB agara barotnes platēm ar kanamicīnu (50µg/mL);
- L. Izsmērē šūnu suspensiju pa petrī platēm, līdz spātele līp pie agara barotnes;
- M. Audzē termostatā pie 37°C 12-16 h.

3.2.2 Starta kultūra

- A. Laminārā no iegūtās plates ar cilpu paņem vienu koloniju un pārliet 7 mL LB barotnē ar kanamicīnu (50µg/mL);
- B. Neuzliekot līdz galam vāciņu, inkubē pa nakti orbitālajā inkubatorā 30°C, vai 37°C līdz OD₆₀₀ sasniedz aptuveni 1.

3.2.3 Proteīna ekspresija

- A. Laminārā 1,75 mL naktskultūru pārlej četrās 2 L Eljermeijera kolbās, kurās katrā ir pa 0,25 L LB vai M9 barotnes. Kolbas atveri pārklāj ar alumīnija foliju;
- B. Inkubē regulējamā termostatā ar 180 apgr./min 37°C, līdz OD₆₀₀ sasniedz 0,6;
- C. Inducē proteīnu ekspresiju ar 0,5 mM IPTG;
- D. Atkarībā no barotnes veida un dotā laika audzē šūnas pie 180 apgr./min:
- Ja proteīna ekspresija tiek veikta LB barotnē, audzē 37°C 4-6 h vai 20°C 12 līdz 16 h;
 - Ja proteīnu ekspresija tiek veikta M9 barotnē, audzē 37°C 6-8 h vai 23°C pa 12 līdz 16 h;
- E. Centrifugē šūnu suspensiju pie 7700 xg 10 min, iepriekš nosvērtos centrifūgas stobrus;
- F. Nolej supernantu un 3 min tur centrifūgas stobrus uz salvetes ar atveri uz leju, lai notecinātu pārpalikušo barotni;
- G. Nosver centrifūgas stobrus ar sedimentētām šūnām un aprēķina šūnu masu (ja nepieciešams, šūnas iesaldē pie -20°C ilgākai uzglabāšanai);
- H. Resuspendē šūnas buferī A ar tilpumu, kas līdzvērtīgs 4,2 mL uz 1 g šūnu. Kopējais bufera A tilpums nedrīkst būt mazāks par 20 mL;
- I. Iegūtās šūnas ielej vārglāzē, kura ir iestiprināta ledus traukā;
- J. Sonificē šūnu suspensiju 5 s ik pa 20 s 50 min. Sonificēšanas frekvenci uzstāda atkarībā no suspensijas tilpuma.

3.2.4 Niķeļa afinitātes hromatogrāfija

- A. Izmazgā hromatogrāfa sistēmu ar dejonizētu H₂O izmantojot *Pump wash* funkciju;
- B. Pievieno hromatogrāfam *His-Trap* kolonu;
- C. Uzstāda plūsmas ātrumu 5 mL/min (nepārsniedzot kolonas maksimālo spiedienu, kas šajā gadījumā ir 0,3 MPa);
- D. Izmazgā kolonu ar 1 kolonas tilpumu bufera A (kolonas tilpums 5 mL);
- E. Izmazgā kolonu ar 5 kolonas tilpumiem bufera B;
- F. Izmazgā kolonu ar 5 kolonas tilpumiem bufera A;
- G. UV adsorbciju nokalibrē uz 0;

- H. Sonificēto šūnu suspensiju ieviek šļircē un filtrē ar 0,2 μm filtru;
- I. Ievada paraugu parauga tūbā;
- J. Injicē paraugu uz kolonas, neievadot kolonā gaisa burbuļus;
- K. Kad ir injicēts viss paraugs, turpina plūsmu ar ātrumu 2 mL/min ar buferi A, līdz adsorbēcija kļūst konstanta;
- L. Eluē proteīnu ar bufera B/bufera A plūsmas gradientu, lai tas sasniegtu 60% 20 min laikā;
- M. Ja ir novērojamas izmaiņas lineārajā adsorbēcijas grafika pieaugumā, ko veido buferu pārmaiņa, sāk frakcionēt paraugu;
- N. Pēc bufera B/bufera A gradienta 60% sasniegšanas, sāk 100% bufera B plūsmu uz 5 kolonas tilpumiem;
- O. Ja ir novērojama UV adsorbēcijas palielināšanās, ko neizraisa buferu nomainīšana, uzsāk frakcionēšanu;
- P. Uzstāda plūsmas ātrumu uz 5 mL/min un izmazgā kolonu ar 5 kolonas tilpumiem dejonizēta H₂O;
- Q. Izmazgā kolonu ar 5 kolonas tilpumiem etanola;
- R. Veic *Pump wash* sistēmai ar etanolu;
- S. Uzmanīgi noņem kolonu no sistēmas, neļaujot tajā ieplūst gaisam;
- T. Apstādina plūsmu.

3.2.5 Proteīnu SDS-PAGE gela elektroforēze

- A. Sajauc 10 μL parauga ar 10 μL *Laemly* bufera;
- B. Karsē paraugus temperatūras regulējamā orbitālajā kratītājā 96°C 5 min;
- C. Centrifugē paraugus 5s pie 3000 xg;
- D. Sagatavo gela plati elektroforēzei;
- E. Uznes paraugus uz gela;
- F. Pārbauda gela elektroforēzes sistēmā ir uzstādīti 200V;
- G. Uzsāk elektroforēzi;
- H. Kad paraugs ir sasniegjis gela apakšdaļu, apstādina gela elektroforēzi;
- I. Iegūto gelu uzmanīgi izņem no to saturošā konteinera un ievieto 100mL traukā ar H₂O;

- J. Ūdens vannu ieliek mikroviļņu krāsnī uz 45 s pie 1100 W;
- K. Uz parauga uzliek foliju un novieto to uz orbitālā kratītāja;
- L. Pirms tam noņemot foliju un pamainot ūdens vannā ūdeni, atkārto I un K soli vēl divas reizes;
- M. Pārklāj gelu ar 20 ml *briliant blue* krāsvielu un ievieto mikroviļņu krāsnī uz 30 s pie 700W;
- N. Atstāj gelu uz orbitālā kratītāja 30 min vai vairāk;
- O. Nolej *briliant blue* krāsvielu un pievieno gelam ūdeni;
- P. Atstāj gelu uz orbitālā kratītāja, lai to atkrāsotu un varētu apskatīt rezultātus.

3.2.6 Proteīna šķelšana ar TEV proteāzi

- A. Nomaina parauga buferi uz TEV proteāzes griešanas buferi ar koncentratoru vai dialīzi, abos gadījumos gala rezultātā iegūstot vismaz 1000 reižu atšķaidījumu;
- B. Paraugam pievieno TEV proteāzi pēc formulas:

$$TEV = \frac{A_{prot} \cdot V_{prot}}{A_{TEV} \cdot 100}, \text{ kur}$$

A_{prot} – OD₂₈₀ adsorbcija proteīna šķīdumam;

V_{prot} – Proteīna šķīduma tilpums;

A_{TEV} – Adsorbcija TEV šķīdumam;

TEV – TEV tilpums.

- C. Inkubē pa nakti 4°C.

3.2.7 His-trap hromatogrāfija pēc proteīna šķelšanas ar proteāzi

- A. Atkārto iepriekš veiktās hromatogrāfijas A. līdz G. soli ieskaitot;
- B. Ievada paraugu parauga tūbā;
- C. Injicē paraugu uz kolonas, neievadot kolonā gaisa burbuļus;
- D. Līdz ar injekciju sāk frakcionēšanu;
- E. Pēc injekcijas apstādināšanas kolonu skalo ar buferi A;
- F. Kad OD₂₈₀ adsorbcija stabilizējas tuvu 0, kolonu skalo ar 100% buferi B;
- G. Pēc 2 kolonas tilpumiem atkārto iepriekšējās hromatogrāfijas O. līdz T. Punktu ieskaitot;

3.2.8 Gelfiltrācijas hromatogrāfija

- A. Izmazgā hromatogrāfa sistēmu ar dejonizētu H₂O, izmantojot *Pump wash* funkciju;
- B. Uzmanīgi pievieno hromatogrāfam gelfiltrācijas kolonu, sākumā augšējo, tad apakšējo tās daļu, neievadot tajā gaisu;
- C. Uzstāda plūsmas ātrumu maksimālo pieļaujamo kolonas ātrumu, 1,6 mL/min, nepārsniedzot kolonas maksimālo atļauto spiedienu, kas šajā gadījumā ir 0,3 MPa;
- D. Kolonu izskalo ar 1 kolonas tilpumu dejonizēta H₂O (120 mL kolona);
- E. Kolonu izskalo ar 1 kolonas tilpumu gelfiltrācijas bufera;
- F. Kamēr atīrās kolona, sakoncentrē savu paraugu, līdz tas sasniedz 2-5 mL tilpumu;
- G. Nokalibrē hromatogrāfa UV adsorbciju uz 0;
- H. Ievada paraugu uz hromatogrāfa tūbas;
- I. Injicē paraugu uz kolonas, neievadot tajā gaisa burbuļus;
- J. Kad sāk palielināties UV adsorbcija, sāk fracionēt paraugu, līdz OD₂₈₀ adsorbcija stabilizējas 0 tuvumā;
- K. Kad caur kolonu ir izplūdis 1 kolonas tilpums ar buferi, kolonu mazgā ar 1 kolonas tilpumu etanola;
- L. Sistēmu ar *Pumpwash* funkciju izmazgā ar etanolu;
- M. Noņem kolonu no sistēmas;
- N. Apstādina plūsmu hromatogrāfā.

3.2.9 Kompetentu *E.coli* šūnu izveide ar RbCl metodi

- A. Ar cilpu no glicerīna krājuma paņem *E.coli* šūnas un uzsēj tās uz LB barotnes agara platēm bez antibiotikām;
- B. Plates inkubē 37°C 12 - 16 h;
- C. No plates ar cilpu pārvieto vienu koloniju 20 mL SOC barotnē, 250 mL kolbā;
- D. Barotni ievieto orbitālajā inkubatorā 37°C 12-16 h;
- E. Iegūto starta kultūru atšķaida 1:100 ar svaigu SOC barotni;
- F. Barotni ievieto orbitālajā inkubatorā 37°C līdz tās OD₅₅₀ sasniedz 0,3-0,4;
- G. Iegūto suspensiju 15 min atdzesē uz ledus;
- H. Suspensiju centrifugē pie 3000-5000xg 4°C 5 min;
- I. Nolej supernantu un nogulsnes uzmanīgi resuspendē 0,4 sākotnējās barotnes tilpuma vienībās ledus aukstā TFBI buferī;
- J. Novieto suspensiju 15 min 4°C;
- K. Atkārti soli H;
- L. Nolej supernantu un resuspendē nogulsnes 0,04 sākotnējās barotnes tilpuma vienībās;
- M. Novieto šūnu suspensiju uz ledus 15-60 min.
- N. Pārvieto šūnas iepriekš atdzesētās mikromēģenēs, katrā pa 50µL;
- O. Sasaldē iegūtās mikromēģenes šķidrā slāpekļī;
- P. Šūnas līdz lietošanai uzglabā -80°C.

3.2.10 Plazmīdu PCR

- A. 0,2 mL mikromēģenē ievieto:
- 35,5 μL dejonizētu ūdeni
 - 10 μL 5x Phusion HF Bufferi
 - 1 μL 10 mM dNTP maisījumu
 - 1 μL 25 μM Fw DNS praimeru
 - 1 μL 25 μM Rs DNS praimeru
 - 1 μL 100 ng/ μL plazmīdu
 - 0,5 μL 1U/ μL Phusion HSII polimerāzi
- B. Uzstāda PCR automātisko termostatu sekojošam režīmam:

1. Tabula

Uzstādītie automātiskā termostata ciklu parametri.

Table 1.

Setu up of automatic thermostat cycle parameters

t, °C	laiks, s	ciklu skaits
98	30	1
98	10	30
65	30	
72	15	
72	600	1
4	līdz parauga izņemšanai	

- C. Ja nepieciešams, paraugu uzglabā -20°C .

3.2.11 Plazmīdu un PCR produktu šķelšana ar *NcoI* un *XhoI* *FastDigest* endonukleāzēm

- A. 1,5 mL mikromēģenē ievieto:
- 2 μL 10x *FastDigest green* bufera
 - 2 μL 250 ng/ μL plazmīdu šķīdumu vai 10 μL PCR produkta
 - 1 μL *FastDigest NcoI* endonukleāzi
 - 1 μL *FastDigest XhoI* endonukleāzi
 - 14 μL dejonizētu ūdeni
- B. Iegūto maisījumu homogenizē un īsi vorteksē;
- C. Paraugu inkubē termostātā 1h pie 37°C ;
- D. Paraugā esošas restriktāzes inaktivē, karsējot 80°C 5 min
- E. Ja nepieciešams, paraugu uzglabā -20°C .

3.2.12 DNS elektroforēze agarozes gelā

- A. 0.5g agarozes sajauc ar 50mL 1X TAE buferi;
- B. Šķīdumu karsē mikroviļņu krāsnī līdz novēro viršanu;
- C. Ja pēc pirmās karsēšanas soļa viss agarozes pulveris nav izšķīdis, atkārti iepriekšējo soli;
- D. Gaida līdz šķīdums atdziest līdz aptuveni 50°C;
- E. Pievieno 5 µL etidija bromīdu. Šo soli veic ar īpašu piesardzību etidija bromīda kancerogenitātes dēļ;
- F. Kārtīgi samaisa iegūto šķīdumu un ielej to gelu taisīšanas formā aptuveni 4-7mm biezumā;
- G. Gelu taisīšanas formas galā tai paredzētajā vietā ievieto gela elektroforēzes ķemmīti;
- H. Kad gels ir sacietējis, no tā uzmanīgi, nesaplēšot gelu, izņem gela elektroforēzes ķemmīti;
- I. Gelu ar visu gela taisīšanas formu pārvieto uz gela elektroforēzes iekārtu, ar bedrītēm uz anoda pusi;
- J. Piepilda gela elektroforēzes iekārtu ar 1X TAE buferi līdz tas pārklāj gelu;
- K. Gela bedrītēs iepilda DNS marķieri un ar endonukleāzēm šķeltos PCR produktus un plazmīdas;
- L. Aizver gela elektroforēzes iekārtu. Ieslēdz strāvas savotu. Uzregulē tā strāvas stiprumu uz 90mA un spriegumu uz 200V
- M. Veic elektroforēzi aptuveni 30-45 min;
- N. Rezultātus novēro gelu apstarojot ar UV lampu. Šo soli veic pēc iespējas īsāku laiku, lai neizraisītu gelā esošā DNS bojājumus.

3.2.13 DNS izdalīšana no gela ar GenJET™ Gel Extraction Kit

- A. Ar minimālu gela daudzumu no gela izgriež vajadzīgo DNS zonu un ievieto to mikromēģenē;
- B. Izgriestajai DNS zonai 1:1 attiecībā pievieno saistīšanās buferi;
- C. Paraugu inkubē 50-60°C pie 250rpm 10 min vai līdz izšķīst gels;
- D. Ja DNS fragments ir mazāks par 500 bp pievieno vienu gela tilpumu 100% izopropanola;
- E. Šķīdumu pārnes uz GenJET™ kolonu un centrifugēto 1 min pie 13000xg;
- F. Kolonā ielej 700 µL mazgāšanas buferi un centrifugē to 1 min pie 13000xg;
- G. Izlej caurplūdi kas sakrājušies zem kolonas esošajā mikromēģenē;

- H. Atkārto F un G soli
- I. Tukšu kolonu ar tai piesaistītu DNS centrifugē 1 min pie 13000 xg;
- J. Pārvieto kolonu uz jaunu mikromēģeni;
- K. Membrānas centā uzpilina 50 µL 60°C karstu eluēšanas buferi un nogaida 2 min;
- L. Centrifugē 1 min pie 13000xg
- M. Iegūtā DNS koncentrāciju pārbauda ar Nanodrop;
- N. Ilglaicīgai turēšanai paraugu uzglabā pie -20°C.

3.2.14 DNS fragmentu ligēšana

- A. 1.5 mL mikromēģenē iepilina:
 - a. 8 µL ar *NcoI* un *XhoI* šķeltu, no agarozes gela attīrītu PCR produktu;
 - b. 1µL ar *NcoI* un *XhoI* šķeltu, no agarozes gela attīrītu pTAT6 vai pETM11 plazmīdu;
 - c. 2µL 10x T4 DNS ligāzes buferšķīdumu;
 - d. 0.2 µL 5U T4 ligāzi;
 - e. 8.8 µL dejonizētu ūdeni.
- B. Maisījumu īsi vorteksē, centrifugē un pa nakti inkubē 4°C;
- C. Reakciju inaktivē, ievietojot mikromēģeni 65°C 10 min;
- D. Ja nepieciešams, paraugu uzglabā -20°C.

