

Rīgas Stradiņa universitāte
Medicīnas fakultāte
Akadēmiskā maģistra studiju programma
“Biomedicīna”

**ALFA-SINUKLEĪNA UN VĪRUSVEIDĪGO DAĻIŅU
KONJUGĀTA KĀ POTENCIĀLA VAKCĪNAS KANDIDĀTA
PRET PARKINSONA SLIMĪBU IEGŪŠANA UN
BIOFIZIKĀLA RAKSTUROŠANA**

MAĢISTRA DARBS

Darba autors: Jana Petkus

Studenta apliecības Nr. 23-063034

/paraksts/

2025. gada 1. jūnijā

Darba vadītājs: Alons Lends

Dr. Nat. sc. vadošais pētnieks

Latvijas Organiskās sintēzes institūts,
Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorija

/paraksts/

2025. gada 1. jūnijā

Rīga, 2025

KOPSAVILKUMS UN ATSLĒGVĀRDI

Darba mērķis bija iegūt un attīrīt AP205- α -sinukleīnu konjugātu kā vakcīnas kandidātu pret Parkinsona slimību un raksturot to ar biofizikālajām analīzes metodēm.

Darbā sekmīgi veica AP205 un α -sinukleīna konjugāta producēšanu *E. coli* šūnās, kā arī tā attīrīšanu ar gelfiltrācijas un jonapmaiņas hromatogrāfiju. Izstrādāta metode ^{13}C un ^{15}N iezīmēta AP205- α -sinukleīna iegūšanai *E. coli* šūnās minimālajā M9 barotnē. AP205- α -sinukleīna konjugāts iegūts pietiekamā daudzumā ar augstu tīrības pakāpi gan priekš biofizikālajām analīzes metodēm, gan priekš KMR eksperimentiem. Ar biofizikālajām metodēm (FTIR, AFM, TEM, ThT fluorescenci) noteikta morfoloģiskā struktūra. ELISA tests pierādīja AP205- α -sinukleīna konjugāta saistīšanos ar konformacionāli specifiskajām α -sinukleīna antivielām. Ar 2D, 3D un 5D KMR eksperimentiem noteica konjugāta struktūru atomārā līmenī, un pēc iegūtajām vērtībām aprēķināja, ka α -sinukleīna daļa paliek nestrukturēta, kad tā ir piesaistīta pie AP205 vīrusveidīgās daļiņas.

Atslēgvārdi: **VLP, ALFA-SINUKLEĪNS, KMR, PARKINSONA SLIMĪBA.**

SUMMARY AND KEYWORDS

The aim of the work was to obtain AP205- α -synuclein conjugate as a vaccine candidate against Parkinson's disease and to characterize it using biophysical analysis methods. The production of the AP205- α -synuclein conjugate in *E. coli* cells and its purification by gel filtration and ion exchange chromatography were successfully carried out in this work. A method for the expression of ^{13}C and ^{15}N -labeled AP205- α -synuclein in *E. coli* cells in minimal M9 medium was developed. The AP205- α -synuclein conjugate was obtained in sufficient quantity and purity for both biophysical analysis methods and NMR experiments. The morphological structure was determined using biophysical methods like FTIR, AFM, TEM, ThT fluorescence, and the binding of the conjugate to conformationally specific α -synuclein antibodies was verified using ELISA assay. The structure of the conjugate at the atomic level was determined with 2D, 3D and 5D NMR experiments. The obtained values were used for calculation of secondary structure, which showed that the α -synuclein part of conjugate is structurally disordered.

Keywords: VLP, ALPHA-SYNUCLEIN, NMR, PARKINSON'S DISEASE.

SATURS

SAĪSINĀJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	8
1. LITERATŪRAS APSKATS	10
1.1. Parkinsona slimība	10
1.2. Alfa-sinukleīns	10
1.2.1. Vispārīgais apraksts un struktūra	10
1.2.2. Alfa-sinukleīna loma Parkinsona slimībā	11
1.3. Vīrusveidīgās daļiņas (VLP) kā vakcīnu prototipi	12
1.4. Vakcīnas pret Parkinsona slimību	13
1.5. Uz α -sinukleīna bāzēti vakcīnu prototipi	13
1.6. Vakcīnu kandidātu biofizikālie pētījumi	15
1.6.1. Mikroskopija	15
1.6.2. Spektroskopijas metodes	16
1.7. Alfa-sinukleīna pētīšana ar KMR	17
2. MATERIĀLS UN METODES	19
2.1. Izmantotie reaģenti un aparātūra	19
2.2. Izmantotās metodes	20
2.2.1. Plazmīdu producēšana <i>E. coli</i> šūnās	20
2.2.2. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana <i>E. coli</i> šūnās 2TY barotnē	21
2.2.3. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana <i>E. coli</i> šūnās minimālajā barotnē	22
2.2.4. AP205- α -sinukleīna konjugāta fibrilizēšana un oligomerizēšana	24
2.2.5. AP205- α -sinukleīna konjugāta antigenitātes tests	25
2.2.6. AP205- α -sinukleīna konjugāta biofizikālā analizēšana	26
3. REZULTĀTI	29
3.1. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana <i>E. coli</i> šūnās 2TY barotnē	29
3.2. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana <i>E. coli</i> šūnās M9 barotnē	31
3.3. AP205- α -sinukleīna konjugāta fibrilizēšana un oligomerizēšana	34
3.4. AP205- α -sinukleīna konjugāta antigenitātes tests	36
3.5. AP205- α -sinukleīna konjugāta biofizikālā analizēšana	37
3.5.1. KMR spektroskopija	37
3.5.2. FTIR spektroskopija	42
3.5.3. ThT saistīšanās	42
4. DISKUSIJA	43

4.1. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana M9 barotnē	43
4.2. AP205- α -sinukleīna konjugāta agregēšanas eksperimenti	43
4.3. <i>ELISA</i> antigenitātes testi.....	44
4.4. AP205- α -sinukleīna konjugāta biofizikālie eksperimenti	45
4.4.1. KMR spektroskopija	45
4.4.2. FTIR spektroskopija	46
SECINĀJUMI	48
LITERATŪRAS SARAKSTS	49
1. <i>PIELIKUMS</i>	56
2. <i>PIELIKUMS</i>	57
3. <i>PIELIKUMS</i>	59
4. <i>PIELIKUMS</i>	62
5. <i>PIELIKUMS</i>	63
6. <i>PIELIKUMS</i>	64
7. <i>PIELIKUMS</i>	66
8. <i>PIELIKUMS</i>	67
9. <i>PIELIKUMS</i>	68

SAĪSINĀJUMU SARAKSTS

2D	Divu dimensiju
3D	Trīs dimensiju
α -syn	Alfa-sinukleīns
AFM	Atomspēku mikroskopija (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
AIDS	Iegūtā imūndeficīta sindroms (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
Apgr.	apgrieztiens
APS	Amonija persulfāts (<i>Ammonium Persulfate</i>)
ASV	Amerikas Savienotās Valstis
bp	Bāzu pāri
EDTA	Etilēndiamīntetraetiķskābe
ELISA	Enzīmu imūnanalīzes tests (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EP	Ekstrakta nogulsnes
ES	Ekstrakta supernatants
FTIR	Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
HBV	B hepatīta vīruss (<i>Hepatitis B Virus</i>)
HPV	Cilvēka papilomas vīruss (<i>Human Papillomavirus</i>)
HRP	Mārrutku peroksidāze (<i>Horse Raddish Peroxidase</i>)
IPTG	Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozīds
kDa	Kilodaltons
KMR	Kodolmagnētiskā rezonanse
L	Lizāts
LB	<i>Luria Broth</i> barotne
LP	Lizāta nogulsnes
LS	Lizāta supernatants
M	Marķieris
M9	Minimālā barotne
NAGE	Natīvā elektroforēze (<i>Native Agarose Gel Electrophoresis</i>)
OD	Optiskais blīvums (<i>Optical Density</i>)
PAGE	Poliakrilamīda gela elektroforēze (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PBS	Fosfātu buferšķīdums (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)

PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorīds (<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)
SDS	Nātrija dodecilsulfāts (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
TCA	Trihloretiķskābe (<i>Trichloroacetic Acid</i>)
TEM	Transmisijas elektronu mikroskopija
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetrametiletilēndiamīns
ThT	Tioflavīns T
VLP	Vīrusveidīgā daļiņa (<i>Virus-like Particle</i>)

IEVADS

Parkinsona slimība ir otra izplatītākā neurodeģeneratīva saslimšana, kuras diagnožu skaits pasaulē ir dubultojies pēdējo 25 gadu laikā, sasniedzot vairāk nekā 8,5 miljonus cilvēku [1]. Neskatoties uz vairākiem zinātniskiem un industriāliem centieniem, līdz šim nav izstrādāta preventīva vai ārstējoša terapija, kas spētu novērst vai apturēt Parkinsona slimības attīstību. Šī iemesla dēļ arvien aktuālāka kļūst jaunu terapeitisku līdzekļu, tostarp vakcīnu, izstrāde.

Viens no daudzsološākajiem vakcīnu veidiem ir to izstrādāšana, par platformu izmantojot vīrusveidīgās daļiņas (VLP). VLP ir daļiņas, kas strukturāli atgādina vīrusus, bet nesatur to ģenētisko materiālu, kas padara tās par drošu un imunogēnu vakcīnu bāzi. Viena no nozīmīgākajām VLP īpašībām ir to virsmas modifikācijas iespēja ar dažādiem proteīna epitopiem, tādējādi veidojot uz proteīniem bāzētas vakcīnas. Piemēram, uz AP205 VLP virsmas ir telpiski pieejams gan C-, gan N- gals, kas paplašina dažādu konjugātu veidošanas iespējas. Iepriekš AP205 ir uzrādījusi labus rezultātus kā vakcīnas nesējs pret tādām slimībām kā gripa, malārija, vēzis un Rietumnīlas vīruss [2, 3].

Alfa-sinukleīns ir nestrukturēts proteīns, kura patoloģiskie agregāti atrasti Parkinsona slimnieku smadzenēs [4]. Līdz ar to α -sinukleīna konjugācija ar AP205 var kalpot kā prototips potenciālu vakcīnu izstrādei. Iepriekšējie pētījumi [5] ir uzrādījuši, ka dažādi α -sinukleīna fragmenti, konjugēti ar AP205, efektīvi saistās ar konformacionāli specifiskajām α -sinukleīna antivielām. Tas norāda uz šādu konjugātu vakcīnu kandidātu potenciālu pret Parkinsona slimību. Tāpēc ir nepieciešams padziļināti izstrādāt un pētīt AP205 un α -sinukleīna konjugātus.