3.2.15 Plazmīdu DNS izdališana no *E.Coli* baktērijām ar GenGET™ Plasmid Miniprep kit

- A. Veic 3.2.1. metodē aprakstīto transformāciju;
- B. Vienu koloniju no transformēto šūnu plates pa nakti audzē 7mL LB barotnē ar plazmīdai raksturīgo rezistences antibiotiku;
- C. Šūnu suspensiju centrifugē pie 6800xg 5 min;
- D. Nolej supernantu un nogulsnes resuspendē 250 µL resuspendēšanas šķīduma;
- E. Iegūto suspensiju pārlej 1.5 µL mikromēģenē;
- F. Suspensijai pievieno 250 µL lizēšanas bufera un stobriņu lēnām invertē 4-6 reizes reizes;
- G. Pievieno 350 µL neitralizēšanas šķīduma un stobriņu lēnām invertē 4-6 reizes;
- H. Lai izgulsnētu hromosomas un citus šūnu pārpalikumus, centrifugē 5 min pie 13000xg;
- I. Ar pipeti pārvieto supernantu uz GenJET™ kolonu, kas ir ievietota mikromēģenē;
- J. Centrifugē kolonu 1 min pie 13000xg;
- K. No mikromēģenes izlej tur nonākušo caurplūdi;
- L. Kolonā ielej 500 µL mazgāšanas bufera

- M. Atkārtoti soli J un K;
- N. Izlej caurplūdi un 1 min pie 13000xg centrifugē tukšu kolonu ar tai pieķērušus DNS ;
- O. Membrānas centā uzpilda 50 µL 60°C karstu eluēšanas buferi un nogaida 2 min;
- P. Centrifugē 1 min pie 13000xg
- Q. Iegūtā DNS koncentrāciju nosaka ar Nanodrop;
- R. Ja nepieciešams, paraugu uzglabā -20°C.

3.2.16 DNS sekvencēšana

- A. Divos 100 µL PCR stobriņos ievieto:
 - a. 3 µL plazmīdas šķīdumu;
 - b. 3µL 5x sekvencēšanas buferi;
 - c. Vienā 1 µL Fw otrā 1µL Rs praimeru;
 - d. 1 µL BigDye.
- B. Abu PCR stobriņus īsu brīdi vorteksē un centrifugē;
- C. Stobriņus ievieto PCR automātiskajā termostatā, ko uzstāda uz sekojošiem cikliem:

2. Tabula

Uzstādītie automātiskā termostata ciklu parametri.

Table 2.

Setup of automatic thermostat cycle parameters

t, °C	laiks, s	ciklu skaits
95	180	1
95	10	30
50	5	
60	240	
72	300	1
4	līdz parauga izņemšanai	

- D. PCR produktus pārnes uz 1,5mL mikromēģenēm;
- E. Pievieno 16µL dejonizētu ūdeni un 64µL 70% etanola;
- F. Paraugus centrifugē pie 15000 RPM 4°C 15 min;
- G. Ar automātiskās pipetes uzgali, braucot gar pretējo malu kur ir sedimentējies DNS, uzmanīgi atsūc supernantu;
- H. Mikromēģenē ielej 100µL 70% etanola;
- I. Centrifugē 5 min pie 13000xg;
- J. Atkārti veic soļus G,H, I un vēlreiz G;

- K. Paraugu žāvē 10 min 50°C;
- L. Nogulsnēm pievieno 11 μL HiDi bufera;
- M. Stobriņu īsu brīdi vorteksē un centrifugē pie 5000xg;
- N. Paraugu karsē 5 min 95°C;
- O. Strauji atdzesē paraugus tos pārnesot no termobloka uz ledus vannu;
- P. Ja nepieciešams, paraugu uzglabā -20°C.

3.2.17 12.5 % Proteīnu SDS gela sagatavošana

- A. Iestiprina gelu turošās plāksnes gela gatavošanas iekārtā. Iestiprināšanas stingrību pārbauda, starp plāksnēm ielejot ūdeni, ko vēlāk atsūc ar filtrpapīru;
- B. Starp gelu turošajām plāksnītēm ievieto SDS-PAGE gela ķemmīti;
- C. Uz plāksnēm atzīmē līniju 1,5 – 2 cm zem ķemmītes saru galiem;
- D. Lai izveidotu sadalošo gelu vārglāzē ielej:
 - a. 3.3 mL dejonizēta ūdens;
 - b. 2.5 mL 40% akrilamīda;
 - c. 2 mL 1.5M Tris pH 8.8;
 - d. 80 μL 10% SDS;
 - e. 80 μL 10% APS;
 - f. Svarīgi ir kā pēdējo likt 8μL TEMED.
- E. Iegūto šķīdumu samaisa un ielej starp gelu saturošajām plāksnēm līdz iepriekš atzīmētajai līnijai.
- F. Starp gelu saturošajām plāksnēm ielej 1mL izopropanola;
- G. Kad gels pēc 5 – 20 min ir polimerizējies, ar filtrpapīru atsūc uz tā esošo izopropanolu;
- H. Lai izveidotu koncentrējošo gelu, vārglāzē ielej:
 - a. 2,9 mL dejonizēta ūdens,
 - b. 0,75 mL 40% akrilamīda,
 - c. 1,25 mL 0,5M Tris pH 6,8,
 - d. 50 μL 10% SDS,
 - e. 50 μL 10% APS,
 - f. Obligāti pēdējo pievieno 5 μL TEMED.
- I. Iegūto šķīdumu samaisa un ielej starp gelu saturošajām plāksnēm līdz gela augšdaļai;
- J. Starp gelu saturošajām plāksnēm uzmanīgi ievieto ķemmīti;

- K. Kad gela koncertējošā daļa ir polimerizējusies, to var uzreiz izmantot vai ilglaicīgai turēšanai novietot hermētiski noslēgtā, mitrā vietā 4°C temperatūrā.

3.2.18 Proteīnu kristalizēšana ar sēdošā piliena metodi

- A. Kristalizācijas plates apakšējās bedrītēs iepilina 50 µL precipitanta;
- B. Augšējās bedrītēs iepilina 0,4-1µL 7-25 mg/mL proteīna šķīdumu un precipitantu šķīdumu no precipitantu plates;
- C. Hermētiski aizlīmē kristalizācijas plati ar plēvi;
- D. Ik pa pāris dienām izmantojot gaismas mikroskopu pārbauda kristālu veidošanās procesu.

3.2.19 MALDI-TOF MS

- A. Pirms parauga sagatavošanas, kā pirmo sagatavo matricas šķīdumu - izšķīdina 7.6 mg (50 µmol) 2,5-DHAP 375 µL etanola un pievieno 125 µL (10 µmol) diamonija hidrogēn citrāta (izejas šķīdums: 27 mg diamonija hidrogēn citrāta 1.5 mL ūdens)
- B. Šķīdumu novorteksē un inkubē termostatā pie 55°C, kamēr tas kļūst dzidrs un to var izmantot MALDI-TOF maspektrometrijas analizējamu paraugu un kalibrācijas standarta II sagatavošanā;
- C. Stobriņā sajauc 2µL parauga, 2µL 2% TFA šķīduma un 2µL 2,5-DHAP matricas; pipetē pilienu līdz tas kļūst duļķains;
- D. 1 µL no maisījuma uznes uz MTP *AnchorChip* 400/384 T F
- E. Ļauj nožūt un izšķīdušajām vielām kristalizēties;
- F. Ievietoplasti MALDI-TOF maspektrometrā;
- G. Ievada sekojošos spektrometra parametrus, kas apkopoti zemāk esošajā tabulā (skat. 6. tab.);

3. Tabula

Uzstādītie MALDI-TOF masspektrometra parametri.

Table 3.

Installed MALDI-TOF masspectrometer parameters.

Parametrs	Vērtība	
Ionization mode	<i>Positive ions</i>	
Ion source 1	20kV	
Ion source 2	18,4kV	
Lens	5,8 kV	
Reflectors	<i>Off</i>	
Pulsed Ion Extraction	660ns	
Matrix superepression	Suppress up to	7000Da
	Mode	Gating
	Gating strenght	high
Shots	50	
Frequency	20Hz	
Laser power	100%	

H. Ar lāzeru šauj pa kristālu un summē datus līdz mažorā signāla intensitāte sasniedz 10^4 .

3.2.20 Kodolu magnētiskā rezonanses vairākdimensiju eksperimenti

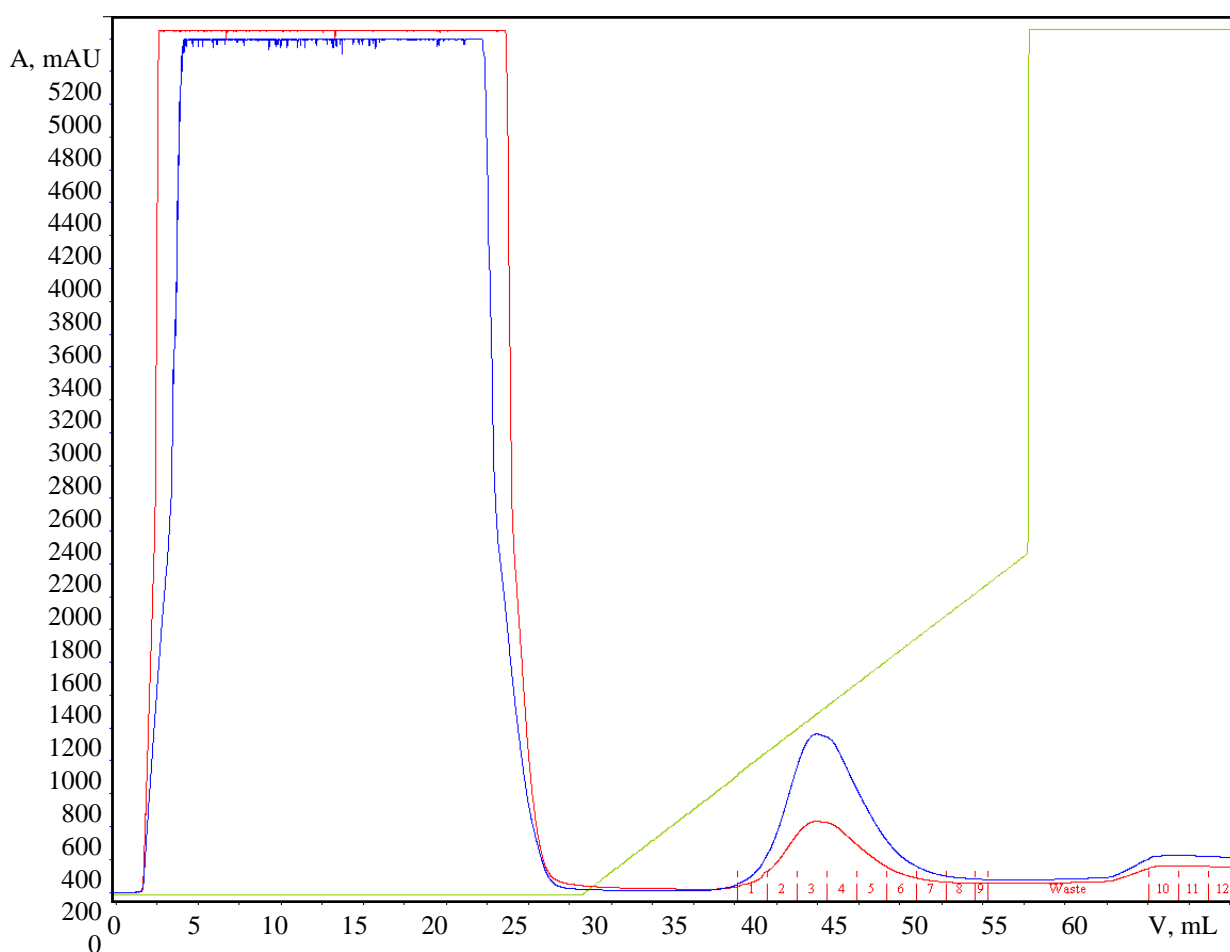
- A. Iekoncentrē paraugu KMR buferī līdz ~2mM koncentrācijai ar Amicon-ultra-15, 10K filtru
- B. Pievieno tam 5% D₂O, 1mM EDTA un 1x proteāžu inhibitorus;
- C. 600 μL parauga pārnes 5mmKMR ampulā;
- D. Ampulu ievieto paraugu turētājā tādā augstumā, lai analizējamais šķīdums pēc ievietošanas magnētā būtu novietots simetriski pret zondes spolēm;
- E. Ievieto paraugu spektrometrā;
- F. Atrod parauga *lock* signāla Larmora frekvenci;
- G. Pier Regulē zondes spoļu kapacitāti un induktivitāti;
- H. Iestāda magnētiskā lauka homogenitāti detektējamajā parauga tilpumā;
- I. Nosaka protonu un, ja nepieciešams slāpekļa un oglekļa 90 grādu impulsa garumu;
- J. Nosaka ūdens piesātināšanas frekvenci;
- K. Uzstāda katram eksperimentam raksturīgos parametrus: uzkrājumu skaitu, spektra centra frekvences un platumus, pierakstīto punktu skaitu, inkrementu skaitu netiešajā(s) dimensijās (skat. 7. pielikumu);
- A. Uzņem KMR spektrus (¹H, ¹H-¹⁵N HSQC, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCO, HN(CA)CO, HNHA, 3D ¹⁵N-NOESY (relaksācijas laiks 100 ms), 3D ¹³CaI-NOESY (relaksācijas laiks 100 ms), 3D ¹³C-aro NOESY (relaksācijas laiks 100 ms), ¹H-¹⁵N HSQC spektrus, kuros krosspīķu intensitātes ir modulētas atkarībā no izmantotā T₁ un T₂ relaksācijas laika vai arī no ¹⁵N{¹H} heterokodolu Overhauzera efekta) (8. un 9. pielikums).

4 REZULTĀTI UN DISKUSIJA

4.1 BBP28 ekspresija un attīrīšana

Darba gaitā gan saīsinātais BBP28 variants (BBP28(50-148)), gan pilna garuma variants BBP28(23-148) tika iegūts, transformējot to saturošu pETM11 vektoru BL21(DE)3 šūnās ar *HeatShock* metodi un ekspresējot to pēc vajadzības M9 vai LB barotnēs.

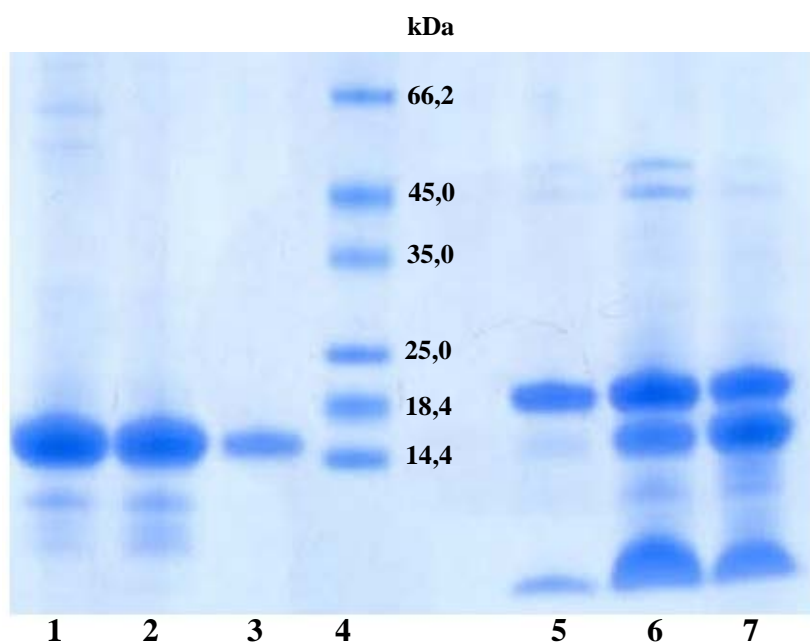
pETM11 vektorā pirms proteīna sekvences ir sešus histidīnus un TEV proteāzes šķelšanas saiti saturošas sekvences, kas ļāva darba izstrādes laikā BBP28 attīrīt no pārējiem *E.coli* proteīniem ar niķeļa afinitātes hromatogrāfiju. (skat. 2. att.). Pēc divām niķeļa afinitātes hromatogrāfijām proteīns tika papildus attīrīts ar gelfiltrāciju.



2. attēls Niķeļa afinitātes hromatogramma. Absorbciija pie 280 nm – zilā krāsā, absorbciija pie 254 nm – sarkanā krāsā, eluenta koncentrācija – zaļā krāsā.

Figure 2. Nickel affinity chromatogram. Blue – adsorption at 280 nm, red – adsorption at 254 nm, green – eluent concentration.

Visi proteīna ekspresijas un attīrīšanas etapu rezultāti tika pārbaudīti ar SDS-PAGE gela elektroforēzi (skat. 3. att.).



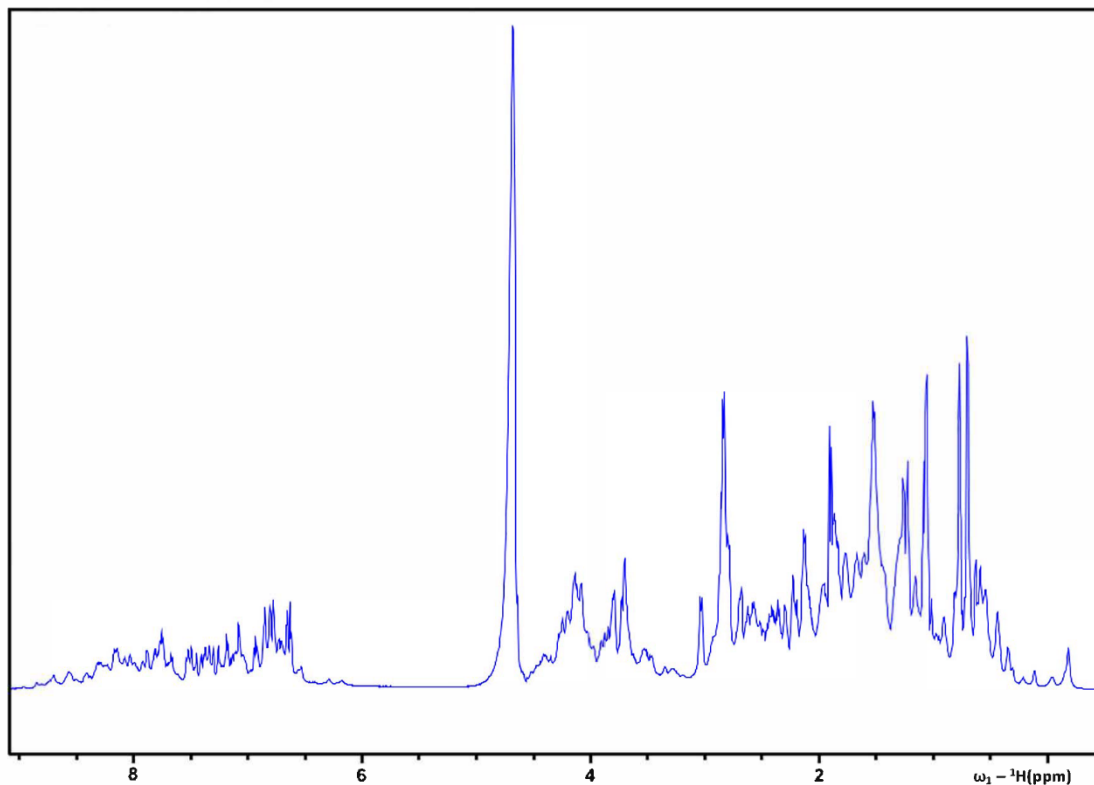
3. attēls BBP28(23-148) niķeļa afinitātes hromatogrāfijas SDS-PAGE gels. 1. – 3. Caurplūde, 4. Marķieris, 5.-7. Eluētā proteīna frakcijas.

Figure 3. SDS-PAGE polyacrylamide gel of full length BBP28 nickel affinity chromatography. 1.-3. Flow-through, 4. marker, 5 – 7. Eluted protein fractions.

4.2 BBP28(23-148)

4.2.1 BBP28(23-148) piemērotības izvērtēšana struktūras noteikšanai ar KMR

Lai pārliecinātos, ka BBP28 proteīns ir piemērots struktūras noteikšanai ar KMR, ar ^{13}C un ^{15}N izotopiem neiezīmētam BBP28(23-148) tika uzņemts 1D ^1H spektrs (skat. 4. att.).



4. attēls. BBP28(23-148) 1D ^1H spektrs.
Figure 4. BBP28(23-148) 1D ^1H spectrum.

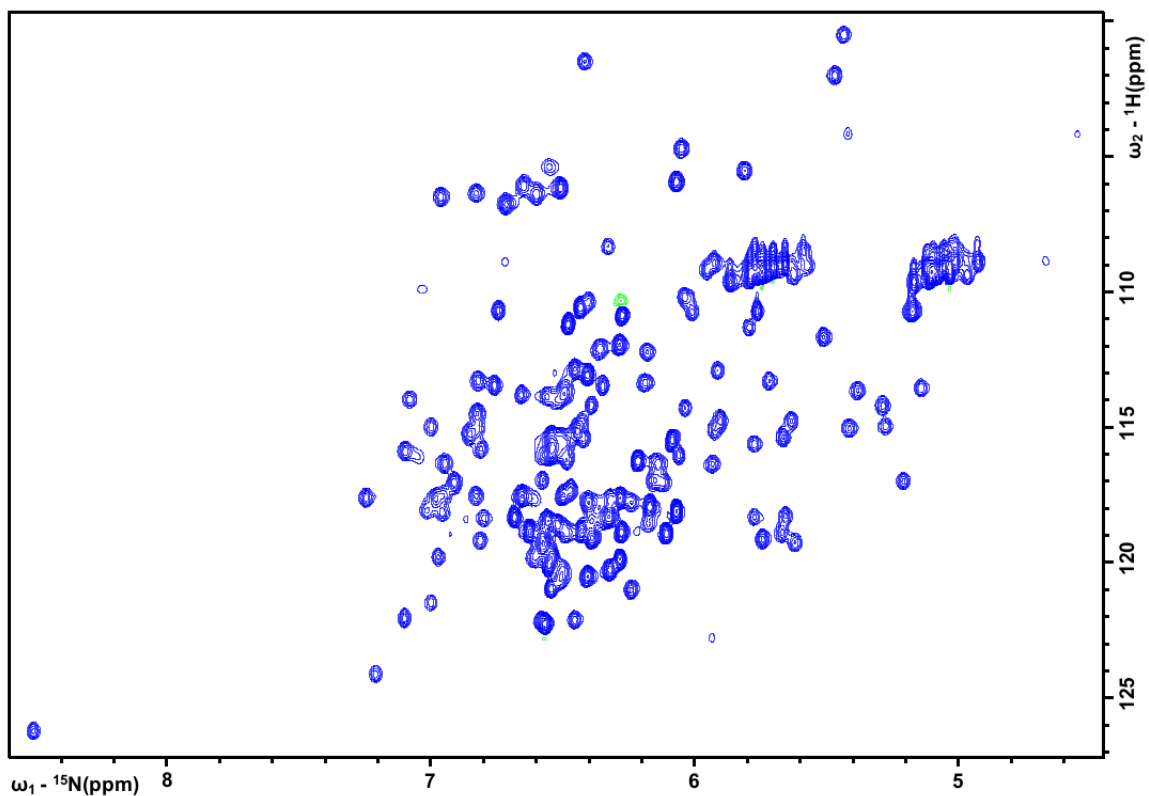
Spektrā ir redzams, ka gan H^{N} , gan alifātiskajā reģionā esošie signāli ir izkliedēti plašā ķīmisko nobīžu intervālā, kā arī tie ir relatīvi šauri. Šie novērojumi liecina, ka proteīns ir strukturēts un tas pie attiecīgajiem šķīduma apstākļiem neveido oligomērus ar lielu molekulu masu, kā arī nav apmaiņa starp dažādiem oligomērajiem stāvokļiem. Tas ļauj secināt, ka proteīns ir piemērots struktūras noteikšanai, izmantojot KMR.

4.2.2 BBP28(23-148) stabilitātes pētījumi

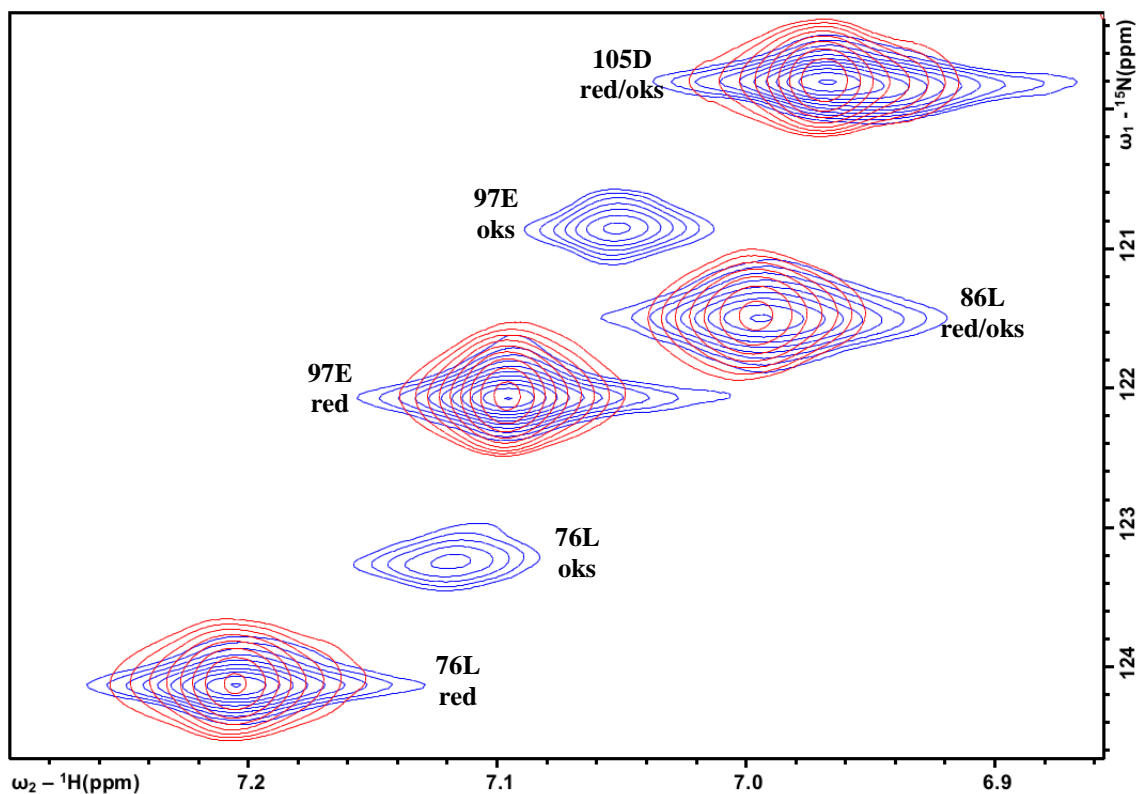
Pirms ^{13}C , ^{15}N proteīna ekspresijas struktūras noteikšanai, tika ekspresēts tikai ar ^{15}N izotopu iezīmēts proteīns. Tas tika veikts, lai pārbaudītu proteīna stabilitāti ilgākā laika periodā pret degradāciju un oksidēšanos, kā arī lai pārlicinātos par izvēlēto šķīduma apstākļu piemērotību. BBP28(23-148) ^1H - ^{15}N HSQC spektrā (skat. 5. att.) tika saskaitīti 137 krosspīķi, kas aptuveni atbilst sagaidāmajam signālu skaitam. Spektra centrālajā daļā ir novērojama pīķu pārklāšanās, kas liecina, ka daļa proteīna neveido stabilu otrējo struktūru (Bertini et al., 2012). Lai arī daudziem citiem borēlijas virsmas proteīniem nestrukturētā daļa atrodas N galā, kurā ir novērojamas maz hidrofobu aa (Zuckert, 2013), viennozīmīgi secināt, vai BBP28(23-148) gadījumā N-gals ir nestrukturēts, bez signālu attiecināšanas nebija iespējams.

Uzņemot ^1H - ^{15}N HSQC spektrus BBP28(23-148) ar 24 h starpību, tika novērots, ka daļai signālu laika gaitā intensitāte samazinājās, bet citiem – pieauga (skat. 6. att.). Ņemot vērā signālu, kuru intensitāte laika gaitā pieauga, ķīmiskās nobīdes un pusplatumu, tika secināts, ka tie nav proteīna degradācijas produkti. Pievienojot reducējošo aģentu (DTT), tika novērots, ka intensitāte tiem signāliem, kuri pirms DTT pievienošanas kļuva intensīvāki, samazinājās un otrādi – tiem signāliem, kuru intensitāte pirms DTT pievienošanas, samazinājās, pēc DTT pievienošanas intensitāte pieauga. Šis novērojums ļāva secināt, ka viens vai abi proteīnā esošie cisteīni ir oksidētā stāvoklī. Lai nodrošinātu, ka cisteīni ir reducētā stāvoklī, katrā BBP28(23-148) attīrīšanas stadijā tika pievienots 1mM DTT (Metzler, 1977). Tomēr uzņemot ^1H - ^{15}N HSQC spektru arī šādā veidā attīrītam proteīnam, tika secināts, ka DTT koncentrācija nav pietiekama, lai pilnībā novērstu cisteīnu oksidēšanos, un DTT koncentrācija analizējamajā paraugā tika palielināta līdz 5 mM.

Lai arī paaugstinātā DTT koncentrācija ļāva pilnībā novērst cisteīnu oksidēšanos, tomēr reducētā stāvoklī proteīns zaudēja stabilitāti spektros sāka parādīties signāli, kas atbilst degradācijas produktiem (skat. 7. att.).

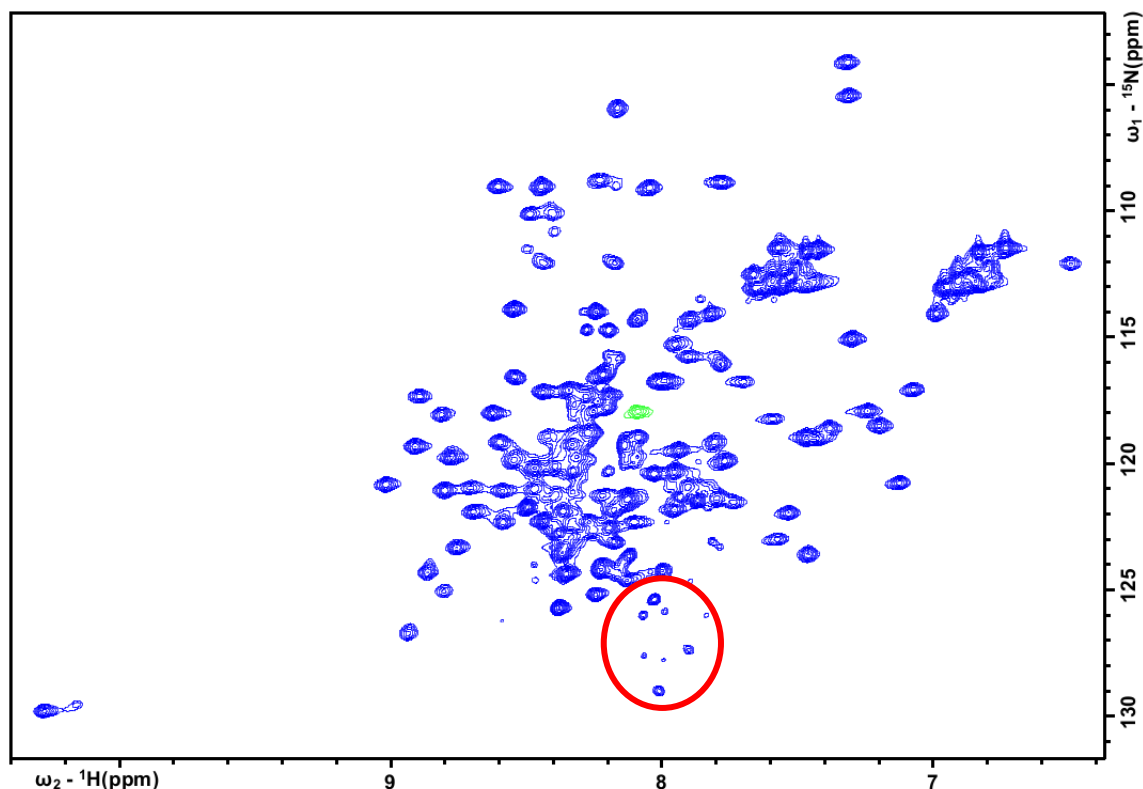


5. attēls. BBP28(23-148) ^1H - ^{15}N HSQC spektrs.
 Figure 5. BBP28(23-148) ^1H - ^{15}N HSQC spectrum.



6. attēls. Daļa no BBP28(23-148) ^1H - ^{15}N HSQC spektra bez DTT. Zilā krāsā – atskaites spektrs. Sarkanā krāsā –spektrs pēc 24 stundām.