Lai noteiktu vakcīnkandidātu struktūru, stabilitāti u. c. būtiskas īpašības, ir nepieciešama to biofizikālā raksturošana atomārā līmenī. Viena no spēcīgākajām metodēm ir kodolmagnētiskās rezonanses (KMR) spektroskopija. Tā ir nedestruktīva metode, kas ļauj noteikt proteīna struktūru atomārā līmenī apstākļos, kas ir līdzīgi fizioloģiskajiem apstākļiem.

Šajā darbā būs veikta pilna garuma α -sinukleīna konjugāta ar AP205 iegūšana un tā biofizikālā raksturošana ar uzsvāru uz KMR spektroskopiju. Pilna garuma AP205- α -sinukleīna konjugāta struktūra un īpašības nav iepriekš aprakstītas literatūrā.

Darba mērķis: iegūt AP205- α -sinukleīnu konjugātu kā vakcīnas kandidātu pret Parkinsona slimību, veikt antigenitātes testu un raksturot to, izmantojot biofizikālas pētīšanas metodes.

Darba uzdevumi:

1. Producēt un attīrīt AP205- α -sinukleīna konjugātu *E. coli* šūnās.
2. Veikt AP205- α -sinukleīna antigenitātes testus.
3. Iegūt un attīrīt ar ^{13}C un ^{15}N izotopiem iezīmētu AP205- α -sinukleīna konjugātu.

4. Veikt AP205- α -sinukleīna konjugāta biofizikālo raksturošanu.
5. Veikt AP205- α -sinukleīna konjugāta ^1H , ^{13}C un ^{15}N ķīmisko nobīžu interpretāciju un otrējās struktūras aprēķināšanu ar šķīduma KMR metodēm.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Parkinsona slimība

Parkinsona slimība ir pasaulē otra izplatītākā lēni progresējoša neurodeģeneratīva saslimšana, kas skar 2-3% populācijas, kas sasniegusi vismaz 65 gadu vecumu [6]. Parkinsona slimība izpaužas ar samazinātu dopamīnerģisko neironu daudzumu *substantia nigra pars compacta* (SNpc) reģionā, kas noved pie kustību traucējumiem (bradikinēzija, trīce miera stāvoklī, stājas un gaitas izmaiņām) un citiem ar kustību nesaistītiem simptomiem (atmiņas zudums, depresija u. c.) [7].

Ir pagājuši vairāk kā 200 gadu kopš Džeimss Parkinsons publicēja eseju par “trīcošo paralīzi” [8], taču vēl aizvien nav noskaidrots tās cēlonis vai atrasti efektīvi ārstēšanas līdzekļi [7]. Literatūrā ir minēti vairāki iespējamie cēloņi Parkinsona slimībai. Piemēram, Bloem [9] ar kolēģiem 2021. gadā izdala trīs galvenās cēloņu grupas: ģenētiskie faktori, vides faktori un abu iepriekš minēto faktoru mijiedarbība. Pie ģenētiskajiem faktoriem ir jāatzīmē mutācijas SNCA, LRRK2, PRKN, PINK1 un GBA gēnos; pie vides faktoriem: pesticīdu un neirotoksīnu (īpaši MPTP un to analoģu) iedarbība. Īpaši jāatzīmē Luija ķermenīšu (*Lewy bodies*) atrašanās Parkinsona slimības pacientu smadzenēs, kas ir viena no svarīgākajām patoloģiskajām pazīmēm. Luija ķermenīši lielākoties sastāv no proteīna α -sinukleīna (*α -synuclein*) agregātiem, kuru strukturāliem pētījumiem mūsdienās ir pievērsta liela uzmanība.

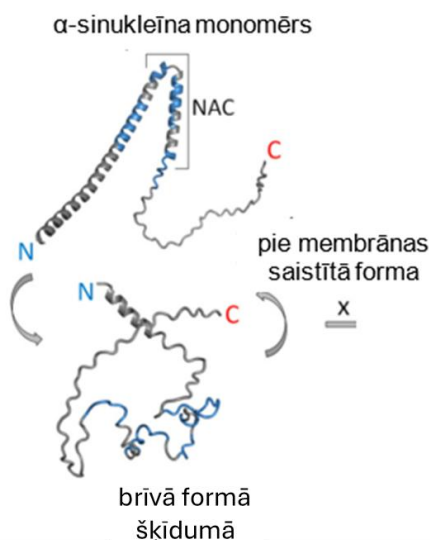
1.2. Alfa-sinukleīns

1.2.1. Vispārīgais apraksts un struktūra

Alfa-sinukleīns šķīdumā ir strukturāli nesakārtots 140 aminoskābju garš proteīns. Tas lielākoties atrodas galvas smadzeņu presinaptiskajos neironos [4, 10]. Lai arī līdz šim α -sinukleīna loma nav pilnībā skaidra [11], tiek uzskatīts, ka proteīna funkcija ir presinaptisko neironu homeostāzes nodrošināšana, vezikulu un neirotransmiteru transportēšana, dopamīna sintēze un transports [10], kā arī imūnsistēmas aizsardzība [12].

Alfa-sinukleīna pirmējo struktūru var iedalīt trīs galvenajās daļās: amfipātiskais N- gala reģions (1-60), centrālais hidrofobais ne-amiloīdais (*non-amyloid component*) jeb NAC reģions (61-95) un negatīvi lādētais C- gala reģions (96-140) [4]. Alfa-sinukleīns galvenokārt ieņem divas formas: nesaistīto, nesakārtoto monomērisko formu ūdens vidē un ar membrānu saistīto

formu (skat. 1.1. att.). Ir arī atrodama informācija, ka α -sinukleīns var atrasties arī tetramēra formā, kas neveido agregātus [4].



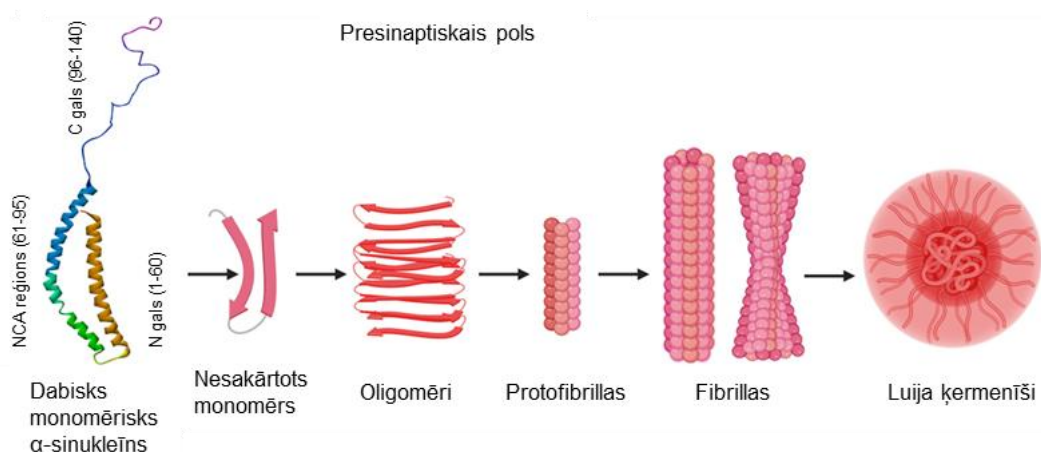
1.1. att. Alfa-sinukleīna monomēru formas [4].

Saistītās formas pozitīvi lādētais N- gala reģions var ieņemt α -spirāles struktūru, centrālais reģions no 71 līdz 82 aminoskābei tiecas veidot β -loksnes, savukārt C- gala reģions ir kustīgs un nesakārtots. Kustīguma dēļ C- gals var mijiedarboties ar dažādiem ligandiem, piemēram, joniem, lipīdiem, membrānām [4].

1.2.2. Alfa-sinukleīna loma Parkinsona slimībā

Normālos apstākļos α -sinukleīns atrodas šķīstošā monomēra formā, taču tam ir tendence agregēties, veidojot oligomērus un fibrillas [4]. Šādu agregātu uzkrāšanās ir viens no lielākajiem toksicitātes faktoriem Parkinsona slimības attīstībā, tādēļ ir svarīgi izprast tā akumulēšanās mehānismus.

Atšķirībā no proteīniem ar sakārtotu otrējo struktūru, kam ir raksturīga viena enerģētiski izdevīgākā konformācija (*fold*), α -sinukleīnam tādas nav. Savas nesakārtotās struktūras dēļ tas spēj mainīt to starp vairākām vienlīdz izdevīgām konformācijām [13]. Tomēr monomēriskas α -sinukleīna molekulas var savākties un izveidot β -loksnes, kas ir agregātu veidošanās prekursors. *Estoun et al.* [13] piedāvā iespējamo agregēšanās mehānismu: pirmkārt, kad dažādu apstākļu dēļ ir izveidojušās β -loksnes, tās pēc tam sapakojas oligomēros. Otrkārt, oligomēri veido protofibrillas. Treškārt, fibrillas polimerizējas amiloidajās fibrillās. Šajā solī var izdalīt vairākas fāzes: primāro nukleāciju (jeb pirmo fibrillu veidošanos), augšanas fāzi, proliferācijas fāzi, kurā notiek pagarināšanās, fragmentācija un otrējā nukleācija. Visbeidzot amiloidās fibrillas veido Luija ķermenīšus (*Lewy bodies*), ko atrod Parkinsonu slimnieku smadzenēs. Shematisks α -sinukleīna agregācijas mehānisms ir parādīts 1.2. attēlā.



1.2.att. Shematiskais α-sinukleīna agregācijas attēlojums [14].

Kad proteīns sāk sapakoties komplicētākās struktūrās, tā agregātiem sāk parādīties enerģētiski izdevīgāki stāvokļi [10, 13]. Termodinamiski visizdevīgākais stāvoklis ir tad, kad ir izveidojušās amiloidās fibrillas – tās ir stabilas, nešķīstošas un bieži toksiskas. Tomēr ir arī viedokļi, ka amiloidās fibrillas var disagregēties atpakaļ par šķīstošiem oligomēriem [10]. Tieši mazākas šķīstošās daļiņas, piemēram, oligomērus, uzskata par neirotoksiskākajām, jo tās nav stabilas un var izplatīties organismā [13].

1.3. Vīrusveidīgās daļiņas (VLP) kā vakcīnu prototipi

Vīrusveidīgās daļiņas (VLP) ir neinficējošas un imunogēnas vīrusu struktūru imitējošas daļiņas [15]. VLP tiecas “pašsavākties” (*self-assemble*) pēc vīrusu apvalka, serdes (*core*) vai apvalka (*envelope*) kodējošo proteīnu ekspresijas. Bieži VLP producēšana ir viegli iespējama baktēriju, insektu un rauga ekspresijas platformās. Papildus tam, VLP struktūru ir iespējams modificēt, konjugējot tās ar proteīniem VLP daļiņu iekšpusē vai ārpusē, vai mainot pašu VLP struktūru un izmēru [15].