Figure 6. Part of BBP28(23-148) ^1H - ^{15}N HSQC spectrum in absence of DTT. Blue – reference spectrum, red – spectrum recorded after 24 hours.



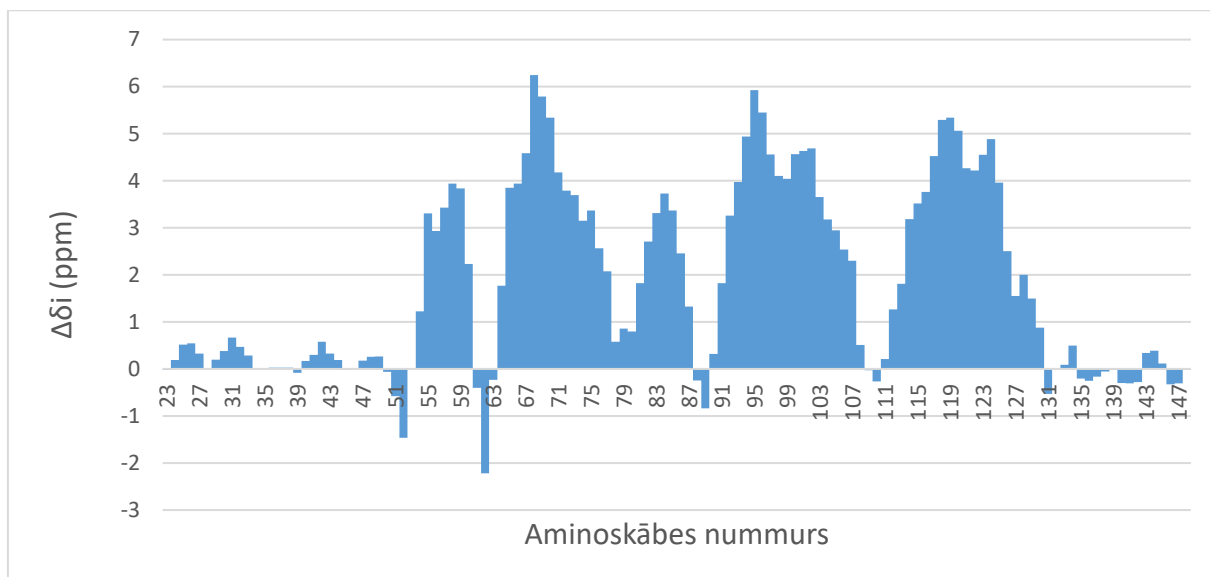
7. attēls. BBP28(23-148) ^1H - ^{15}N HSQC spektrs. Ar sarkanu apli ir apvilktā spektra daļa no signāliem, kas atbilst degradācijas produktiem.

Figure 7. BBP28(23-148) ^1H - ^{15}N HSQC spectrum. Some of the peaks corresponding to degradation products are labelled with red circle.

4.2.3 Reducēta BBP28(23-148) otrējo ķīmisko nobīžu analīze

Reducētam BBP28(23-148) tika uzņemti 3D spektri pamatķēdes ķīmisko nobīžu attiecināšanai. Ar iegūto spektru palīdzību no 130 proteīna aa pamatķēdes $^{\text{N}}\text{H}$, H^{N} , $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ atomu ķīmiskās nobīdes tika attiecinātas 106 aa. No 24 neattiecinātajām aa divas ir prolīni: prolīnam ^1H - ^{15}N HSQC spektrā nav novērojams krosspīķis. 18 no 22 neattiecinātajām aa atrodas N-galā. Šīm aa pārāk ātras amīda H^{N} protona apmaiņas dēļ ar ūdeni ^1H - ^{15}N HSQC spektrā krosspīķi nebija novērojami. Tas pierāda, ka N gals patiešām ieņem nesakārtotas virknes konformāciju.

Attiecinātajiem atomiem tika noteiktas otrējo ķīmisko nobīžu vērtības, izmantojot Poulsena metodi (Kjaergaard et al., 2011) un $\Delta\delta_i$ tika aprēķināts pēc formulas $(\Delta\text{C}\alpha - \Delta\text{C}\beta) + (\Delta\text{C}\alpha-1 - \Delta\text{C}\beta-1) + (\Delta\text{C}\alpha+1 - \Delta\text{C}\beta+1) / 3$ (Metzler et al., 1993), kur $\Delta\text{C}\alpha/\beta$ ir starpība starp eksperimentālo ķīmisko nobīdi attiecīgajam atomam un attiecīgās aa atoma ķīmisko nobīdi, aa ieņemot nesakārtotas virknes struktūru. Iegūtie dati tika apkopoti diagrammā (skat. 8. att.).



8. attēls. Reducēta BBP28(23-148) otrējo ķīmisko nobīžu analīze, kur $\Delta\delta_i$ aprēķināts kā $(\Delta C\alpha - \Delta C\beta) + (\Delta C\alpha-1 - \Delta C\beta-1) + (\Delta C\alpha+1 - \Delta C\beta+1) / 3$.

Figure 8. Analysis of random coil chemical shifts for reduced BBP28(23-148). Random coil shift for residue i calculated as $(\Delta C\alpha - \Delta C\beta) + (\Delta C\alpha-1 - \Delta C\beta-1) + (\Delta C\alpha+1 - \Delta C\beta+1) / 3$.

No aprēķinātajām $\Delta\delta$ vērtībām redzams, ka ir pieci posmi, kuros $\Delta\delta$ ir lielāka par vienu, kas liecina, ka attiecīgo posmos esošās aa veido α -spirāles. Savukārt, N- un C-galā esošajām aa (attiecīgi 23-52 un 131-148) $\Delta\delta$ aprēķinātās vērtības ir tuvas nullei, kas liecina par nestrukturētu proteīna reģionu.

4.2.4 Oksidēta BBP28(23-148) strukturālie pētījumi

4.2.4.1 Stabilitātes pārbaude

Ņemot vērā reducētā BBP28(23-148) nepiemērotību tālākiem struktūras pētījumiem relatīvi ātrās degradācijas dēļ, tika nolemts pārbaudīt BBP28(23-148), kurā cisteīns/i atrodas oksidētā stāvoklī, stabilitāti pret degradāciju. Degradācijas pazīmes, paraugu inkubējot 72 h istabas temperatūrā, ^1H - ^{15}N HSQC spektrā netika novērotas.

4.2.4.2 MALDI-TOF analīze

Parauga stabilitāte tika arī pārbaudīta, izmantojot MALDI-TOF masspektrometriju. Iegūtajos MS spektros piemaisījumi netika novēroti, bet tika novērota iespējama BBP28(23-148) oligomerizācija. Lai noteiktu, vai monomēru asociāciju veicina kovalentas vai nekovalentās mijiedarbības, ar MALDI-TOF tika pārbaudīti pieci paraugi, kam tika pievienots DTT dažādās koncentrācijās (0, 15, 25, 35 un 50 mM). Pirms eksperimenta paraugi tika trīs dienas inkubēti pie 6°C , lai nodrošinātu pilnīgu disulfīda saišu reducēšanu. Iegūtajos spektros (2. – 7. pielikums) ir redzams, ka proteīnā esošo disulfīdu saišu redukcijas pakāpe neietekmē novēroto oligomēru daudzumu.

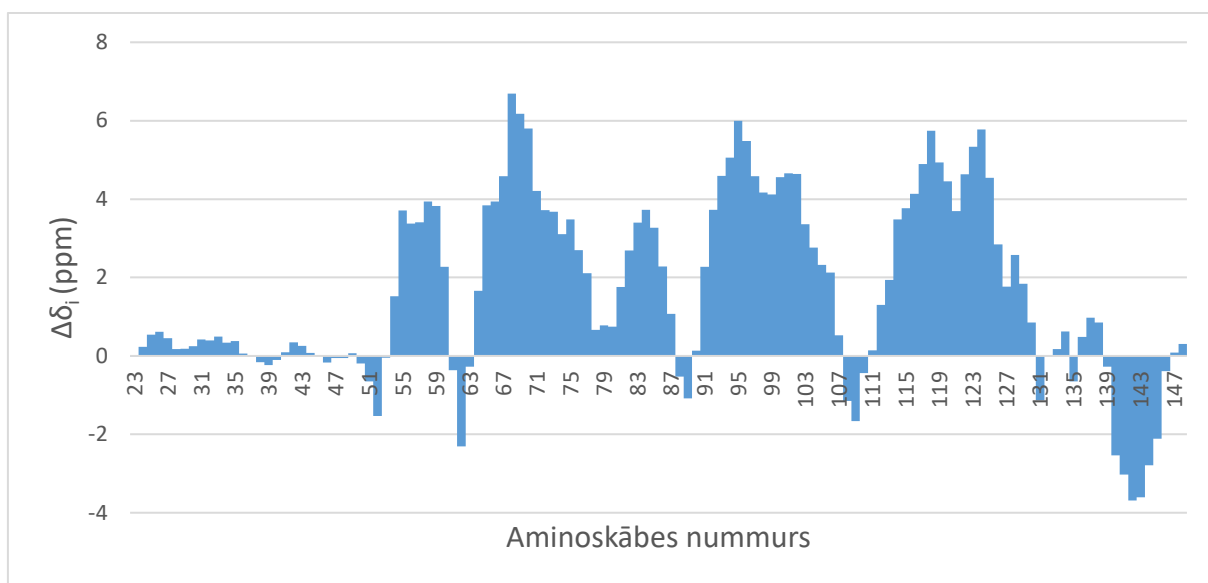
No iegūtajiem datiem var secināt, ka iepriekš novērotajā cisteīnu oksidēšanās procesā veidojas iekšmolekulāra disulfīda saite, līdz ar to proteīna oligomerizāciju veicina nevis cisteīnu disulfīdu saites, bet gan nekovalentas starpmolekulāras mijiedarbības.

4.3 His₆-TEV-BBP28(23-148)

Lai izvairītos no proteīna degradācijas produktu klātbūtnes struktūras noteikšanai ar KMR nepieciešamo spektru uzkrāšanas laikā, ar ¹³C un ¹⁵N izotopiem iezīmēts paraugs tika iegūts, proteīna attīrīšanas gaitā nepievienojot reducējošu aģentu, kā arī pēc niķeļa afinitātes hromatogrāfijas veikšanas, nešķeļot N-galā esošo histidīnu asti, tādējādi nodrošinot iespēju vērā ņemamas proteīna degradācijas gadījumā to attīrīt ar niķeļa afinitātes hromatogrāfiju.

4.3.1 Otrējo ķīmisko nobīžu analīze.

Iegūtajos proteīna spektros no 154 aa tika attiecinātas 146. Attiecināto aa Cα un Cβ atomiem tikai veikta otrējo ķīmisko nobīžu analīze. Atšķirībā no reducētā proteīna otrējo ķīmisko nobīžu analīzes datiem, oksidētā His₆-TEV-BBP26(23-148) C gala pēdējām septiņām aa iegūtā vērtība ir mazāka par vienu, kas liecina par izstieptas virknes (β-loksnes) otrējo struktūru (skat. 9. att.).



9. attēls. Oksidēta His₆-TEV-BBP28(23-148) proteīna otrējo ķīmisko nobīžu analīze, kur Δδ_i aprēķināts kā $(\Delta C\alpha - \Delta C\beta) + (\Delta C\alpha-1 - \Delta C\beta-1) + (\Delta C\alpha+1 - \Delta C\beta+1) / 3$.

Figure 9. Analysis of random coil chemical shifts for oxidized His₆-TEV-BBP28(23-148). Random coil shift for residue *i* calculated as $(\Delta C\alpha - \Delta C\beta) + (\Delta C\alpha-1 - \Delta C\beta-1) + (\Delta C\alpha+1 - \Delta C\beta+1) / 3$.

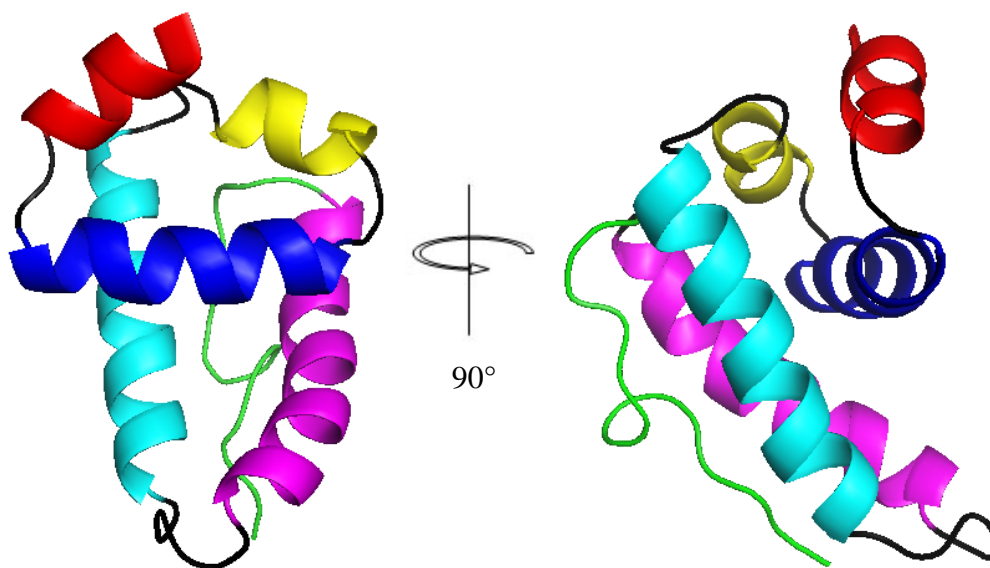
4.3.2 His₆-TEV-BBP28(23-148) struktūras aprēķins

Struktūras aprēķins, izmantojot KMR datus tika veikts ar programmu UNIO ATNOS/CANDID (Herrmann et al., 2002, Herrmann et al., 2002, Serrano et al., 2012). Struktūras aprēķināšanai tika izmantoti no NOESY spektriem iegūtie distances ierobežojumi un

programmas TALOS+ (Shen et al., 2009) ģenerētie dihedrālo leņķu ierobežojumi, kas tika aprēķināti izmantojot proteīna H^N, H α , C α , C β , C', N^H atomu attiecinātās ķīmiskās nobīdes.

His₆-TEV-BBP28(23-148) proteīna struktūru veido nestrukturēts N-gala segments (23-53), piecas α -spirāles (54-61, 64-77, 80-86, 91-107, 113-139) un 14 aa garš segments C-galā, kas kovalenti piesaistīts ar disulfīda saiti pie 4. un 5. α -spirāli savienojošās cilpas un kas tipisku otrējās struktūras elementu neveido (skat. 10. att.).

KEELLREKLS**EDQK**THLDWLKEALGN**DGEFDKFL**GYDE**SKI**KTALDHIK**SEL**DKCNGND**ADQQK**
TTFKQTV**Q**GAL**SG**GIDG**F**GS**NAV**TTC



10. attēls No KMR datiem aprēķinātā His₆-TEV-BBP28(23-148) proteīna struktūra un His₆-TEV-BBP28(23-148) sekvenca bez nestrukturētajām N un C gala aa. Gan struktūrā, gan proteīna sekvencē pirmā α -spirāle ir sarkanā krāsā, otrā α -spirāle ir tumši zilā krāsā, trešā α -spirāle ir dzeltenā krāsā, ceturtā α -spirāle ir gaiši zilā krāsā, piektā α -spirāle ir rozā krāsā, C-gala izstieptā virkne – zaļā krāsā un cilpu rajoni ir melnā krāsā.

Figure 10. From NMR data calculated His₆-TEV-BBP28(23-148) protein structure and His₆-TEV-BBP28(23-148) sequence, without unstructured N terminal aa. In structure and protein sequence first α -helix is colored red, second α -helix – dark blue, third α -helix – red, fourth α -helix – cyan, fifth α -helix – pink, C-terminal strand – green and loop regions are colored in black.

Ņemot vērā, ka nestrukturētais N-gala segments saturēja vairākus lizīnus un asparģīnskābes, kas pārklājās ar attiecīgo aa signāliem no strukturētās daļas, tas neļāva viennozīmīgi definēt vairākus sāls tiltus starp šīm aa strukturētajā daļā. Līdz ar to tika pieņemts lēmums iegūt proteīnu bez nestrukturētā N-gala segmenta un atkāroti veikt proteīna struktūranalīzi izmantojot gan KMR, gan proteīnu rentgenstaru difrakciju.

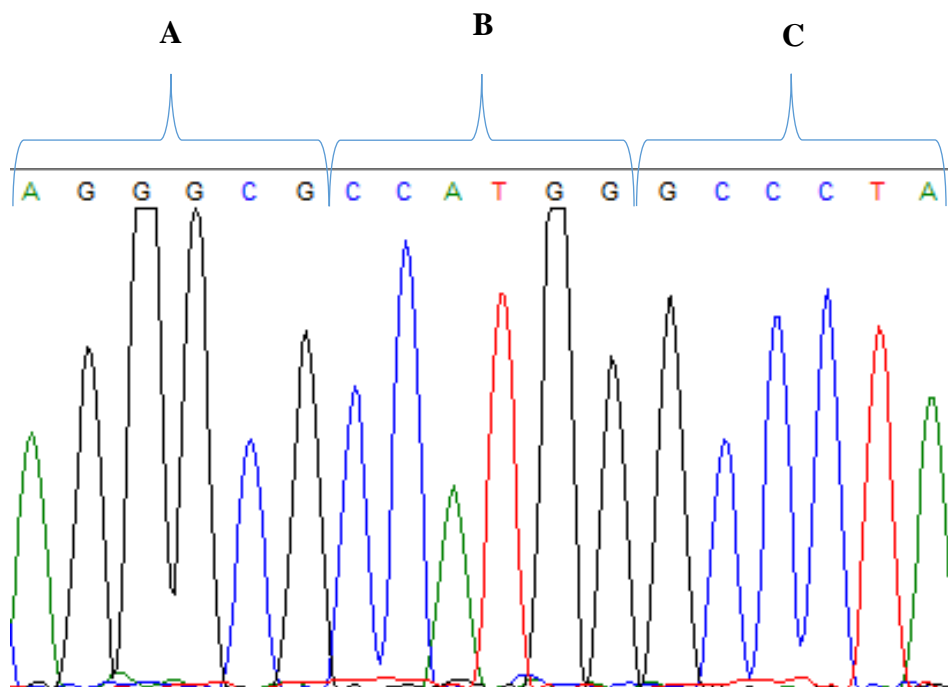
4.4 BBP28(50-148)

4.4.1 Vektora izveide

Vektors tika izveidots ar PCR metodi, kurā izmantojot pasūtītos oligonukleotīdus, kas papildus fragmentiem no BBP28(50-148) kodējošajām nt sekvencēm saturēja *Nco*I un *Xho*I

restrikcijas situs, amplificēja BBP28 strukturētās daļas kodējošo DNS. No amplifikācijas iegūtos fragmentus šķēla ar augstāk minētajām restriktāzēm un, izmantojot T4 DNS ligāzi, ligēja pETM11 vektorā.

Iegūtie vektori tika sekvencēti ar Sangeru sekvencēšanas metodi (skat. 11. att.).



11 .attēls. BBP28(50-148) Sangeru sekvencēšanas hromatogramma, kurā A – pETM11 vektora daļa, B – *NcoI* sekvenca, C – BBP28(50-148) sekvenca daļa.

Figure 11. Sanger sequencing chromatogram, where A – part from pETM11 vector, B – *NcoI* restriction site, C – part from BBP28(50-148) sequence.

4.4.2 BBP28(50-148) kristalizācija

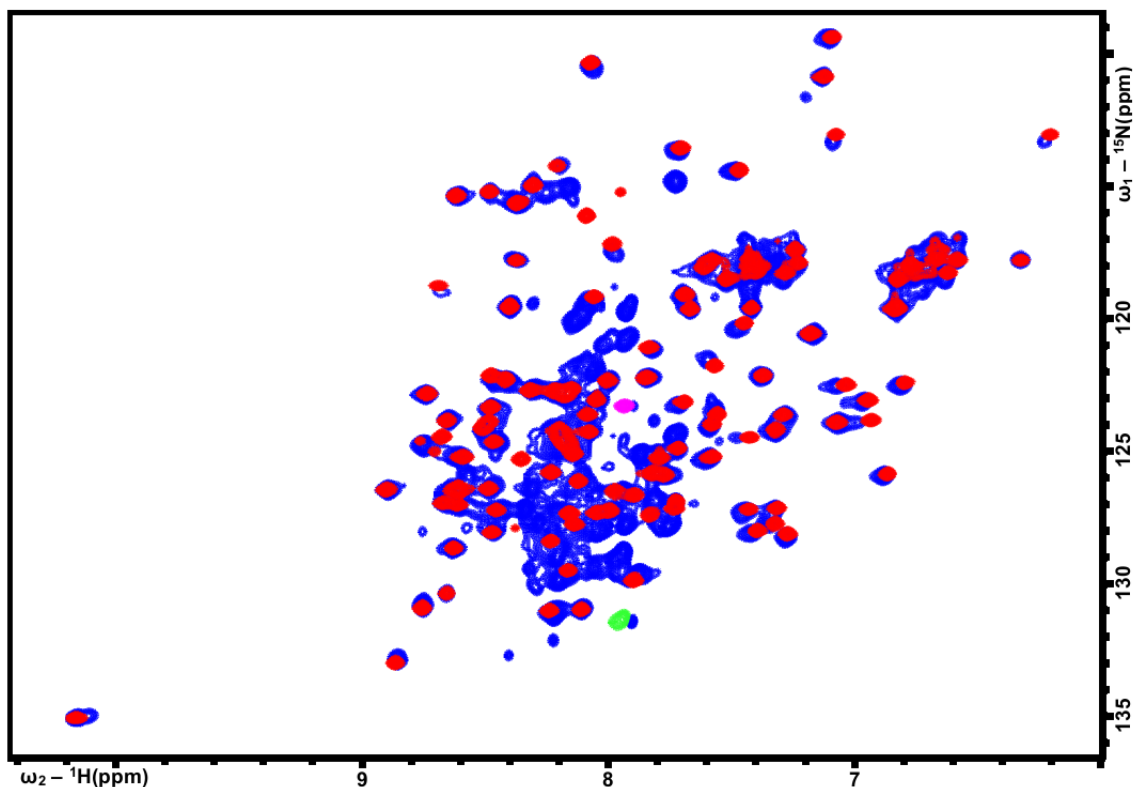
BBP28(50-148) proteīns tika kristalizēts 96 bedrīšu kristalizācijas plātēs ar sēdošā pilienu tehniku, izmantojot precipitantu komplektus JCGS+TM HT96 un Structure screen 1&2. Pirmajā kristalizācijas reizē tika izmantota 10 mg/mL proteīna koncentrācija. Tā kā divu nedēļu laikā ne proteīna kristalizācija, ne vērā ņemama precipitācija netika novērota, proteīna koncentrācija tika palielināta līdz 25 mg/mL. Pēc trim nedēļām joprojām lielākajā daļā kristalizācijas plašu bedrītēs netika novērota proteīna izkrišana nogulsnēs vai kristalizācija.

4.4.3 BBP28(50-148) struktūras noteikšana, izmantojot KMR

4.4.3.1 BBP28(50-148) un His₆-TEV-BBP28(23-148) ķīmisko nobīžu salīdzinājums

BBP28(50-148) ¹H-¹⁵N HSQC spektrā praktiski visiem signāliem ķīmiskās nobīdes sakrīta ar iepriekš analizētā His₆-TEV-BBP28(23-148) ķīmiskajām nobīdēm (skat. 12. att.). Tas liecina, ka N-gala nošķelšana neietekmē strukturētās daļas struktūru, kā arī ka nestrukturētais proteīna N-gala segments nemijiedarbojas ar proteīna strukturēto daļu. Ņemot vērā, ka ķīmiskās

nobīdes ^1H - ^{15}N HSQC spektrā atlikušajai BBP28 daļai praktiski nemainījās, proteīna pamatķēdes atomu attiecinātās ķīmiskās nobīdes tika pārnestas no His₆-TEV-BBP28(23-148) proteīna, iepriekš iegūto ķīmisko nobīžu pārbaudei uzņemot HNCA spektru.



12. attēls. BBP28(50-148) (sarkans) un His₆-TEV-BBP28(23-148) (zils) ^1H - ^{15}N HSQC spektru salīdzinājums.

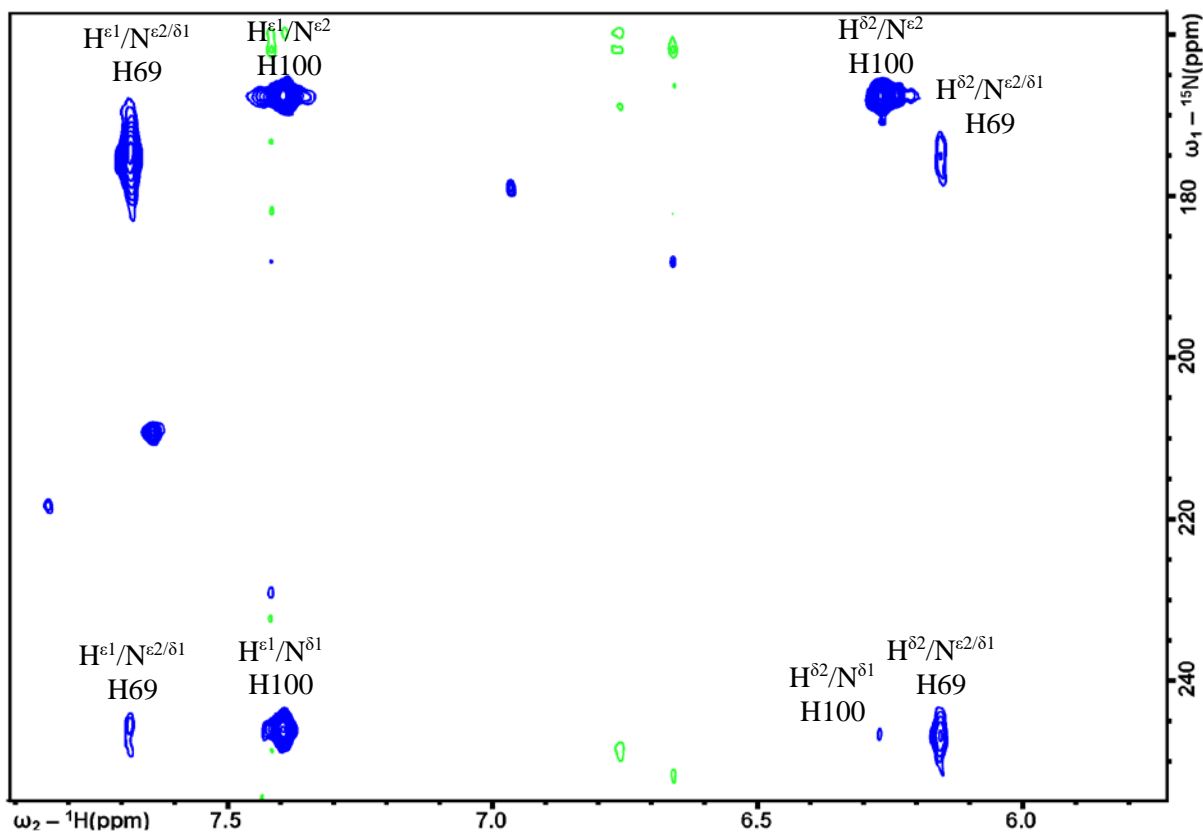
Figure 12. Overlay of ^1H - ^{15}N HSQC spectra for truncated BBP28(50-148) (red) and full length His₆-TEV-BBP28(23-148) (blue).

4.4.3.2 Histidīnu tautomerizācijas formas noteikšana

Lai noteiktu kādā jonizācijas stāvoklī ir His69 un His100, kā arī gadījumā, ja tā imidazola fragments ir neitrāli lādēts, BBP28(50-148) histidīnu tautomēro formu noteikšanai tika uzņemts ^1H - ^{15}N HSQC spektrs, kurā magnetizācija tiek pārnesta no histidīna $\text{H}^{\epsilon 1}$ un $\text{H}^{\delta 2}$ uz $\text{N}^{\epsilon 2}$ un $\text{N}^{\delta 1}$ (skat. 13. att.) (Pelton et al., 1993).

Iegūtajā spektrā 100. histidīnam ir redzami intensīvi $\text{H}^{\epsilon 1}\text{N}^{\delta 1}$, $\text{H}^{\epsilon 1}\text{N}^{\epsilon 2}$ un $\text{H}^{\delta 2}\text{N}^{\epsilon 2}$ un maz intensīvs $\text{H}^{\delta 2}\text{N}^{\delta 1}$ krosspīķis. Tas norāda, ka 100. histidīns ir $\text{N}^{\epsilon 1}$ -H tautomērajā formā.

Tajā pašā spektrā 69. histidīnam ir redzami divi intensīvi krosspīķi pie $\omega_1 = 174.4$ ppm, $\omega_2 = 7.7$ ppm un $\omega_1 = 246.6$ ppm, $\omega_2 = 6.2$ ppm un divi maz intensīvi krosspīķi pie $\omega_1 = 246.6$ ppm, $\omega_2 = 7.7$ ppm un $\omega_1 = 174.4$ ppm, $\omega_2 = 6.2$ ppm. Šādas krosspīķu nobīdes un intensitāšu attiecība nav izskaidrojama, ja histidīns atrastos vienā stabilā tautomērā stāvoklī. Bet tas ir izskaidrojams ar līdzsvaru starp diviem tautomēriem stāvokļiem, kur vienā no stāvokļiem protons ir lokalizēts uz $\text{N}^{\epsilon 1}$ slāpekļa, bet otrā – uz $\text{N}^{\delta 2}$ slāpekļa, pārākumā esot $\text{N}^{\delta 2}$ -H tautomēram.



13 .attēls. BBP28(50-148) His ^1H - ^{15}N HSQC spektrs.
 Figure 13. BBP28(50-148) His ^1H - ^{15}N HSQC spektrum.

4.4.3.3 T_1 (spina – režģa) un T_2 (spina-spina) relaksācijas laika mērījumi BBP28(50-148) pamatvirknes ^{15}N atomiem

Lai pārbaudītu, vai BBP28(50-148) šķīduma apstākļos pie kādiem tika noteikta proteīna struktūra, veido oligomērus, tika veikti R_1 un R_2 relaksācijas laika mērījumi ^{15}N atomiem (9. pielikums). Izmantojot sakarību

$$\tau_c \approx \frac{1}{4\pi\nu_N} \sqrt{6 \frac{T_1}{T_2} - 7} \quad (\text{Kay et al., 1989})$$

kur τ_c ir korelācijas laiks (ns), ν_N ir ^{15}N Larmora frekvence (Hz), T_1 un T_2 ir spina-režģa un spina-spina relaksācijas laiki (s), tika noteikts vidējais proteīna korelācijas laiks τ_c . τ_c vidēja izmēra globulāriem proteīniem aptuveni lineāri korelē ar proteīna molekulmasu. τ_c aprēķinā vērā tika ņemti tikai strukturētie proteīna apgabali, kam šķīdumā novērojama tikai kopējā visas molekulas kustība.

Dati molekulmasas un τ_c korelācijas taisnes konstruēšanai tika iegūti no Paolo Rossi 2010. gada publikācijas (10. pielikums) (Rossi et al., 2010). No konstruētās taisnes tika iegūts, ka BBP28(50-148) molekulmasa šķīdumā ir aptuveni 10,3 līdz 11,8 kDa, kas atbilst proteīna

patiesajai molekulmasai 11,0 kDa. Līdz ar to var secināt, ka proteīns šķīdumā atrodas monomēra formā.

4.4.3.4 Struktūras aprēķins

BBP28(50-148) struktūra no KMR datiem tika aprēķināta, izmantojot programmas UNIO ATNOS/CANDID (Herrmann et al., 2002, Herrmann et al., 2002) un CYANA (Güntert et al., 1997). Struktūras enerģijas minimizēšana tika veikta, programmā CNS (Brunger, 2013). BBP28(50-148) KMR struktūras aprēķināšanā izmantotie ierobežojumi un struktūras raksturlielumi pēc tās minimizācijas ūdens vidē apkopoti 3. tabulā.

3. Tabula

BBP28(50-148) KMR struktūras aprēķināšanā izmantotie ierobežojumi un struktūras raksturlielumi pēc tās minimizācijas ūdens vidē.