Tā kā VLP nesatur vīrusu ģenētisko materiālu un ir imunogēnas, tās var kalpot kā platforma vakcīnu izstrādei, zāļvielu piegādei u. c. [2]. Dažas no populārākajām vīrusveidīgajām daļiņām, ko izmanto vakcīnu izstrādē, ir B hepatīta vīruss (HBV), cilvēku papilomas vīruss (HPV), Qβ, AP205 u. c. Mūsdienās cilvēku ārstēšanā sekmīgi izmanto trīs uz VLP tehnoloģijas bāzētas vakcīnas: profilaktiskā HBV (kopš 1986. gada), HPV (kopš 2006. gada), E hepatīta vakcīna (kopš 2011. gada) un vairākas dzīvnieku vakcīnas [15]. Mohsen *et al.* [2] ir aprakstījuši dažādās klīnisko pētījumu fāzēs atrodošās uz VLP bazētas vakcīnas pret tādām slimībām kā COVID-19, gripa, malārija, Alcheimers, AIDS, melanoma un HPV.

Literatūrā ir atrodama informācija arī par VLP bāzētām vakcīnām pret Parkinsona slimību [5, 16], kas detalizētāk ir aprakstīta 1.5. apakšnodaļā.

1.4. Vakcīnas pret Parkinsona slimību

Ņemot vērā to, ka pret Parkinsona slimību vēl aizvien nav pieejama preventīva vai ārstējoša terapija, ir svarīgi strādāt pie jauniem līdzekļiem, kas palīdzētu novērst slimības progresiju. Mūsdienās potenciālai Parkinsona slimības ārstēšanai ir divi ceļi: pasīvā terapija (monoklonālās antivielas) un aktīvā imūnterapija [17]. Pasīvajā terapijā ilgākā laika periodā ir nepieciešams atkārtoti ievadīt antivielas, savukārt aktīvā terapija balstās uz antivielu veidošanos pēc imūnsistēmas stimulēšanas. Aktīvā terapija neprasa tik biežu zāļu ievadi, tā ir vienkāršāka un lētāka. Tieši šo iemeslu dēļ aktīvā terapija jeb vakcinēšana varētu būt labākā platforma Parkinsona slimības ārstēšanai.

Kā jau iepriekš minēts, par lielāko Parkinsona slimības patoloģisko iemeslu uzskata α -sinukleīna agregāciju, tādēļ potenciālie terapijas līdzekļi tiek bāzēti uz α -sinukleīna agregātu sagraušanu vai to rašanās novēršanu. Pārsvarā ir pētītas vakcīnas, kurās iestrādāts α -sinukleīna fragments imūnās reakcijas veicināšanai, bet ir atrodamā arī informācija par pētījumiem uz DNS balstītajām vakcīnām [18]. Tomēr ir svarīgi pieminēt, ka pie raksta par DNS vakcīnu kandidātiem pret Parkinsona slimību žurnāla mājaslapā ir paziņojums, ka raksts pašlaik atrodas izvērtēšanā saistībā ar bažām par datu ticamību [19, 20].

1.5. Uz α -sinukleīna bāzēti vakcīnu prototipi

Šobrīd klīniskajos pētījumos pret Parkinsona slimību atrodas divas aktīvās imunizācijas vakcīnas, kas ir bāzētas uz α -sinukleīna C- gala fragmentiem [21, 22]. Šajā gadījumā vakcīnās izmantoti strukturāli ierobežoti α -sinukleīna fragmenti, kas, nokļūstot organismā, veicina specifisku antivielu rašanos. Šīs specifiskās antivielas selektīvi atpazīst un iznīcina α -sinukleīna agregātus, neskarot pašu monomēru.

Viena no vakcīnām, kas šobrīd atrodas 1. klīnisko pētījumu fāzē, ir nosaukta par UB-312, un to izstrādā *Vaxxinity* [23]. Šī vakcīna ģenerē antivielas pret C- gala fragmenta no 97. līdz 135. aminoskābei, bet antigēns sastāv no 10 aminoskābēm. Kā nesēju izmanto sintētisku *T-helper* šūnu peptīdu, kas ir savienots ar α -sinukleīna agregātu epitopa fragmentu. Šāda platforma veicina humorālu B šūnu atbildi, neierosinot lielu T šūnu toksicitāti, kas varētu novest pie autoimūnas reakcijas. UB-312 specifiski saistās ar α -sinukleīna oligomēriem un fibrillām, ko novēroja arī eksperimentos ar *post mortem* Parkinsona slimnieku smadzeņu daļām. Ir pabeigta 1. klīniskā pētījuma A daļa, bet vēl aizvien turpinās B daļa, kurai jābūt pabeigtai 2025. gada aprīlī.

Otra vakcīna, kas ir pabeigusi 1. klīnisko pētījumu fāzi un kas šobrīd atrodas 2. fāzē, ir *AC Immune* izstrādātā vakcīna ACI-7104.056 [21], iepriekš zināma kā PD03A [24]. Šīs pašas kompānijas līdzīgs vakcīnas formulējums PD01A ir pabeidzis vairākus 1. klīniskās fāzes pētījumus. PD01A darbības princips balstās uz astoņu aminoskābju garu antigēna peptīdu, kas attēlo α -sinukleīna C- gala reģionu [25]. Šajā kandidātā peptīds ir konjugēts ar imunogēno nesējproteīnu KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), kas ir absorbēts uz alumīnija hidroksīda. Šis vakcīnas prototips selektīvi atpazīst α -sinukleīna oligomērus. Ar monomērisku α -sinukleīnu tam ir zema afinitāte [26].

Alternatīvs vakcīnu prototipu veids ir fibrilāru proteīnu izmantošana [27]. *Pesch* ar kolēģiem [27] 2024. gadā aprakstīja metodi, kurā četru vakcīnu kandidātu iegūšanai kā nesēju izmantoja *Podospira anserina* sēnītēs atrodamo HET (*heterokaryon incompatibility protein*) proteīnu. HET ir prionu veidojošs proteīns, kas no 218 līdz 289 aminoskābei var veidot amiloidās (*amyloid*) fibrillas. Šo apgabalu modificēja, tajā iekļaujot α -sinukleīna epitopus, kas ierosina agregēšanos [27]. Visi četri vakcīnu kandidāti veidoja fibrillas, kuras neierosināja monomēriska α -sinukleīna agregēšanos un kuras bija strukturāli līdzīgas no cilvēku smadzenēm izdalītām α -sinukleīna fibrillām. Šie vakcīnu kandidāti peļu modeļos ierosināja antivielu reakciju pret patoloģiskajām α -sinukleīna fibrillām, kas paver iespēju fibrilāru vakcīnu sekmīgai izmantošanai nākotnē. Papildus tam, fibrilāras vakcīnas istabas temperatūrā ir stabilas ilgā laika periodā, kas ir liels pluss to uzglabāšanā un pārvadāšanā [27].

Kā vēl viens vakcīnu prototipu veids Parkinsona slimības ārstēšanai ir VLP izmantošana [16]. Literatūrā ir atrodams piemērs, kurā RNS bakteriofāgu VLP Q β konjugē ar trim dažādiem īsiem α -sinukleīna peptīdiem [16]. Izvēlētajiem peptīda fragmentiem no N- gala, no vidus un no C- gala, veica preklīnisko analīzi, izmantojot peles. Vakcīnkandidāti, kuros izmantoja C- gala un vidus peptīda fragmentus, spēja ierosināt selektīvu antivielu reakciju, atpazīstot α -sinukleīna agregātus. Augstus antivielu titrus novēroja bez piedevu (piemēram, alumīnija hidroksīda) lietošanas. Alfa-sinukleīna N- gala peptīda gadījumā antivielas nedetektēja, lai gan literatūrā [28] ir atrodama informācija par šādām antivielām.

Arī Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (LBMC) veica α -sinukleīna peptīdu fragmentu konjugēšanu AP205 fāga C- galā [5]. Pētījumā pārbaudīja, kā iegūtie fragmenti saistās ar monoklonālajām MJFR14-6-4-2 antivielām, kas ir konformacionāli specifiskas antivielas un saistās ar α -sinukleīna agregātiem. VLP izmantoja kā α -sinukleīna fragmentu koncentrēšanas platformu, lai imitētu agregātus. Rezultāti uzrādīja, ka MJFR14-6-4-2 antivielas galvenokārt saistās ar blīvi sapakotiem monomēriskiem α -sinukleīna fragmentiem ar daļēji maskētu epitopu, nevis ar noteiktas konformācijas epitopiem [5]. Šis atklājums parāda, ka antivielas spēj saistīties gan ar N-, gan C- gala epitopiem, un šī informācija ir svarīga

turpmākajiem zāļvielu dizainēšanas pētījumiem. Paralēli veica α -sinukleīna mutantu fibrilizēšanu, un arī pārbaudīja to saistīšanos ar MJFR14-6-4-2. Autori secināja, ka antivielas neatpazīst mutētos agregātus, bet, ja šādus agregātus ievada šūnā, tad tas liek agregēties šūnās esošajām monomēriskajām α -sinukleīna molekulām, pie kurām tad saistās MJFR14-6-4-2.

1.6. Vakcīnu kandidātu biofizikālie pētījumi

Lai pārliecinātos, vai vakcīnu kandidāti rada nepieciešamo imūno atbildi, ieņem pareizo konformāciju un atspoguļo citas nepieciešamās strukturālās īpašības, ir nepieciešams veikt to strukturālo analīzi.

Dažādiem vakcīnu prototipu, piemēram, gan uz VLP [25], gan uz vīrusu vai lipīdu vektoriem bāzētajām vakcīnām [29], pētīšanai tiek izmantotās līdzīgas biofizikālas analīzes metodes.

1.6.1. Mikroskopija

Viena no biežāk izmantotajām analīzes metodēm ir transmisijas elektronu mikroskopija (TEM). TEM izmanto vizualizēšanai, un ar tās palīdzību var noteikt, piemēram, VLP vakcīnu daļiņu izmēru, morfoloģiju un dispersiju [30]. Ar TEM var pētīt arī iedarbību ar antivielām un noteikt, vai ir izmaiņas, kad daļiņas tiek adsorbētas uz adjuvantiem, ko bieži izmanto vakcīnu izstrādē. Piemēram, 2010. gadā [31] pirmoreiz veica proteīna struktūras vizualizāciju adsorbcijas uz adjuvanta laikā un noskaidroja, ka adsorbēšanās notiek nenoteiktā veidā. Tomēr EM parauga pagatavošanas laikā tas var tikt deformēts, tāpēc kā alternatīvu var izmantot kriogēno elektronmikroskopiju.