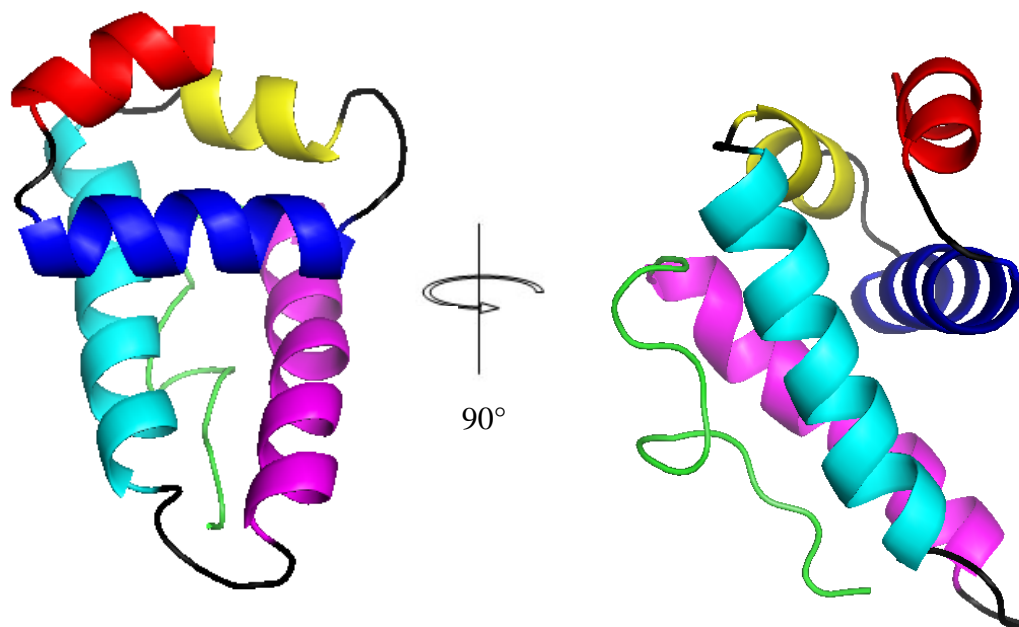
Table 3.

Constraints for BBP28(50-148) NMR structure calculation structure statistics after minimization

Distances ierobežojumi struktūras aprēķināšanai	
Kopējais kOe skaits	2181
Starp atomiem vienas un tās pašas aa ietvaros	539
Starp atomiem no dažādām aa	1642
Sekvenciāli ($ i-j =1$)	487
Vidēja attāluma ($1 < i-j \leq 4$)	594
Liela attāluma ($ i-j \geq 5$)	561
Aprēķinātās struktūras raksturlielumi	
Ierobežojumu pārkāpumi un standartnovirzes	
Distances ierobežojumi (Å)	$0,0556 \pm 0,006$
Lielākais distances ierobežojuma pārkāpums	$2,72 \pm 0,1$
Novirzes no ideālās ģeometrijas	
Saišu garumi (Å)	0.0061 ± 0.0001
Saišu leņķi (°)	$0,674 \pm 0.013$
Novirzes no planaritātes (°)	1.684 ± 0.076
Vidējā kvadrātiskā standartnovirze starp atomiem rēķināta salīdzinot ik divas struktūras (7.-98. aminokābei)	
Visiem neūdeņraža atomiem	$0,85 \pm 0,07$
Pamatvirknes atomiem	$0.50 \pm 0,07$

Tāpat kā His₆-TEV-BBP28(23-148) struktūra, BBP28(50-148) sastāv no piecām α -spirālēm un aa virknes C-galā, kas ar disulfīda saiti kovanlenti saistīta ar cilpu, kas savieno 4. un 5. α spirāli (skat. 14. att).

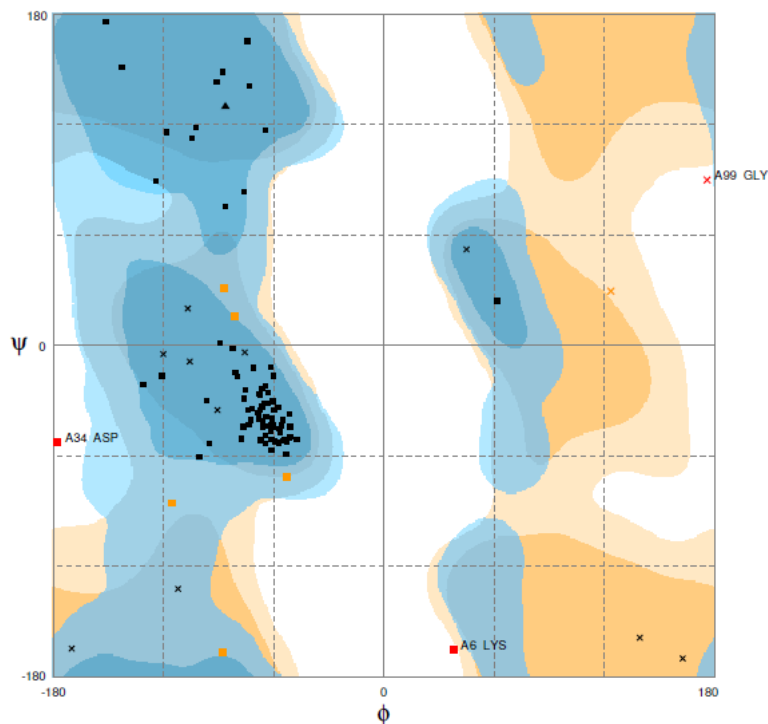
KEELLREKLS**EDQK**THLDWLKEALGNDG**EFDKFLGYDESKIKTALDHIKSEL**DKCNGND**ADQ**QK
TTFKQTVQ**GALSGGIDGFGS**NNAV**TT**C



14. attēls No KMR datiem aprēķinātā BBP28(50-148) proteīna struktūra un BBP28(50-148) sekvenca bez nestrukturētajām N un C gala aa. Gan struktūrā, gan proteīna sekvencē pirmā α -spirāle ir sarkanā krāsā, otrā α -spirāle ir tumši zilā krāsā, trešā α -spirāle ir dzeltenā krāsā, ceturta α -spirāle ir gaiši zilā krāsā, piektā α -spirāle ir rozā krāsā, C-gala izstieptā virkne – zaļā krāsā un cilpu rajoni ir melnā krāsā.

Figure 14. From NMR data calculated BBP28(23-148) protein structure and BBP28(23-148) sequence where unstructured N terminal aa has been omitted. In structure and protein sequence first α -helix is colored red, second α -helix – dark blue, third α -helix – red, fourth α -helix – cyan, fifth α -helix – pink, C-terminal strand – green and loop regions are colored black.

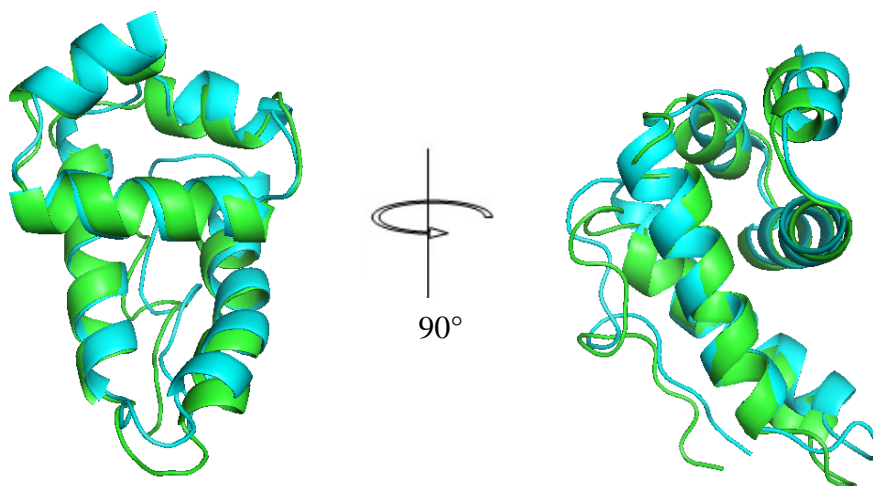
Iegūtās struktūras Ramačandra diagrammā 93% Φ un ψ leņķu ir vēlamā, 6% ir atļautā un 1% ir neatļautā konformācijā (skat. 15 att.).



15. attēls. BBP28(50-148) Ramačandra Φ un ψ leņķu diagramma. Tumši oranžā krāsā – glicīnu vēlamās zonas, gaiši oranžā krāsā – glicīnu atļautās zonas, tumši zilā krāsā – pārējo aa vēlamās zonas, gaiši zilā krāsā – pārējo aa atļautās zonas, baltā krāsā – neatļautās zonas.

Figure 15. Ramachandran plot of BBP28(50-148) Φ and ψ angles. Dark orange – glycine favored region, light orange – glycine allowed region, dark blue – favored region for other aa, light blue – allowed region for other aa, white – restricted region.

Atšķirībā no His₆-TEV-BBP28(23-148) struktūras, BBP28(50-148) ir nedaudz mainījies 1., 2. un 4. α spirāles novietojums (skat. 16. att.).



16. attēls. Aprēķināto struktūru salīdzinājums (attēlotas 54. līdz 144. aa)

Figure 16. Comparison of calculated structures (only aa 54 to 144 have been visualized)

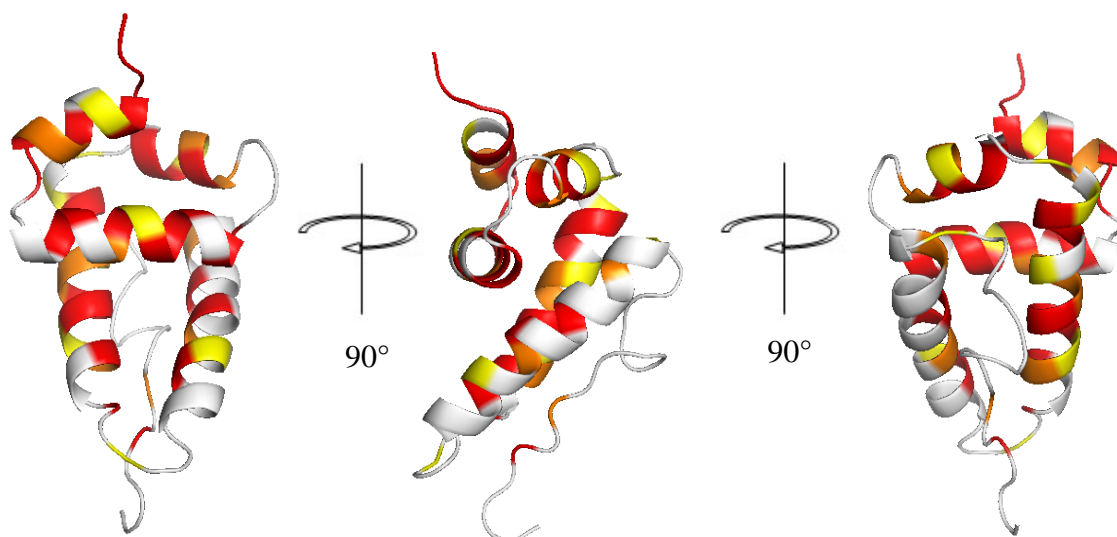
4.4.4 BBP28 salīdzinājums ar citiem proteīniem

A. Sekvences salīdzinājums

BBP28 aa sekvence datubāzē Uniprot (Serrano et al., 2012), izmantojot funkciju BLAST, tika salīdzināta ar citām 50 zināmām homologām proteīnu sekvencēm no *Borrelia* sugas celmiem.

Ievērojama sekvences variācija homologos ir novērojama proteīna C gala segmentam no 109. līdz 148. aa, kas atbilst BBP28 proteīna pēdējai α -spirālei un β ķēdei (skat. 17. att.). No 124. līdz 148. aa, vienīgi Cys144 ir saglabājies nemainīgs visos homologajos proteīnos. Tas, ka arī Cys108 ir saglabājies nemainīgs liecina, ka disulfīda saite ir nozīmīga BBP28 sastāvdaļa tā funkcijas īstenošanai. Attēlotajā BBP28 struktūrā ir redzams, ka bez jau minētajiem cisteīniem, konservatīvākas BBP28 aa ir tās, kas vērstas uz proteīna iekšpusi. Tas izskaidrojams ar to nepieciešamību proteīna struktūras saglabāšanai. (skat. 17. att.).

```
PKSKEELLREKLSSEDQKTHLDWLKEALGNDGEFDFKFLGYDESKIKTALDHIKSELDKCNGND  
ADQQKTFKQTVQGALSGGIDGFGSNNNAVTTGNGS
```



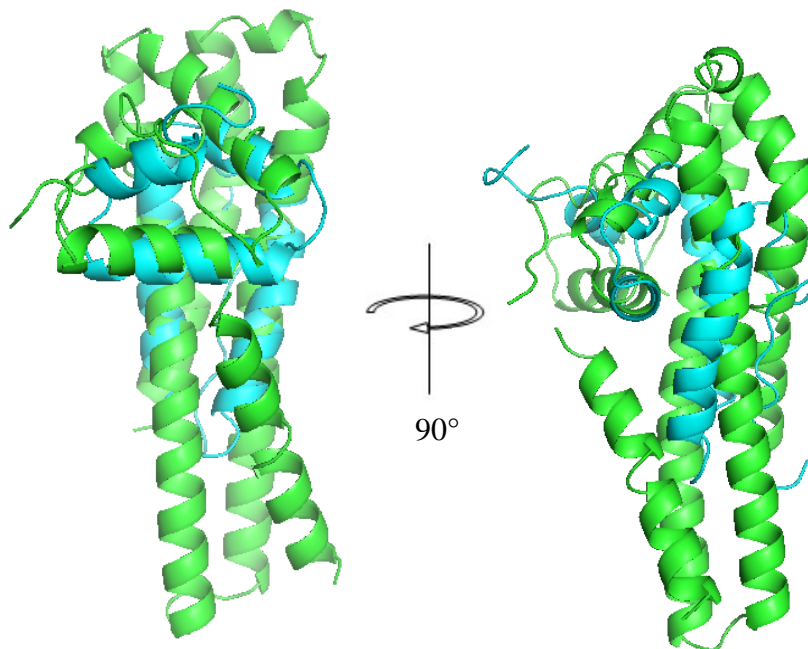
17. attēls. BBP28(50-148) sekvences salīdzinājums ar 50 līdzīgākajiem atrastajiem homologajiem *B. Burgdorferi* proteīniem no Uniprot. Augšā sekvence, kur homologu sekvencu līdzība attēlota no sarkanas (aa saglabājusies visos homologos) līdz baltai (nav novērojama izteikta aa saglabāšanās homologu vidū). Strukturētās BBP28(50-148) daļas apvilktas ar taisnstūri. Zem sekvences, struktūras attēlojums, izmantojot to pašu krāsu kodu kā sekvencei.

Figure 17. Similarity of BBP28 sequence to 50 other homologous *Borrelia* proteins from Uniprot. Top - BBP28 sequence, where homologue sequence similarity decreases from red (aa which are strictly conserved between homologue proteins) to white (no conservation between homologue proteins). In sequence BBP28 structured parts are labeled with rectangles. Below the sequence, BBP28(50-148) structure where the same coloring scheme as for sequence is used.

B. Struktrūras salīdzinājums

Aprēķinātā BBP28(50-148) struktūra tika ievietota serverī Dali (Holm and Rosenström 2010), kurā tā tika salīdzināta ar citām struktūrām no PDB (Holm and Rosenström 2010). Analīzē tika atlasītas 1013 proteīnu struktūras, kurām līdzības koeficients Z ir lielāks par 2, kas

norāda uz ievērojamu līdzību. No šiem proteīniem pieci ir *B. burgdorferi* virsmas proteīni – BBA64, BBA65, BBA66, BBA68 un BBA73. Lai gan tiem ar BBP28 nav novērojama sekvenciāla līdzība (5 līdz 16 %), to Z rezultāti bija robežās no 3,3 BBA64 līdz 4,0 BBA66 proteīnam (skat. 18. att.).



18. attēls. BBP28(50-148) (attēlots 54. līdz 144. aa) un BBA66 struktūru salīdzinājums.
Figure 18. Comparison of BBP28(50-148) (only aa 54 to 144 have been visualized) and BBA66 structures.

5 SECINĀJUMI

1. E.coli ekspresijas sistēma ir piemērota BBP28 ekspresijai.
2. Noteiktas His₆-TEV-BBP28(23-148) un BBP28(50-148) struktūras, izmantojot KMR
3. BBP28 reducētā forma sastāv no piecām α -spirālēm un nestrukturēta attiecīgi 29 un 17 aa gara N- un un C-gala.
4. BBP28 oksidētā formā reducētās formas nestrukturētais C-gals ieņem izstieptas virknes konformāciju.
5. Pētītais BBP28 proteīns satur iekšmolekulāru disulfīda saiti, kas, iespējams, ir svarīga sastāvdaļa BBP28 funkciju izpildei.
6. BBP28 ir novērojama strukturāla līdzība ar BBA64, BBA65, BBA66, BBA68 un BBA73 *B. burgdorferi* lipoproteīniem.