Kriogēnā elektronmikroskopija (*cryo-EM*) pēdējos gados kļūst par neatņemamu sastāvdaļu vakcīnu un proteīnu pētīšanā. Metodē paraugs tiek sasaldēts šķīdumā, tādēļ to var vizualizēt principā neizmainītā stāvoklī. *Cryo-EM* ir ļoti liela izšķiršanas spēja, un ar tās palīdzību var iegūt informāciju par 3D struktūru, analizēt elastīgumu un saistīšanos ar membrānām [32]. Ar *cryo-EM* ir iespējams noteikt uz VLP virsmas konjugēto proteīnu struktūru, VLP iekšienē redzamos molekulāros komponentus. Vienas daļiņas analīze (*single-particle analysis*) ļauj panākt izšķiršanu, kas ir tuva atomāram līmenim [33].

Atomspēku mikroskopija (AFM) ir alternatīva vizualizēšanas metode, kas ļauj noteikt daļiņu izmēru un to blīvumu parauga tilpumā [30]. AFM izmanto uzgali, kurš skenē paraugu, attēlojot parauga virsmu un tādējādi parādot tā morfoloģiju [13].

1.6.2. Spektroskopijas metodes

Viena no populārākajām spektroskopijas metodēm priekš VLP strukturālās raksturošanas ir cirkulārais dihiroisms (CD). Tas dod informāciju par vakcīnu stabilitāti, agregācijas spēju un struktūru analīzi [34]. CD spektroskopiju izmanto proteīna otrējās struktūras noteikšanai [30]. Otrējā struktūra tiek noteikta, mērot absorbcijas starpību uz labo vai kreiso pusi cirkulāri polarizētajai gaismai [13]. Metode sniedz ierobežotu informācijas daudzumu par pašu proteīnu - vislabāk ir noteikt tā mijiedarbību ar citu proteīnu. Kā arī metode ir jutīga uz dažādu buferšķīdumu izmantošanu.

Vēl viena spektroskopiskā metode, ko izmanto vakcīnu un proteīnu raksturošanai, ir Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (FTIR). Šajā metodē infrasarkanā starojuma rezultātā tiek ierosinātas heteroatomu saišu vibrācijas, kas atbilst dažādām funkcionālajām grupām [13]. Metode ir piemērota otrējās struktūras noteikšanai, jo α -spirālēm un β -sloksnēm atšķiras svārstību diapazons. FTIR izmanto antigēnu pētījumos, analizējot tā strukturālo izmaiņu pēc adsorbcijas uz adjuvantiem [35]. To lielākoties izmanto kā komplementāru metodi, pati par sevi tā sniedz ierobežotu informācijas daudzumu.

KMR spektroskopija paver iespēju noteikt molekulu uzbūvi un īpašības atomārā līmenī gan šķīdumā, gan cietajā fāzē. Darbības princips balstās uz magnētiski aktīvu kodolu radiofrekvenču absorbciju magnētiskā lauka ietekmē. Kodola spini radiofrekvenču pulsu ietekmē absorbē un emitē enerģiju atkarībā no to blakus esošajiem atomiem un funkcionālajām grupām.

Ar cietvielu KMR var identificēt lielus un mazkustīgus kompleksus atomārā līmenī, ko nevar izdarīt ar šķīduma KMR un krio-elektronmikroskopiju. Cietvielu KMR paver iespējas analizēt šādus paraugus, to strukturālās izmaiņas, saistīšanos spēju [36]. Savukārt šķīduma KMR ļauj analizēt šķīstošus un nestrukturētus proteīnus.

KMR spektroskopijai ir nepieciešams iegūt tīrus, izotopiski iezīmētus proteīnus, un metode ir ar zemu jutību. Paraugu sagatavošana cietvielu KMR spektroskopijai ir tehniski sarežģīta. Kopumā metodes veikšana prasa augstas izmaksas [13].

Koers [37] 2013. gadā apraksta dinamiskās kodolu polarizācijas (DNP) cietvielu KMR izmantošanu uz lipīdām balstīto pret Alzheimer slimību vakcīnu struktūras noteikšanai. DNP metode ļauj zemās temperatūrās vairākas reizes paaugstināt jutību KMR spektros. Ar 1D un 2D cietvielu KMR spektriem izdevās parādīt dažādu liposomu ietekmi uz peptīda konformāciju. Tas ir svarīgi vakcīnu kandidātu strukturālai raksturošanai.

Literatūrā ir atrodami vairāki piemēri ar uz adjuvantiem adsorbēta antigēna struktūras pētījumiem ar cietvielu KMR [38, 39]. *Jaudzems et al.* apraksta augstas jutības metodes izmantošanu uz VLP bāzēta antigēna konjugāta un adjuvanta vakcīnas formulējuma noteikšanai

ar cietvielu KMR pie ātra griešanās režīma [38]. Aprakstītā metode ir piemērota lielmolekulāru heterogēnu maisījumu analīzei mazā daudzumā, kurus ir grūti analizēt ar *cryo*-EM vai šķīduma KMR. Šajā pētījumā ieguva struktūru antigēnam un antigēna konjugātam ar VLP, un noskaidroja, ka tā ir ļoti līdzīga. *Cerofolini et al.* ar cietvielu KMR demonstrē, kā ^{13}C un ^{15}N izotopiski iezīmēts antigēna paraugs saglabā savu 3D struktūru pēc adsorbcijas uz adjuvanta [39].

Papildus spektroskopijas un mikroskopijas metodēm antigēnu izmēra, stabilitātes un agregātu veidošanās raksturošanai izmanto dinamisko gaismas izkliedi (DLS) [29]. Savukārt diferenciālo skenējošo kalorimetriju (DSC) izmanto antigēnu stabilitātes novērtēšanai [30].

1.7. Alfa-sinukleīna pētīšana ar KMR

Alfa-sinukleīna proteīna nestrukturētā daba padara tā analizēšanu atomārā līmenī ļoti izaicinošu. KMR ir vienīgā eksperimentālā metode, ar kuru var sekvenču specifiski analizēt nestrukturētus un ļoti dinamiskus proteīnus.

Literatūrā, kas ir sīkāk apskatīta zemāk, ir atrodami vairāki pētījumi, kuros veikta α -sinukleīna struktūras noteikšana dažādos apstākļos, izmantojot gan šķīduma, gan cietvielas KMR.

Piemēram, ar KMR palīdzību var noskaidrot α -sinukleīna otrējo struktūru. *Kim* ar kolēģiem [40] 2020. gadā ir apkopojis rakstus par zināmajiem α -sinukleīna pētījumiem ar šķīduma KMR, un no iegūtajiem datiem secina, ka, atkarībā no buferšķīduma apstākļiem, proteīna struktūra var kardināli mainīties. Tādu apstākļu kā buferšķīduma saturs, pH un temperatūras ietekmes dēļ var mainīties α -sinukleīna konformācijas. Tādēļ ir svarīgi pētīt α -sinukleīna konformāciju dabiskos apstākļos.

Binolfi [41] novērojis, ka pēc ekspresijas *E. coli* BL21 (DE3) šūnās un pēc šūnu lizēšanas α -sinukleīna struktūra var tikt ietekmēta. Veica šķīduma KMR analīzi *E. coli* BL21 (DE3) šūnās bez to degradācijas un noskaidroja, ka α -sinukleīns šūnu vidē atrodas monomēriskā stāvoklī. Arī *Waudby* [42] raksta, ka *E. coli* šūnās proteīns atrodas monomēriskā formā. *Theillet* [43] apraksta monomēriska α -sinukleīna KMR analīzi zīdītāju šūnās, un secina, ka dažādos intracelulāros apstākļos monomēriska proteīna konformācija praktiski nemainās.

Tā kā organismā α -sinukleīns atrodas gan brīvā, gan pie membrānas saistītā formā, ir svarīgi noskaidrot tā konformāciju, saistoties ar lipīdiem. *Eliezer* [44] un *Bodner* [44] ar šķīduma KMR noteica, ka α -sinukleīna N-gals saistās ar lipīdiem, bet C-gals paliek fleksibls un nestrukturēts.

Ir veikti vairāki pētījumi par α -sinukleīna agregācijas apstākļiem [45] un pašu agregātu strukturālo noteikšanu. *Ghosh* [46] ar KMR spektroskopiju noteica, ka N-gals un proteīna vidusdaļa veido spirāles, kas pēc tam pāriet uz β -sloksnēm un ir fibrillu veidošanās katalizators. Publikācijā arī aprakstīts, kā KMR analīze var būt komplementāra citām biofizikālajām analīzes metodēm. *Barclay* [47] veica KMR analīzi fibrillām, kas iegūtas no *post mortem* Luija ķermenīšu šūnām, un secināja, ka to β -sloksņu struktūra atšķiras no *in vitro* iegūtajām fibrillām. Ar cietvielu KMR var arī strukturāli atķirt α -sinukleīna fibrillu polimorfās modifikācijas [48].

2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Izmantotie reaģenti un aparātūra

Izmantotos traukus un barotnes pirms izmantošanas sterilizēja autoklāvā *Systec DX-65* vai arī izmantoja jaunus. Pēc nepieciešamības strādāja aseptiskos apstākļos *Streamline Class II BSC* laminārā vai pie gāzes degļa liesmas.

Šķīdumu pagatavošanai izmantoja destilētu ūdeni vai ultratīru ūdeni (Milli-Q) no *PURELAB Quest VF LC-291* attīrītāja. pH noteica ar *SevenDirect SD20* pH metru. Reaģentus iegādājās no tādiem izplatītājiem kā *Sigma Aldrich*, *Thermo Scientific*, *Carl Roth*, *Acros Organics*, *Fluorochem*, *Formedium*, *RK Chem*, *Prolab*, *Eurisotop* un *Cambridge Isotope Laboratories Inc.* un tos glabāja atbilstoši norādījumiem. Šūnu suspensijas un plazmīdas glabāja saldētavās pie -80 °C.

Inkubēšanu veica *Multitron* kratītājā vai *Binder* termostatā pie 37 °C vai 25 °C ar kratīšanas ātrumu no 150 līdz 200 apgr./min. Paraugus centrifugēja 4 °C temperatūrā. Šūnu lizēšanai izmantoja ultraskaņas dezintegratoru *Ultrasonic Processor UP200S* ar amplitūdu no 20 līdz 70% ledus ūdens vannā.

Proteīnu attīrīja ar *AktaPure* vai *AktaPrimePlus* hromatogrāfu ar *Sepharose 4FF*, *Superdex 200* gelfiltrācijas kolonnām vai *DEAE* anjonapmaiņas kolonnu.

Iegūtos proteīnus analizēja ar SDS-PAGE (15% sadalošais un 4% koncentrējošais gels, vizualizēšanai iekrāsoja ar *Coomassie* krāsvielu), un NAGE (1% agarozes gels ar etīdijbromīdu, vizualizēšanai izmantoja UV gaismu) elektroforēzi.

Koncentrācijas noteikšanai izmantoja *Invitrogen Qubit* fluorometru, savukārt optiskā blīvuma noteikšanai izmantoja *Nanodrop 2000C* spektrofotometru.

Fibrilizēšanas testus veica ar *Biosan Thermo-Shaker TS-100* kratītāju 37 °C temperatūrā.

Dialīzei izmantoja *Spectra/Por* membrānas ar MWCO 100 kD, 300 kD vai 50 kD.

KMR spektrus uzņēma ar 600 MHz *Bruker Avance Neo* spektrometru, aprīkotu ar 5-mm $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) *Quadrupole-Resonance CryoProbe with Z-Grad* zondi vai 700 *Bruker Avance Neo* MHz spektrometru, aprīkotu ar TXO ^{13}C detektēšanas zondi. Paraugiem pievienoja D_2O līdz 10%.

Sīkāks izmantoto reaģentu saraksts ir aprakstīts 1. pielikumā, izmantotā aparātūra – 2. pielikumā, bet izmantotie šķīdumi - 3. pielikumā.

2.2. Izmantotās metodes

2.2.1. Plazmīdu producēšana *E. coli* šūnās

E. coli šūnu transformēšanas vispārīgais apraksts

Ledus vannā atkausēja pETDuet-1 plazmīdu ar AP205- α -sinukleīna kodējošo sekvenci (skat. 4. pielikumā) un *E. coli XL-1 Blue* (vai *E. coli BL21 DE3*) celma šūnu suspensiju. Tad sterilos apstākļos mikromēģenē (1,5 mL) pārnesa plazmīdu šķīdumu (5 μ L) un pievienoja šūnu suspensiju (100 μ L). Inkubēja 10 minūtes 0 °C temperatūrā ledus vannā un pēc tam maisījumu pakļāva karstuma šokam, ievietojot mikromēģeni uz 35 sekundēm ūdens peldes vannā 42 °C temperatūrā.

Pēc karstuma šoka suspensiju inkubēja ledus vannā 3 minūtes, pievienoja LB barotni (900 μ L), un mikromēģeni inkubēja 1 stundu 37 °C temperatūrā.

Uz iepriekš pagatavotas agara LB barotnes ar ampicilīnu (100 mg/L) Petri traukā vienmērīgi izsēja šūnu suspensiju (100 μ L) un barotni inkubēja 16 stundas 37 °C temperatūrā.

Plazmīdu producēšana

No agara barotnes ar sterilu cilpu atlasīja izaudzētu *E. coli XL-1 Blue* koloniju un pārnesa mēģenē, kurā iepriekš ielēja 5 mL 2-TY barotnes ar pievienotu ampicilīnu (100 mg/L). Kopā sagatavoja 3 mēģenes un inkubēja 16 stundas 37 °C temperatūrā, kratot pie 200 apgr./min. Suspensiju centrifugēja 5 min pie 7000 apgr./min.

Plazmīdu DNS izdalīšana

Veica plazmīdu izdalīšanu no *E. coli* šūnām pēc *GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit* protokola, izmantojot komerciāli pieejamu komplektu (skatīt 2. pielikumu): pēc centrifugēšanas šūnu nogulsnēm pievienoja resuspendēšanas šķīdumu (250 μ L) un vorteksēja līdz ieguva viendabīgu suspensiju. Tad pievienoja lizēšanas šķīdumu (250 μ L) un lēnām sakratīja stobriņu 4-5 reizes. Visbeidzot suspensijai pievienoja neitralizēšanas šķīdumu (350 μ L) un uzreiz sakratīja stobriņu 4-5 reizes, un centrifugēja 10 minūtes pie 10000 apgr./min.

Supernatantu pārnesa *GeneJETTM* kolonnā un centrifugēja 1 minūti pie 14000 apgr./min. Iegūto supernatantu nolēja un kolonnai pievienoja mazgāšanas šķīdumu (500 μ L), centrifugēja 1 minūti pie 14000 apgr./min un nolēja supernatantu. Mazgāšanu atkārtoja vēl vienu reizi un pēc supernatanta noliešanas centrifugēja vēl 2 minūtes pie 14000 apgr./min. Kolonnu ievietoja jaunā 1,5 mL centrifugēšanas stobriņā, pievienoja eluēšanas šķīdumu (40 μ L) un inkubēja 2

minūtes. Pēc inkubēšanas stobriņu centrifugēja 2 minūtes pie 14000 apgr./min. Iegūto eluātu savāca, nomērīja tā koncentrāciju un saldēja -18 °C temperatūrā.

2.2.2. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana *E. coli* šūnās 2TY barotnē

E. coli šūnu retransformēšana

Ledus vannā atkausēja iepriekš izdalīto plazmīdu un *E. coli* BL21 DE3 celma šūnu suspensiju. Karstuma šoku veica 1 minūti, bet pārējās darbības atkārtoja pēc norādēm vispārīgajā aprakstā.

Sējmateriāla pagatavošanas vispārīgais apraksts

Sējmateriāla pagatavošanai no agarizētās barotnes ar sterilu cilpu atlasīja izaudzētu *E. coli* BL21 DE3 koloniju un pārnese sterilā kolbā (250 mL), kurā iepriekš ielēja LB barotni (200 mL) ar pievienotu ampicilīnu (200 μ L, 100 mg/L). Kolbu inkubēja 16 stundas 37 °C temperatūrā.

Konjugāta producēšanas vispārīgais apraksts

Sagatavoja divas kolbas (2 L) un ielēja iepriekš pagatavotu 2TY barotni (katrā kolbā 800 mL) ar ampicilīnu (800 μ L, 100 mg/L). Katrai kolbai pievienoja iepriekš iegūto sējmateriālu (80 mL katrā) un inkubēja kratītājā 37 °C pie 200 apgr./min. Ik pēc stundas ar spektrofotometru nomērīja optisko blīvumu pie 600 nm viļņu garuma līdz vērtība pēc 3,5 h sasniedza $\sim 0,7$. Paņēma alikvotu (1 mL) suspensijas priekš elektroforēzes analīzes.

Tad katrā kolbā pievienoja 1 M IPTG šķīduma (800 μ L) līdz gala koncentrācijai 1 mM un kolbas inkubatorā kratīja 20 °C pie 200 apgr./min 16 h.

Pēc inducēšanas paņēma alikvotu (140 μ L) priekš elektroforēzes analīzes. Atlikušo kolbas saturu centrifugēja 20 minūtes pie 5000 apgr./min 4 °C temperatūrā. Supernatantu nolēja un iegūtās šūnas nosvēra un saldēja -20 °C, ja tās neizmantoja uzreiz.

Šūnu lizēšanas un konjugāta ekstrakcijas vispārīgais apraksts

Ceturtdaļai no iegūtajām šūnām (4 g) stobriņā (50 mL) pievienoja 4 reizes lielāku lizēšanas buferšķīduma tilpumu (16 mL) un 1M PMSF (16 μ L) līdz koncentrācijai 1 mM. Stobriņa saturu homogenizēja un ievietoja ledus vannā.

Veica šūnu lizēšanu ar ultraskaņas dezintegratora zondi, to ievietojot homogenizētajā suspensijā. Lizēja šūnas 15 minūtes 0 °C temperatūrā ar amplitūdu sākot ar 20 līdz 70% ar 0,5 sekunžu ciklu. Pēc lizēšanas suspensiju centrifugēja 30 minūtes pie 10000 apgr./min.

Supernatantu pārnesa jaunā stobriņā (50 mL), paņēma alikvotu (10 µL) un tad supernatantam pievienoja 30-40% piesātinātu (NH₄)₂SO₄ šķīdumu (12,6 mL). Stobriņu turēja 16 stundas 4 °C temperatūrā un tad centrifugēja 30 min pie 10000 apgr./min.

Supernatantu nolēja un nogulsnēm pievienoja ekstrakcijas buferšķīdumu (5 mL) un 1M PMSF (5 µL) līdz koncentrācijai 1 mM un homogenizēja. Tad suspensiju centrifugēja 30 min pie 10000 apgr./min. Supernatantu pārnesa tīrā vārglāzē un izmantoja proteīna attīrīšanai ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju.

Konjugāta attīrīšana

Attīrīšanu veica ar *AktaPrime* hromatogrāfu, izmantojot *PrimeView* datorprogrammu.

1. Attīrīšana ar *Sepharose 4 Fast Flow* (120 mL) gelfiltrācijas kolonnu. Sākumā kolonnu līdzsvaroja ar 1x PBS buferšķīdumu pie plūsmas ātruma 2,0 ml/min. Uz kolonnas uznesa paraugu un to attīrīja ar plūsmas ātrumu 1,0 ml/min, kā eluentu izmantojot 1x PBS buferšķīdumu. Proteīna saturošās frakcijas apvienoja un izmantoja tālāk.

2. Attīrīšana ar jonapmaiņas hromatogrāfijas kolonnu *DEAE* (20 mL): kolonnu līdzsvaroja ar 1x PBS buferšķīdumu pie plūsmas ātruma 3,0 ml/min. Uz kolonnas uznesa pēc gelfiltrācijas kolonnas iegūtās apvienotās frakcijas, kas saturēja vajadzīgo AP205 un α -sinukleīna konjugātu. Attīrīšanu veica gradienta apstākļos: par eluentu izmantoja sistēmu A) PBS (1x) un B) 1M NaCl PBS (1x) šķīdumu ar gradientu no 0 līdz 100% B. Proteīna saturošās frakcijas apvienoja, iekonzentrēja ar *Amicon Ultra 15 100 kDa* filtru līdz 5 mL, centrifugējot pie 5000 apgr./min, un izmantoja tālāk.

3. Attīrīšana ar gelfiltrācijas hromatogrāfijas kolonnu *Superdex 200* (120 mL): kolonnu līdzsvaroja ar 1x PBS buferšķīdumu pie plūsmas ātruma 1,5 mL/min. Uz kolonnas uznesa pēc jonapmaiņas hromatogrāfijas iekonzentrētās frakcijas un eluēja ar 1x PBS buferšķīdumu pie plūsmas ātruma 1,5 mL/min. Proteīna saturošās frakcijas apvienoja, iekonzentrēja ar *Amicon Ultra 15 100 kDa* filtru līdz 5 mL, centrifugējot pie 5000 apgr./min, un noteica tā koncentrāciju ar *Qubit* fluorimetru.

2.2.3. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana *E. coli* šūnās minimālajā barotnē

Sākotnēji piemeklēja labākos apstākļus proteīna producēšanai un attīrīšanai minimālajā barotnē. Pēc labāko apstākļu piemeklēšanas veica proteīna ekspresiju, izmantojot ¹⁵N amonija hlorīdu un ¹³C glikozi.

Sējmateriāla pagatavošana M9 barotnē

Sējmateriālu pagatavoja pēc vispārīgā apraksta: atlasīja izaudzētu *E. coli* BL21 DE3 koloniju un pārnese sterilā kolbā (250 mL) ar iepriekš pagatavotu minimālo M9 barotni (200 mL, sastāvu skat. 3. pielikumā). Kolbu inkubēja 16 stundas 37 °C temperatūrā.