6 PATEICĪBAS

Darba autors izsaka pateicību darba vadītājam Maģ. Ķīm. Mārtiņam Otkovam, Latvijas Organiskās sintēzes institūta KMR laboratorijas vadītājam Edvardam Liepiņam par iespēju izstrādāt bakalaura darbu viņa vadītajā laboratorijā, kā arī kolēģiem Rihardam Aleksim, Atim Jēkabsonam, Diānai Zeļencovai, Zigmantam Toleikim un Kristapam Jaudzemam par konsultatīvo palīdzību darba izstrādes procesā, Kalvim Brangulim par iespēju kristalizēt proteīnu Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā un Dāvidam Fridmanim, Inai Baļķei par iespēju strādāt ar MALDI-TOF masspektrometru un izveidotā vektora sekvencēšanu.

7 IZMANTOTĀ LITERATŪRA

2017. UniProt: the universal protein knowledgebase - *Nucleic Acids Research*, 45(D1): D158-D169.

Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J. C., Assous M. and Grimont P. A. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis - *Int J Syst Bacteriol*, 42(3): 378-383.

Bertini I., McGreevy K. S. and Parigi G. 2012. *NMR of Biomolecules: Towards Mechanistic Systems Biology*: Wiley, 620 pp.

Bieri M., d'Auvergne E, Fau - Gooley P. R. and Gooley P. R. 2011. relaxGUI: a new software for fast and simple NMR relaxation data analysis and calculation of ps-ns and μ s motion of proteins - *J. Biomol. NMR.* , 50(1573-5001 (Electronic)): 147-155.

Bratton R. L., Whiteside J. W., Hovan M. J., Engle R. L. and Edwards F. D. 2008. Diagnosis and Treatment of Lyme Disease - *Mayo Clinic Proceedings*, 83(5): 566-571.

Brooks C. S., Hefty P. S., Jolliff S. E. and Akins D. R. 2003. Global analysis of *Borrelia burgdorferi* genes regulated by mammalian host-specific signals - *Infect Immun*, 71(6): 3371-3383.

Brunger A. T. (2013). CNS (Crystallography and NMR System). *Encyclopedia of Biophysics*. G. C. K. Roberts. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 326-327.

Bunikis J. and Barbour A. G. 1999. Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins - *Infect Immun*, 67(6): 2874-2883.

Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O. and Fraser C. M. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* - *Mol Microbiol*, 35(3): 490-516.

Delaglio F., Grzesiek S, Fau - Vuister G. W., Vuister Gw Fau - Zhu G., Zhu G Fau - Pfeifer J., Pfeifer J Fau - Bax A. and Bax A. 1995. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes - *J. Biomol. NMR.* ,(0925-2738 (Print)): 6.

Dowdell A. S., Murphy M. D., Azodi C., Swanson S. K., Florens L., Chen S. and Zuckert W. R. 2017. Comprehensive Spatial Analysis of the *Borrelia burgdorferi* Lipoproteome Reveals a Compartmentalization Bias toward the Bacterial Surface - *J Bacteriol*, 199(6).

Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J. F., Fleischmann R.

D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fuji C., Cotton M. D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. O. and Venter J. C. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi* - *Nature*, 390(6660): 580-586.

Fraser C. M., Norris S. J., Weinstock G. M., White O., Sutton G. G., Dodson R., Gwinn M., Hickey E. K., Clayton R., Ketchum K. A., Sodergren E., Hardham J. M., McLeod M. P., Salzberg S., Peterson J., Khalak H., Richardson D., Howell J. K., Chidambaram M., Utterback T., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Cotton M. D., Fujii C., Garland S., Hatch B., Horst K., Roberts K., Sandusky M., Weidman J., Smith H. O. and Venter J. C. 1998. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete - *Science*, 281(5375): 375-388.

Glockner G., Lehmann R., Romualdi A., Pradella S., Schulte-Spechtel U., Schilhabel M., Wilske B., Suhnel J. and Platzer M. 2004. Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome - *Nucleic Acids Res*, 32(20): 6038-6046.

Glockner G., Schulte-Spechtel U., Schilhabel M., Felder M., Suhnel J., Wilske B. and Platzer M. 2006. Comparative genome analysis: selection pressure on the *Borrelia* vls cassettes is essential for infectivity - *BMC Genomics*, 7: 211.

Güntert P., Mumenthaler C. and Wüthrich K. 1997. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program Dyana1 Edited by P. E. Wright - *Journal of Molecular Biology*, 273(1): 283-298.

Herrmann T., Güntert P. and Wüthrich K. 2002. Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS - *Journal of Biomolecular NMR*, 24(3): 171-189.

Herrmann T., Güntert P. and Wüthrich K. 2002. Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA - *Journal of Molecular Biology*, 319(1): 209-227.

Holm L. and Rosenström P. 2010. Dali server: conservation mapping in 3D - *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_2): W545-W549.

Hubalek Z. 2009. Epidemiology of lyme borreliosis - *Curr Probl Dermatol*, 37: 31-50.

Kay L. E., Torchia Da Fau - Bax A. and Bax A. 1989. Backbone dynamics of proteins as studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease - *American Chemical Society*, 28(0006-2960 (Print)): 8972-8979

Kenedy M. R., Lenhart T. R. and Akins D. R. 2012. The Role of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins - *FEMS Immunol Med Microbiol*, 66(1): 1-19.

- Kimsey R. B. and Spielman A. 1990. Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix - *J Infect Dis*, 162(5): 1205-1208.
- Kjaergaard M., Brander S. and Poulsen F. M. 2011. Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: effects of temperature and pH - *Journal of Biomolecular NMR*, 49(2): 139-149.
- Luft B. J., Xu Y. and Bruno J. F. (2011). *Borrelia burgdorferi* cell envelope protein array, Google Patents.
- Metzler D. 1977. *Biochemistry the Chemical Reactions Of Living Cells* -.
- Metzler W. J., Constantine K. L., Friedrichs M. S., Bell A. J., Ernst E. G., Lavoie T. B. and Mueller L. 1993. Characterization of the three-dimensional solution structure of human profilin: ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments and global folding pattern - *Biochemistry*, 32(50): 13818-13829.
- Nigrovic L. and Thompson K. 2007. The Lyme vaccine: a cautionary tale - *Epidemiol Infect*, 135(1): 1-8.
- Ojaimi C., Brooks C., Casjens S., Rosa P., Elias A., Barbour A., Jasinskas A., Benach J., Katona L., Radolf J., Caimano M., Skare J., Swingle K., Akins D. and Schwartz I. 2003. Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays - *Infect Immun*, 71(4): 1689-1705.
- Pelton J. G., Torchia D. A., Meadow N. D. and Roseman S. 1993. Tautomeric states of the active-site histidines of phosphorylated and unphosphorylated IIIIGlc, a signal-transducing protein from *Escherichia coli*, using two-dimensional heteronuclear NMR techniques - *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 2(4): 543-558.
- Pinto D. S. 2002. Cardiac manifestations of Lyme disease - *Med Clin North Am*, 86(2): 285-296.
- Poland G. A. and Jacobson R. M. 2001. The prevention of Lyme disease with vaccine - *Vaccine*, 19(17-19): 2303-2308.
- Purser J. E. and Norris S. J. 2000. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi* - *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25): 13865-13870.
- Rossi P., Swapna G. V. T., Huang Y. J., Aramini J. M., Anklin C., Conover K., Hamilton K., Xiao R., Acton T. B., Ertekin A., Everett J. K. and Montelione G. T. 2010. A microscale protein NMR sample screening pipeline - *Journal of Biomolecular NMR*, 46(1): 11-22.
- Serrano P., Fau P. B., Fau M. B., Fau G. M., Fau H. T. and Wuthrich K. 2012. The J-UNIO protocol for automated protein structure determination by NMR in solution - *J. Biomol. NMR.* , 53(1573-5001 (Electronic)): 341-354.

Serrano P., Pedrini B., Mohanty B., Geralt M., Herrmann T. and Wüthrich K. 2012. The J-UNIO protocol for automated protein structure determination by NMR in solution - *Journal of Biomolecular NMR*, 53(4): 341-354.

Shapiro E. D. 2014. *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease) - *Pediatrics in Review*, 35(12): 500-509.

Shen Y., Delaglio F., Cornilescu G. and Bax A. 2009. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts - *Journal of Biomolecular NMR*, 44(4): 213-223.

Steere A. C. 1989. Lyme disease - *N Engl J Med*, 321(9): 586-596.

Tilly K., Rosa P. A. and Stewart P. E. 2008. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi* - *Infect Dis Clin North Am*, 22(2): 217-234.

Tokarz R., Anderton J. M., Katona L. I. and Benach J. L. 2004. Combined effects of blood and temperature shift on *Borrelia burgdorferi* gene expression as determined by whole genome DNA array - *Infect Immun*, 72(9): 5419-5432.

van Dam A. P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B. M., Spanjaard L., Ramselaar A. C., Kramer M. D. and Dankert J. 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis - *Clin Infect Dis*, 17(4): 708-717.

Willyard C. 2014. Resurrecting the 'yuppie vaccine' - *Nat Med*, 20(7): 698-701.

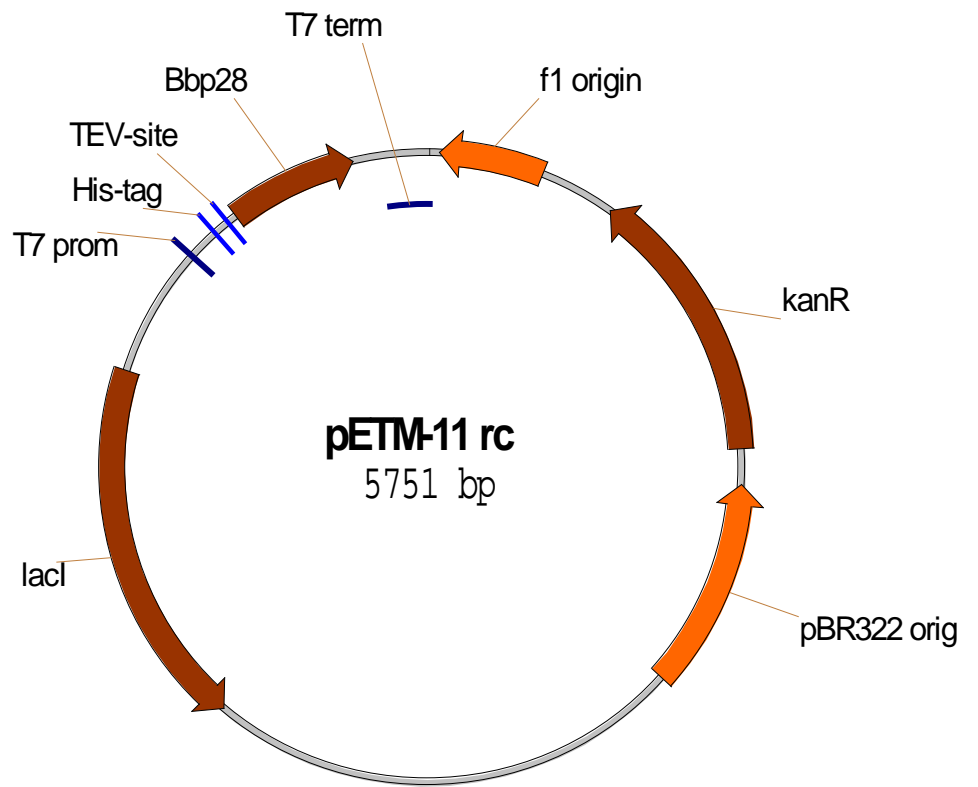
Yang X., Popova T. G., Hagman K. E., Wikel S. K., Schoeler G. B., Caimano M. J., Radolf J. D. and Norgard M. V. 1999. Identification, Characterization, and Expression of Three New Members of the *Borrelia burgdorferi* Mlp (2.9) Lipoprotein Gene Family - *Infect Immun*, 67(11): 6008-6018.

Zuckert W. R. 2013. A call to order at the spirochaetal host-pathogen interface - *Mol Microbiol*, 89(2): 207-211.

PIELIKUMI

1. Pielikums

pETM-11 plazmīdas shematiskais attēlojums.

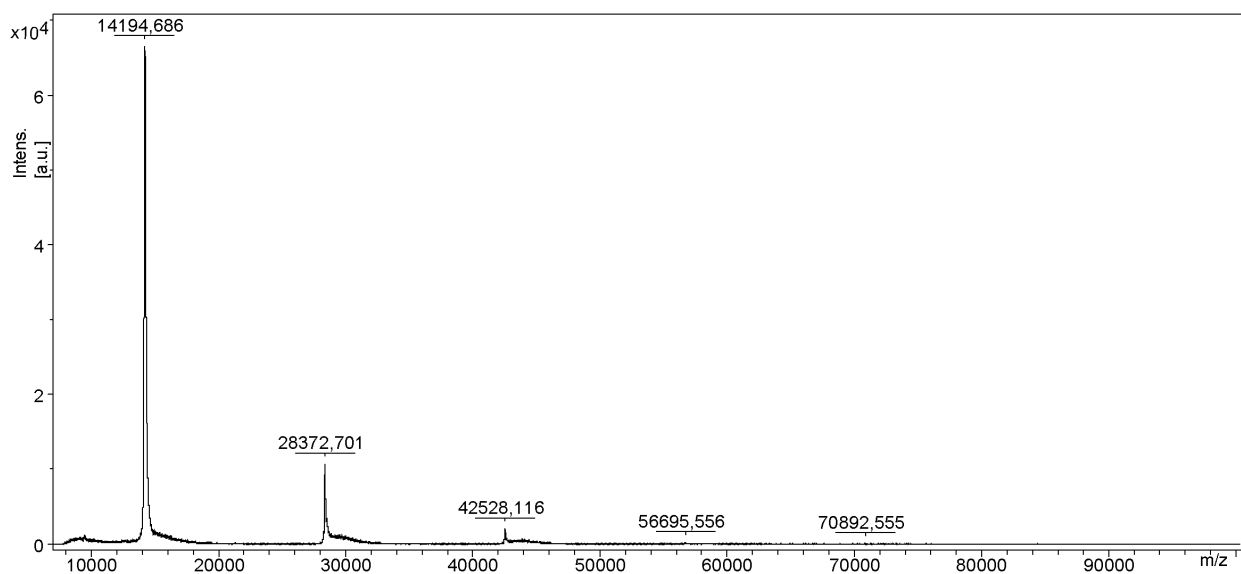


2. pielikums
Izveidoto praimeru sekvences

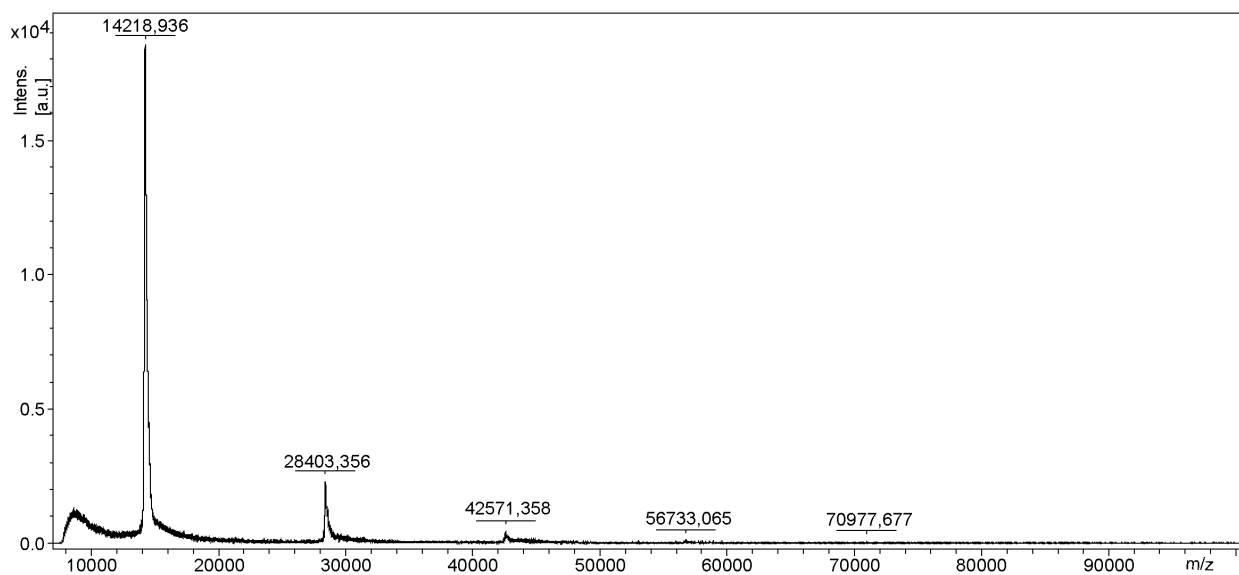
Praimeri	Fw	Rs
Pilna nukleotīdu sekvenca	atatatccatggggccctaaatctaaagaagaactac	taataatactcgagctattaggaccattgc
Nukleotīdi pirms restrikcijas saita	atatat	taataata
Restrikcijas saits	ccatgg	ctcgag
Izmantotā restriktāze	NcoI	XhoI
Rāmja nobīdi veicinošie nukleotīdi	gc	-
Papildus ieviestais STOP kodons	-	cta
Plazmīdai komplementārie nukleotīdi	cctaaatctaaagaagaactac	ttaggaccattgc