Konjugāta producēšanas M9 barotnē optimizēšana

M9 barotnei (100 mL) kolbā pievienoja iepriekš pagatavoto sējmateriālu (10 mL) un ievietoja inkubatorā 37 °C, kratot pie 200 apgr./min. Pēc 2,5 h optiskā blīvuma vērtība pie 600 nm sasniedza ~0,5. Paņēma alikvotu (1 mL) suspensijas priekš elektroforēzes analīzes un inducēja ar 1M IPTG. Kopumā pārbaudīja 4 dažādus inducēšanas apstākļus (skat. 2.1. tab.): inducētāja daudzuma ietekmi, proteīna producēšanas temperatūru, laiku un piedevu. Tabulas pēdējā ailē arī norādīta optiskā blīvuma vērtība pēc inducētās ekspresijas beigām.

2.1. tabula

Inducētās ekspresijas apstākļi.

Nr.	Inducētājs	IPTG, μ L	Temperatūra, °C	Laiks, h	Piedevas	OD ₆₀₀
1	IPTG (1M)	25	20	16	Nav	3,0
2	IPTG (1M)	25	25	16	Nav	2,7
3	IPTG (1M)	500	25	16	80% glicerīns (500 μ L)	3,4
4	IPTG (1M)	100	37	4	Nav	2,0

Pēc ekspresijas no katra parauga paņēma alikvotu (no 6 līdz 10 mL atkarībā no optiskā blīvuma vērtības), centrifugēja un lizēja (1 min un 10 s ar amplitūdu 20%) pēc vispārējā apraksta. Pēc atkārtotas centrifugēšanas ar SDS-PAGE un NAGE elektroforēzi analizēja iegūto supernatantu un nogulšņu suspensiju 1x PBS šķīdumā. Stabilāko apstākļu paraugus attīrīja ar gelfiltrācijas (*Sepharose 4 Fast Flow* 30 mL kolonna, par eluentu izmantoja 1x PBS) un jonapmaiņas (*DEAE* 5 mL kolonna, par eluentu izmantoja sistēmu A) 1x PBS un B) 1M NaCl 1x PBS šķīdumā no 0 līdz 100% B) hromatogrāfiju.

Pēc iegūtajiem rezultātiem par paraugu stabilitāti veica proteīna ekspresiju minimālajā M9 barotnē ar ¹³C un ¹⁵N iezīmi.

Konjugāta producēšana minimālajā M9 barotnē ar ¹³C un ¹⁵N iezīmi

Pagatavoja minimālo M9 barotnē ar ¹³C (sešu ¹³C atomu iezīmēta glikoze) un ¹⁵N iezīmētu ¹⁵NH₄Cl kā aprakstīts 3. pielikumā. Sējmateriālu no LB barotnes (150 mL) centrifugēja 5 minūtes pie 5000 apgr. minūtē. Supernatantu nolēja un atlikušās šūnas resuspendēja tāda paša tilpuma fizioloģiskajā šķīdumā (0,9% NaCl šķīdums destilētā ūdenī) un

centrifugēja vēlreiz. Supernatantu nolēja un šūnas resuspendēja tāda paša tilpuma minimālajā M9 barotnē ar ^{13}C un ^{15}N iezīmi un izmantoja tālāk proteīna producēšanai pēc vispārīgā apraksta. Inducēšanu veica ar 1M IPTG (375 μL , 0,25 mM), kratot 16 h pie 25 °C temperatūras.

Lizēšanu, sedimentēšanu un ekstrakciju veica pēc vispārīgās metodes.

^{13}C un ^{15}N iezīmēto proteīnu attīrīja ar divām gelfiltrācijas kolonnu hromatogrāfijām: sākumā izmantoja *Sepharose 4 Fast Flow* (120 mL) un tad *Superdex 200* (320 mL, plūsmas ātrums 1,5 mL/min, 1x PBS buferšķīdums) kolonnu.

2.2.4. AP205- α -sinukleīna konjugāta fibrilizēšana un oligomerizēšana

Oligomerizēšanas un fibrilizēšanas eksperimentiem izmantoja proteīnu bez iezīmes, kas ekspresēts LB barotnē. Fibrilizēšanas un oligomerizēšanas buferšķīduma nomaiņu, ja bija nepieciešams, veica ar dialīzi (izmantoja 100 kDa *SpectraPor Float-A-Lyzer G2 Dialysis Device* vai 12-14 kad *SpectraPor2 Dialysis Membrane*), vai diafiltrēšanu (*Amicon Ultra 15 100 kDa*) 4 °C temperatūrā.

Fibrilizēšanas vispārīgais apraksts

Proteīna šķīdumam (400 μL) mikromēģenē (2 mL) pievienoja 1M PMSF šķīdumu (0,4 μL). Suspensiju centrifugēja pie 12000 apgr./min un nofiltrēja. Fibrilizēšanu veica, kratot paraugu 37 °C pie 1400 vai 600 apgr./min līdz 11 dienām (skat. 2.2. tab.). Katru darba dienu no šķīduma paņēma 40 μL alikvotu un pēc tam analizēja ar SDS-PAGE un NAGE elektroforēzi, un elektronmikroskopiju. Kopumā testēja fibrilizēšanu 6 dažādos apstākļos.

2.2. tabula

Fibrilizēšanas apstākļi.

Bufēršķīdums	Parauga koncentrācija	pH	Apgr./min	Ilgums, dienas
1x PBS (bez PMSF)	10 mg/mL	7,4	1400	6
1 x PBS	10 mg/mL	7,4	1400	10
Tris (5 mM), KCl (150 mM) [49]	10 mg/mL	7,5	600	7
Tris (50 mM), KCl (150 mM) [49]	5 mg/mL	7,5	600	12
	1 mg/mL			12
Na fosf. buferšķīdums (50 mM), EDTA (0,1 mM), 0,02% NaN ₃ [50]	5 mg/mL	7,4	600	12

Oligomerizēšanas vispārīgais apraksts

Proteīna šķīdumu Milli-Q ūdenī liofilizēja. Pēc tam proteīna alikvotai (12 mg) pievienoja 1x PBS buferšķīdumu (500 μL , pH= 7,4), filtrēja ar 0,2 μm filtru un inkubēja 37 °C temperatūrā bez kratīšanas 20 h. Procedūru balstīja uz *Santos* aprakstīto metodi [51].

2.2.5. AP205- α -sinukleīna konjugāta antigenitātes tests

Netiešā ELISA

Uz mikrotitru (96 bedrīšu mikroplate) plates bedrītēs uznesa 100 μ L monomērisku α -sinukleīnu, monomērisku AP205 un AP205- α -sinukleīna konjugātu karbonātu buferšķīdumā ar koncentrāciju 1 μ g/100 μ L. Plati inkubēja 16 stundas 4 °C temperatūrā. Tad bedrītes bloķēja ar 1% BSA PBST šķīdumu (150 μ L), 30 min inkubējot plati 37 °C. Pēc bloķēšanas katrā bedrītē pievienoja 100 μ L MJFR14-6-4-2 antivielas ar atšķaidījumiem 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000. Plati inkubēja 37 °C 1 h. Tad bedrītēm pievienoja 100 μ L sekundārās antivielas (kazu HRP-konjugētās anti-trušu IgG antivielas, 1:5000), un plati inkubēja 37 °C 1 h. Plati mazgāja ar 0,1% Tween PBS šķīdumu un veica krāsu reakciju: pievienoja o-fenilēndiamīna dihidrohlorīdu un H₂O₂ citrāta buferšķīdumā (100 μ L) un turēja plati tumsā 7 minūtes. Reakciju apstādināja ar 2N H₂SO₄ (50 μ L) un mērīja optisko blīvumu pie viļņu garuma 492 nm.

Konkurējošā ELISA

Uz mikrotitru (96 bedrīšu mikroplate) plates bedrītēs uznesa 100 μ L AP205- α -sinukleīna konjugātu karbonātu buferšķīdumā ar koncentrāciju 1 μ g/100 μ L. Plati inkubēja 16 stundas 4 °C temperatūrā. Paralēli antivielas MJFR 14-6-4-2 šķīdumu (1:5000 PBST šķīdumā) inkubēja ar dažādas koncentrācijas monomērisku α -sinukleīnu, monomērisku AP205, AP19 (AP205 konjugāts ar α -sinukleīna peptīda fragmentu no 127. līdz 140. aminoskābes atlikumam), oligomerizētu α -sinukleīnu un AP205- α -sinukleīna konjugātu ar sākuma koncentrāciju 10 ng/ μ L, to trīskārši samazinot 7 reizes. Oligomērisku α -sinukleīnu un AP19 ņēma no laboratorijas kolekcijas. Pēc plates inkubēšanas veica bloķēšanu ar 1% BSA PBST šķīdumu (150 μ L), 30 min inkubējot plati 37 °C. Inkubētos antivielu/antigēnu atšķaidījumus pievienoja platē (100 μ L) un inkubēja 37 °C 1 h. Tad bedrītēm pievienoja 100 μ L sekundāro antivielu (kazu HRP-konjugētās anti-trušu IgG antivielas, 1:5000), un plati inkubēja 37 °C 1 h. Plati mazgāja ar 0,1% Tween šķīdumu PBS. Lai detektētu sekundārās antivielas, pievienoja o-fenilēndiamīna dihidrohlorīdu un H₂O₂ citrāta buferšķīdumā (100 μ L) un turēja plati tumsā 7 minūtes. Reakciju apstādināja ar 2N H₂SO₄ (50 μ L) un mērīja optisko blīvumu pie viļņu garuma 492 nm.

2.2.6. AP205- α -sinukleīna konjugāta biofizikālā analizēšana

KMR spektroskopija

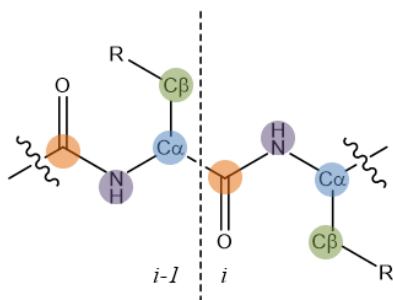
^{13}C un ^{15}N iezīmētam AP205- α -sinukleīnam 1x PBS šķīdumā (400 μL , 10 mg/mL) ar PMSF (1 mM) pievienoja D_2O līdz 10%. Tam uzņēma 2D ^1H - ^{15}N -HSQC, 3D - CBCACONH, HNCA, HNCO, HNCACO, CBCANH, HNCANNH KMR spektrus [52]. Papildus uzņemti ^{13}C detektēšanas multidimensionālie spektri – 5D/3D CACONCACO, 2D NCO, 3D CBCANH ar ^{13}C optimizētas KMR detekcijas zondi. Šo četru spektru apstrādi un uzņemšanu veica Bc. Viliam Volko CEITEC institūtā Brno, Čehijā.

Proteīna pamatstruktūras (*backbone*) ķīmisko nobīžu vērtības noteica ar *CcpNmr* 2.3.1 [53] un *NMRFAM-Sparky 1.47* [54] programmām. Ķīmiskās nobīdes noteica, meklējot korelācijas izvēlētai aminoskābei (*i*) ar iepriekš esošās aminoskābes (*i-1*) (skatīt 2.1. att.) aminoskābes atlikumiem.

- 3D HNCA eksperimentā noteica C_α (*i*) un C_α (*i-1*) korelāciju ar amīda H_N (*i*) un N (*i*) rezonanses pāriem. Dimensijas: ^1H , ^{15}N , ^{13}C .
- 3D HNCO eksperimentā noteica karbonilgrupas CO (*i-1*), bet HNCACO eksperimentā - CO (*i*) un CO (*i-1*) korelāciju ar amīda H_N (*i*) un N (*i*) rezonanses pāriem. Dimensijas: ^1H , ^{15}N , ^{13}C .
- 3D CBCACONH eksperimentā noteica C_α (*i-1*), C_β (*i-1*), bet CBCANH eksperimentā noteica C_α (*i*), C_β (*i*) un C_α (*i-1*), C_β (*i-1*) korelāciju ar amīda H_N (*i*) un N (*i*) rezonanses pāriem. Dimensijas: ^1H , ^{15}N , ^{13}C .
- 3D HNCANNH eksperimentā noteica N (*i-1*) un N (*i+1*) korelāciju ar amīda H_N (*i*) un N (*i*) rezonanses pāriem. Dimensijas: ^1H , ^{15}N , ^{15}N .
- 2D NCO eksperimentā noteica CO (*i-1*) korelāciju ar amīda N (*i*). Dimensijas: ^{13}C (C=O), ^{15}N .
- 3D CBCACON eksperimentā noteica CO (*i-1*), C_α (*i-1*) un C_β (*i-1*) ar amīdu N (*i*). Dimensijas: ^{15}N , ^{13}C (C=O), ^{13}C .
- 5D CACONCACO eksperiments sastāv no divām daļām: sākumā 3D CACONCACO eksperimentā noteica C_α (*i*), CO (*i*) un N (*i*) korelāciju. Tad izveidoja 2D CACONCACO šķērs griezumu, kurā redzēja C_α (*i-1*) un CO (*i-1*) korelāciju, kas visbeidzot ļauj iegūt C_α (*i-1*), CO (*i-1*) un N (*i-1*) korelāciju 3D CACONCACO eksperimentā. Shematisks eksperimenta analizēšanas attēls parādīts 5. pielikumā.

Kombinējot izmantotos eksperimentus, ieguva AP205- α -sinukleīna pamatvirknes (*backbone*) ^1H , ^{13}C un ^{15}N ķīmiskās nobīdes. 2D ^1H - ^{15}N -HSQC spektrā parādīti

identificētie NH pāri, savukārt iegūtās C_α un C_β izmantoja proteīnu otrējās struktūras noteikšanai. Uzskatāma shēma parādīta 3. nodaļā.



2.1. att. Proteīnu pirmējā struktūra

Otrējo struktūru noteica pēc Wang [55] aprakstītās metodes, veicot eksperimentāli noteikto C_α un C_β nobīžu starpību ar literatūrā minētajām attiecīgās aminoskābes *random coil* (RC) vērtībām pēc formulas:

$$\Delta\delta C_\alpha - \Delta\delta C_\beta \quad (1.1.)$$

Transmisijas elektronu mikroskopija

TEM attēlu iegūšanu veica Dr. Juris Jansons Latvijas Biomedicīnas studiju un pētījumu centrā. AP205- α -sinukleīna paraugus adsorbēja uz ar oglekli apvalkota *Formvar* vara režģa. Paraugu negatīvi iekrāsoja ar 1% uranilacetāta ūdens šķīdumu. Režģi apskatīja ar *JEOL Ltd.* ražotu *JEM-1230* elektronmikroskopu, strādājot pie 100 kV. Elektronu mikrogrāfiju analizēja ar *iTEM (version 3.2, Solf Imaging System GmbH)* programmu, izmantojot sāniski piestiprinātu *Morada* digitālo kameru *Olympus*.

AFM mikroskopija

AFM mikroskopijas analīzi veica Dr. Andrius Sakalauskas Viļņas Universitātes Dzīvības zinātņu centrā (*Vilnius University Life Sciences Center*). Attēlu iegūšanai izmantoja piecus iepriekš AP205- α -sinukleīna konjugāta fibrilizētus vai oligomerizētus paraugus ar koncentrāciju 25 μM . Alikvotu parauga uznesa uz svaigi notīrīta vizlas diska un inkubēja istabas temperatūrā 5 min. Tad disku nomazgāja ar ūdeni un nosusināja gaisa plūsmā. AFM attēlu uzņemšanu veica ar *Dimension Icon (Bruker)* AFM mikroskopu. Uzņemtās bildes apstrādāja ar *Gwyddion 2.57* programmu.

FTIR

AP205- α -sinukleīna konjugāta FTIR analīzi veica Dr. Mantas Žiaunys Viļņas Universitātes Dzīvības zinātņu centrā (*Vilnius University Life Sciences Center*). Spektru uzņemšanai izmantoja četrus neiezīmētus paraugus ar koncentrāciju 200 μM : α -sinukleīna

monomēru, AP205 monomēru, AP205- α -sinukleīna konjugātu un nekonjugētu α -sinukleīna un AP205 monomēru maisījumu. Sākumā veica šķīdinātāja nomaiņu pret D₂O ar diafiltrēšanu, izmantojot 3 kDa proteīnu koncentratorus. Filtrāciju veica vairākas reizes, tādējādi nodrošināt tā pilnīgu šķīdinātāja nomaiņu. Iegūto paraugu spektru uzņēma ar *Bruker Invenio S FTIR* spektrometru pēc iepriekš aprakstītas metodes [56].

ThT saistīšanās

AP205- α -sinukleīna konjugāta ThT saistīšanās analīzi veica Dr. Mantas Žiaunys Viļņas Universitātes Dzīvības zinātņu centrā (*Vilnius University Life Sciences Center*). ThT saistīšanos pārbaudīja trim paraugiem ar koncentrāciju 50 μ M: AP205- α -sinukleīna konjugātam, AP205 monomēram un α -sinukleīna monomēram. Katram paraugam pievienoja ThT krājuma šķīdumu (10 mM) līdz gala ThT koncentrācijai 100 μ M. Paraugus iepildīja 96 bedrīšu nesaistošā *Cornig* platē, katrā bedrītē iepildot 100 μ L. ThT fluorescences spektru skenēja ar *ClarioStar Plus* plašu lasītāju ar ierosināšanu pie 440 nm un emisiju pie 460-520 nm viļņu garumiem. Izmantoja iegūto vidējo spektru no trim lasījumiem.

3. REZULTĀTI

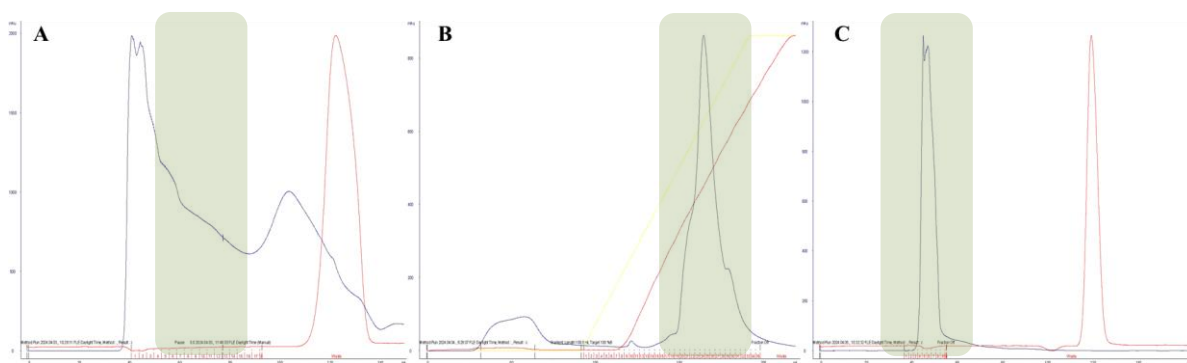
3.1. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana *E. coli* šūnās 2TY barotnē

Sākotnēji bija jāveic AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana un attīrīšana labākajos apstākļos, ko izvēlējās pēc iepriekš veiktajiem eksperimentu rezultātiem LBMC prof. K. Tāra laboratorijā.

Producētās plazmīdas ar iekodētu AP205- α -sinukleīna konjugāta sekvenci retransformēja *E. coli* BL21 DE3 šūnās, veica konjugāta producēšanu, lizēšanu un attīrīšanu pēc 2.2.2. apakšnodaļā aprakstītās metodes.

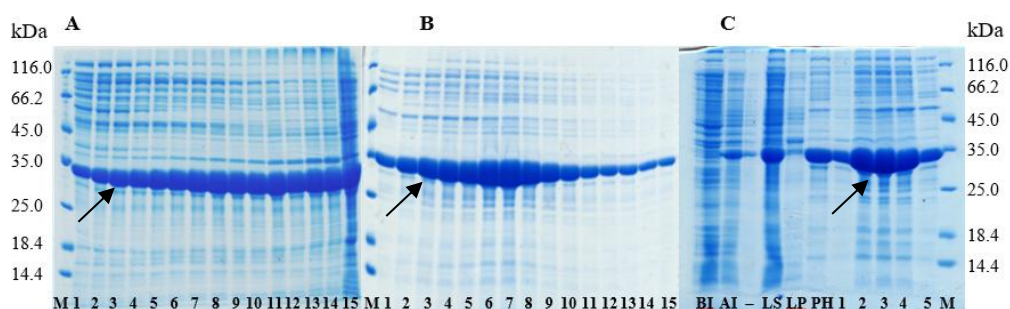
Pirms attīrīšanas veica konjugāta nogulsnešanu ar piesātinātu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ šķīdumu, lai atdalītu nevajadzīgās mazākās molekulas, kas paliek šķīdumā. Pēc tam nogulsnēm pievienoja ekstrakcijas buferšķīdumu, lai atkal proteīnu iegūtu šķīstošā formā turpmākai attīrīšanai.