3. pielikums

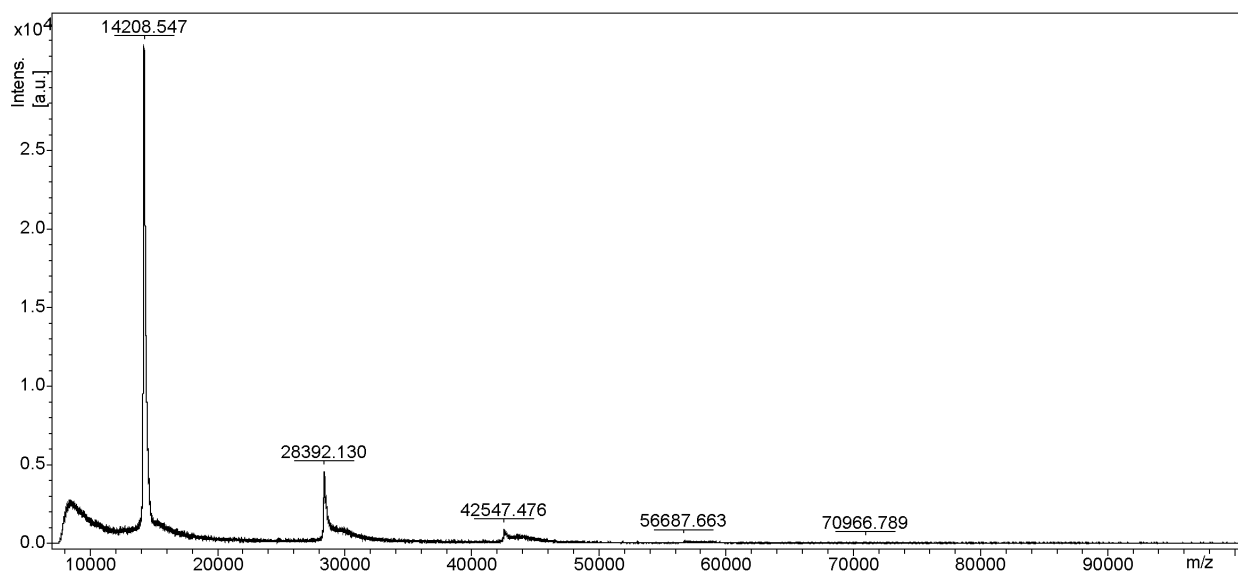
BBP28 proteīna MALDI-TOF masspektri.



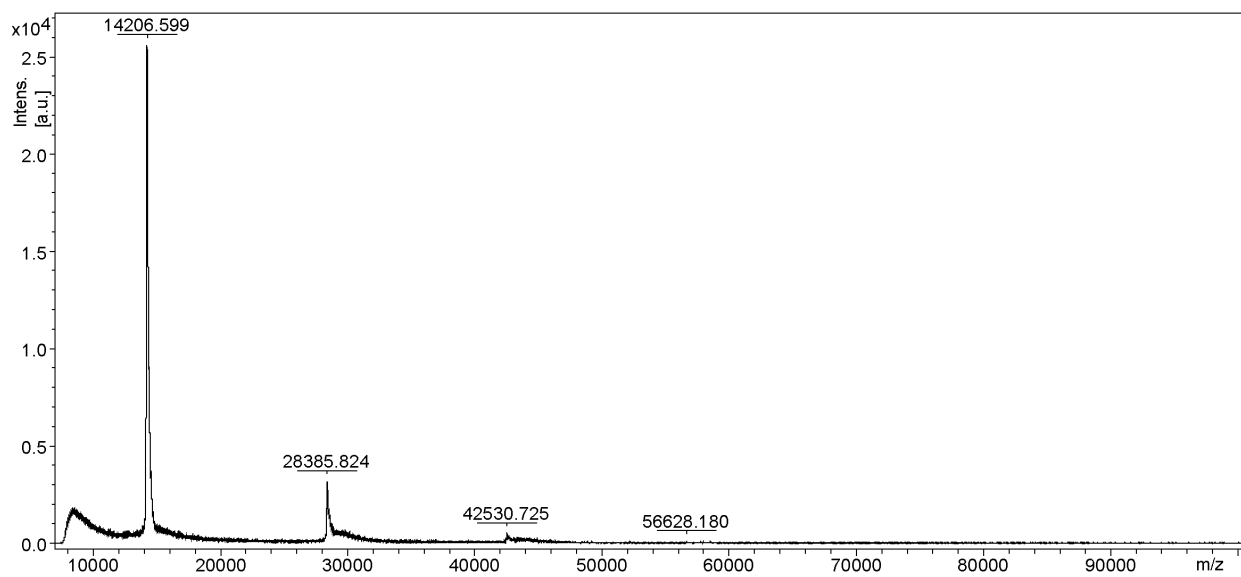
BBP28 proteīna 15 mM DTT MALDI-TOF masspektri.



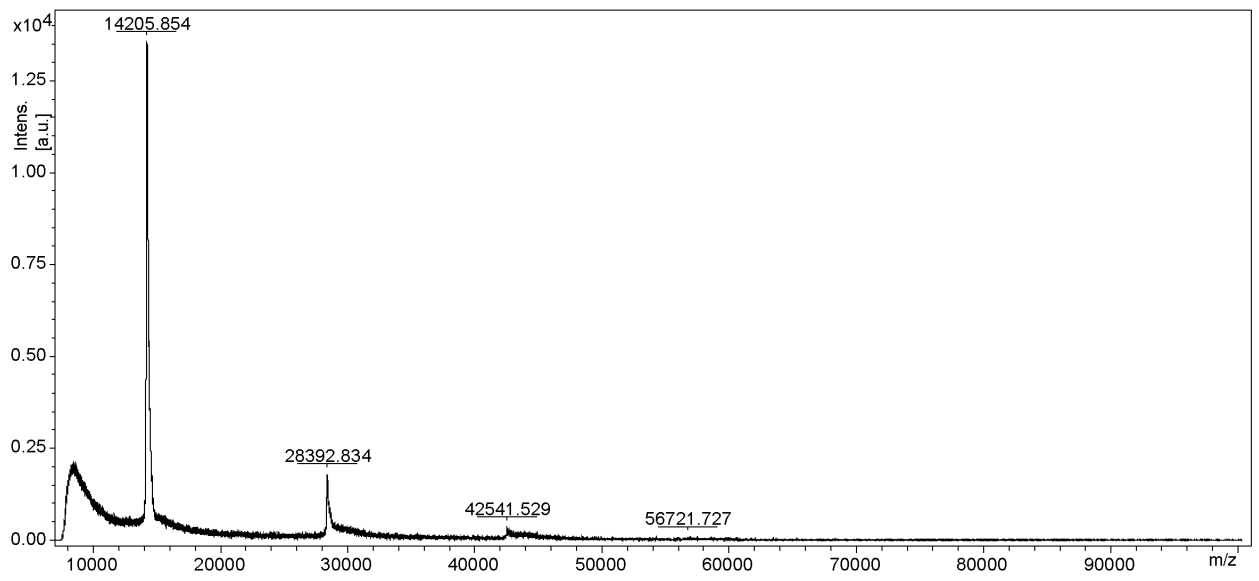
BBP28 proteīna 25 mM DTT MALDI-TOF masspektri.



BBP28 proteīna 35 mM DTT MALDI-TOF masspektri.



BBP28 proteīna 50 mM DTT MALDI-TOF masspektri.



8. pielikums

Uzņemto spektru parametri

Proteīns	Spektrs	Spektru skaits	Pierakstīto punktu skaits	Inkrimentu skaits	Spektra platums (Hz)	Spektrometrs
Pilna garuma ^{15}N iezīmēts	^1H - ^{15}N HSQC	8	2048	$N_{F1} = 512$	$H_{F2} = 10000$ $N_{F1} = 1702.117$	600 MHz
Pilna garuma pirmais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	^1H - ^{15}N HSQC	4	2048	$N_{F1} = 256$	$H_{F2} = 10000$ $N_{F1} = 1945.277$	600 MHz
Pilna garuma pirmais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNCO	8	2048	$N_{F1} = 64$ $C_{F2} = 40$	$N_{F1} = 1519.988$ $C_{F2} = 1800.000$ $H_{F3} = 5579.189$	600 MHz
Pilna garuma pirmais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNCA	8	1920	$N_{F1} = 64$ $C_{F2} = 96$	$N_{F1} = 1519.988$ $C_{F2} = 3318.735$ $H_{F3} = 7499.766$	600 MHz
Pilna garuma pirmais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNcaCO	32	1428	$N_{F1} = 64$ $C_{F2} = 40$	$N_{F1} = 1641.295$ $C_{F2} = 1800.000$ $H_{F3} = 5579.189$	600 MHz
Pilna garuma pirmais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNcoCA	8	2048	$N_{F1} = 72$ $C_{F2} = 64$	$N_{F1} = 1641.295$ $C_{F2} = 3319.123$ $H_{F3} = 7979.254$	600 MHz

8.1 pielikums

Uzņemto spektru parametri

Proteīns	Spektrs	Spektru skaits	Pierakstīto punktu skaits	Inkrimentu skaits	Spektra platums (Hz)	Spektrometrs
Pilna garuma pirmais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	CBCAcoNH	16	2048	$N_{F1} = 88$ $C_{F2} = 64$	$N_{F1} = 1641.295$ $C_{F2} = 9594.162$ $H_{F3} = 8000.000$	600 MHz
Pilna garuma pirmais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNCACB	32	2048	$N_{F1} = 88$ $C_{F2} = 64$	$N_{F1} = 1641.295$ $C_{F2} = 3319.123$ $H_{F3} = 7979.254$	600 MHz
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	^1H - ^{15}N HSQC	4	1688	$N_{F1} = 59$	$H_{F2} = 6599,027$ $N_{F1} = 1702,117$	600 MHz
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNCO	4	2048	$N_{F1} = 56$ $C_{F2} = 48$	$N_{F1} = 1700,030$ $C_{F2} = 1508,516$ $H_{F3} = 8000,000$	600 MHz
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNCA	8	2150	$N_{F1} = 64$ $C_{F2} = 48$	$N_{F1} = 1700,030$ $C_{F2} = 3922,141$ $H_{F3} = 8398,950$	600 MHz
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNcaCO	16	2048	$N_{F1} = 48$ $C_{F2} = 48$	$N_{F1} = 1700,030$ $C_{F2} = 1508,516$ $H_{F3} = 8000,000$	600 MHz

8.2 pielikums

Uzņemto spektru parametri

Proteīns	Spektrs	Spektru skaits	Pierakstīto punktu skaits	Inkrimentu skaits	Spektra platums (Hz)	Spektrometrs
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	HNcoCA	8	1600	$N_{F1} = 96$ $C_{F2} = 60$	$N_{F1} = 1641,030$ $C_{F2} = 3168,254$ $H_{F3} = 7979,254$	600 MHz
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	CBCAcoNH	8	1600	$N_{F1} = 64$ $C_{F2} = 80$	$N_{F1} = 1700,030$ $C_{F2} = 10861,315$ $H_{F3} = 8000,000$	600 MHz
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	^1H - ^{13}C NOESY ali	8	2048	$H_{F1} = 320$ $C_{F2} = 64$	$H_{F1} = 11160,714$ $N_{F2} = 2351,839$ $H_{F3} = 11160,714$	800 MHz
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	^1H - ^{13}C NOESY aro	16	1600	$H_{F1} = 280$ $C_{F2} = 28$	$H_{F1} = 7979,254$ $C_{F2} = 4525,655$ $H_{F3} = 8000,000$	600 MHz
Pilna garuma otrais ^{13}C , ^{15}N iezīmētais	^1H - ^{15}N NOESY	8	2048	$H_{F1} = 280$ $C_{F2} = 90$	$H_{F1} = 8802,791$ $N_{F2} = 237646,772$ $H_{F3} = 8802,791$	800 MHz
Saīsināts ^{15}N iezīmēts	^1H - ^{15}N HSQC	8	2048	$N_{F1} = 512$	$H_{F2} = 11160,714$ $N_{F1} = 2595,140$	800 MHz

8.3 pielikums

Uzņemto spektru parametri

Proteīns	Spektrs	Spektru skaits	Pierakstīto punktu skaits	Inkrimentu skaits	Spektra platums (Hz)	Spektrometrs
Saīsināts ^{15}N iezīmēts	^1H - ^{15}N TOCSY	32	2048	$H_{F1} = 160$ $C_{F2} = 64$	$H_{F1} = 9615.385$ $N_{F2} = 2189.655$ $H_{F3} = 9603.046$	800 MHz
Saīsināts ^{15}N iezīmēts	^1H - ^{15}N HSQC	256	2048	$N_{F1} = 200$	$H_{F2} = 8000.000$ $N_{F1} = 12157.981$	600 MHz
Saīsināts ^{13}C , ^{15}N iezīmēts	^1H - ^{13}C NOESY ali	8	1382	$H_{F1} = 300$ $C_{F2} = 108$	$H_{F1} = 7199.424$ $H_{F2} = 7199.424$ $C_{F3} = 6335.630$	600 MHz
Saīsināts ^{13}C , ^{15}N iezīmēts	^1H - ^{13}C NOESY aro	16	1844	$H_{F1} = 300$ $C_{F2} = 28$	$H_{F1} = 7199.424$ $H_{F2} =$ 7199.424 $C_{F3} = 5129.191$	600 MHz
Saīsināts ^{13}C , ^{15}N iezīmēts	HNCA	8	1920	$N_{F1} = 80$ $C_{F2} = 52$	$N_{F1} = 1519.988$ $C_{F2} = 3620.438$ $H_{F3} = 7499.766$	600 MHz
Saīsināts ^{13}C , ^{15}N iezīmēts	^1H - ^{15}N HSQC	4	2048	$N_{F1} = 512$	$H_{F2} = 10001.16$ $N_{F1} = 1945.29$	600 MHz

8.4 pielikums

Uzņemto spektru parametri

Proteīns	Spektrs	Spektru skaits	Pierakstīto punktu skaits	Inkrimentu skaits	Spektra platums (Hz)	Spektrometrs
Saīsināts ^{13}C , ^{15}N iezīmēts	HNHB	8	1024	$H_{F1} = 300$ $N_{F2} = 56$	$H_{F3} = 5999,250$ $H_{F2} = 5999,700$ $N_{F1} = 1745,315$	600 MHz
Saīsināts ^{13}C , ^{15}N iezīmēts	HNHA	8	1152	$H_{F1} = 160$ $N_{F2} = 56$	$H_{F3} = 5999,250$ $H_{F2} = 5999,700$ $N_{F1} = 1745,315$	600 MHz
Saīsināts ^{13}C , ^{15}N iezīmēts	^1H - ^{15}N NOESY	8	1792	$H_{F1} = 512$ $N_{F2} = 56$	$H_{F1} = 6999.737$ $H_{F2} = 6999.700$ $N_{F3} = 1945.336$	600 MHz

9. pielikums

Uzņemto spektru parametri

Proteīns	Spektrs	Spektru skaits	Pierakstīto punktu skaits	Inkrimentu skaits	Spektra platums (Hz)	Spektrometrs	Aiztures laiks (ms)
Saīsināts ¹³ C, ¹⁵ N iezīmēts	T1	16	2048	N _{F1} = 128	H _{F2} = 8000,0 N _{F1} = 1945,3	600 MHz	0; 20; 80; 180; 360; 700; 1400
Saīsināts ¹³ C, ¹⁵ N iezīmēts	T2	16	2048	N _{F1} = 128	H _{F2} = 8000,0 N _{F1} = 1945,3	600 MHz	10; 30; 70; 110; 150; 210; 230
Saīsināts ¹³ C, ¹⁵ N iezīmēts	T1	16	2048	N _{F1} = 128	H _{F1} = 11160,7 N _{F2} = 2189,6	800 MHz	20; 20(atk.); 80; 180; 360; 360(atk.); 700; 1400; 2000
Saīsināts ¹³ C, ¹⁵ N iezīmēts	T2	16	2048	N _{F1} = 128	H _{F1} = 11160,7 N _{F2} = 2189,6	800 MHz	16,96; 33,92; 50,88; 67,84; 84,8; 101,76; 135,68; 169,6; 203,52; 254,4

Molekulas korelācijas laika (ns) un molmasas korelācijas taisne.