Pirmajā solī veica AP205- α -sinukleīna attīrīšanu ar gelfiltrācijas kolonnu *Sepharose 4 Fast Flow* (skat. 3.1. att. A). To izmantoja, lai atdalītu liekos agregātus un mazākas molekulas no vajadzīgā AP205- α -sinukleīna konjugāta. Otrajā attīrīšanas solī veica hromatogrāfiju ar anjonapmaiņas *DEAE* kolonnu (skat. 3.1. att. B). Šajā solī atbrīvojas no molekulām, kurām atšķiras lādiņš, piemēram, no nukleīnskābēm. Savukārt trešajā solī attīrīšanu veica ar gelfiltrācijas kolonnu *Superdex 200* (skat. 3.1. att. C), kurai ir augstāka izšķiršana. Iegūtās hromatogrammas parādītas 3.1. attēlā.



3.1.att. Hromatogrammu attēli pēc konjugāta attīrīšanas. A: *Sepharose 4FF* gelfiltrācija; B: jonapmaiņa ar *DEAE* kolonnu; C: *Superdex 200* gelfiltrācija.

Pēc katras hromatogrāfijas iegūtās frakcijas analizēja ar SDS-PAGE (skat. 3.2. att.), lai noteiktu frakciju tīrību. SDS-PAGE gelā pēc 3. hromatogrāfijas salīdzināšanai pievienoja arī alikvotas no paraugiem pirms (BI, skat. 3.2. attēla C daļu) un pēc ekspresijas inducēšanas (AI, skat. 3.2. attēla C daļu), kā arī lizāta supernatanta (LS, skat. 3.2. attēla C daļu) un nogulsņu (LP, skat. 3.2. attēla C daļu).

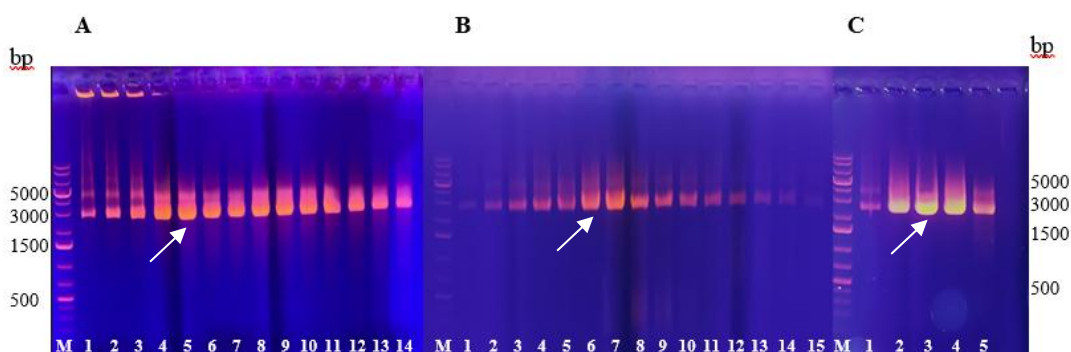


3.2.att. SDS-PAGE elektroforēzes analīze. A: frakcijas pēc *Sepharose 4FF* gelfiltrācijas; B: pēc jonapmaiņas ar DEAE kolonnu; C: pēc *Superdex 200* gelfiltrācijas, kur M- marķieris, 1-15- attiecīgās frakcijas pēc attīrīšanas; BI – pirms indukcijas; AI – pēc indukcijas; LS – lizāta supernatants; LP – lizāta nogulsnes; PH – pirms 3. hromatogrāfijas.

Pēc iegūtajiem SDS-PAGE gēliem varēja redzēt, ka visās hromatogrāfiju frakcijās kā dominējošā ir redzama josla nedaudz zem 35 kDa. AP205- α -sinukleīna molekulārā masa ir 29 kDa, taču nestrukturētiem proteīniem ir raksturīgi SDS-PAGE gelā uzrādīt no 1,2 līdz pat 1,8 reizēm lielāku molmasu un migrēt lēnāk par strukturētiem proteīniem ar tādu pašu molmasu [57, 58]. Tas ir izskaidrojams ar to, ka nestrukturēti proteīni saista mazāku daudzumu SDS, samazinot masas/lādiņa attiecību [58]. Pēc pirmās hromatogrāfijas (skat. 3.2. att. A) ir redzama arī josla nedaudz virs dominējošās, taču jau pēc otrās hromatogrāfijas (skat. 3.2. att. B) tā izzūd. Kopumā pēc attīrīšanas SDS-PAGE gelā nav novērojami nozīmīgi piemaisījumi lielā daudzumā.

Analizējot paraugus pirms un pēc indukcijas (skat. 3.2. att. C), novēroja konjugāta joslas parādīšanos nedaudz zem 35 kDa references marķiera. Savukārt analizējot lizāta supernatantu un nogulsnes (skat. 3.2. att. C), novēroja, ka konjugāts ir šķīstošs un praktiski pilnībā pārgāja supernatantā, bet nogulsnēs vairāk novēroja piemaisījuma (virs 35 kDa) pāriešanu.

Lai pārliecinātos par VLP veidošanos un lai noteiktu agregātu klātbūtni, izmantoja arī NAGE elektroforēzes (skat. 3.3. att.) analīzi. NAGE gēla vizualizēšanai izmantoja UV gaismu.



3.3.att. NAGE elektroforēzes analīze. A: frakcijas pēc *Sepharose 4FF* gelfiltrācijas; B: pēc jonapmaiņas ar DEAE kolonnu; C: pēc *Superdex 200* gelfiltrācijas, kur M- marķieris, 1-15- attiecīgās frakcijas pēc attīrīšanas.

Pēc pirmās attīrīšanas (skat. 3.3. att. A) pirmajās 3 frakcijās novēroja joslu pie starta, kas atbilst agregātiem. No 1. līdz 14. frakcijai lielākoties varēja novērot joslu ap 3000 bp, kas parāda, ka VLP daļiņas ir izveidojušās. Novēro arī mazāk intensīvu joslu ap 5000 bp.

Otrajā attīrīšanā (skat. 3.3. att. B) agregātus vairs nenovēroja. Bija redzama raksturīgā konjugāta josla ap 3000 bp, kā arī mazas koncentrācijas nukleīnskābju piemaisījums ap 300 bp.

Pēc pēdējās attīrīšanas (skat. 3.3. att. C) nenovēroja nukleīnskābju piemaisījumus, bet novēroja konjugātam raksturīgo joslu ar niecīgu piemaisījuma daudzumu.

Pēc sekmīgas attīrīšanas no proteīna producēšanas 2TY barotnē (0,4 L) ieguva tīru AP205- α -sinukleīna konjugātu ar koncentrāciju 10 mg/mL (1 mL).

Tālāk veica proteīna iegūšanu minimālajā M9 barotnē, izmantojot iepriekš iegūtos datus kā pamatu.

3.2. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana *E. coli* šūnās M9 barotnē

Lai sagatavotu proteīnu KMR analīzei, ir jāveic tā iegūšana ar ^{13}C un ^{15}N iezīmi, kas ievērojami sadārdzina proteīnu producēšanu. Tādēļ sākumā veica proteīna iegūšanu minimālajā M9 barotnē bez iezīmēm. Barotni pagatavoja, autoklavējot fosfātus, hlorīdus un amonija hlorīdu. Pēc autoklavēšanas pievienoja filtrētus atlikušos komponentus (skat. 3. pielikumu). Sējmateriāla pagatavošanai izmantoja iepriekš pagatavoto M9 barotni bez iezīmēm.

Sākumā veica AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšanas apstākļu optimizēšanu (skat. 2 nodaļas 2.1. tab.). Optimizēšanu veica vienāda tilpuma (100 mL) barotnē. Pārbaudīja inducētāja daudzuma, producēšanas temperatūras un laika ietekmi, kā arī piedevas ietekmi.

Pēc inducēšanas novēroja, ka lielākas producēšanas daudzums bija tad, kad inducēja ar 500 μL IPTG, pievienoja 500 μL 80% glicerīna un kratīja 16 h 25 °C, bet vismazākais, kad inducēja ar 100 μL IPTG un kratīja 4 h 37 °C. Tad no katra parauga pēc inducēšanas paņēma alikvotu un veica SDS-PAGE un NAGE elektroforēzes analīzi.

SDS-PAGE gelā novēroja, ka vislielākā AP205- α -sinukleīna konjugāta koncentrācija ir tad, kad producēšanu veica 25 °C ar pievienotu glicerīnu (3), bet vismazāk – kad producēja 20 °C bez piedevas (1). Pēc NAGE novēroja, ka, producējot 37 °C, VLP daļiņas nenovēro, bet pārējos apstākļos novēroja VLP raksturīgo joslu. Pēc abām analīzēm secināja, ka labākie producēšanas apstākļi bija 25 °C temperatūra ar vai bez glicerīna piedevas.

Lai noteiktu, vai minimālajā M9 barotnē producētais konjugāts ir šķīstošs, savāca šūnas pēc vispārīgā apraksta (skat. 2.2.2. apakšnodaļu), no katra parauga paņēma alikvotu (~ 20 mg) un lizēja. Paņēma alikvotas no lizāta suspensijas. Pēc centrifugēšanas paņēma alikvotas no

lizātu supernatantiem, bet nogulsnes suspendēja 1x PBS (500 µL) un iegūtos paraugus analizēja ar SDS-PAGE un NAGE elektroforēzi.

Novēroja, ka visos optimizēšanas apstākļos konjugāts pāriet šķīstošajā lizāta supernatanta fāzē, savukārt nogulsnēs atliek niecīgs konjugāta daudzums un lielākā daļa piemaisījuma ar joslu virs 35 kDa.

Pēc iegūtajiem gelu analīzes rezultātiem atlasīja 2. un 3. apstākļus (skat. 2.1. tab.). Šūnas lizēja un lizātu attīrīja ar gelfiltrācijas hromatogrāfijas kolonnu *Sepharose 4 Fast Flow* un tad - ar jonapmaiņas hromatogrāfijas *DEAE* kolonnu. Frakciju analizēšanu veica ar NAGE elektroforēzi.

Pēc jonapmaiņas hromatogrāfijas NAGE gelā nenovēroja VLP daļiņu raksturīgo joslu, kas bija redzamas pēc gelfiltrācijas. Tas liecina par to, ka daļiņas pēc šī attīrīšanas soļa nav stabilas.

Kad noskaidroja labākos konjugāta producēšanas apstākļus un kad noskaidroja tā stabilitāti pēc attīrīšanas, veica producēšanu minimālajā M9 barotnē ar ^{13}C un ^{15}N iezīmi. Producēšanu sākotnēji veica mazā tilpumā (200 mL), lai pārbaudītu, vai VLP daļiņas būs stabilas.

Šoreiz barotnes pagatavošanu veica nedaudz citādi nekā bez iezīmēm: barotnes (200 mL) autoklavēšanu veica bez $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ - to pievienoja pēc autoklavēšanas līdz ar citiem komponentiem, tos pirms tam filtrējot. Pārējos šķīdumus atkārtoja pēc iepriekš atrastajiem labākajiem inducēšanas apstākļiem (25 °C, 16 h, 0,25 mM IPTG). Pēc produkcijas OD_{600} vērtība bija 0,8.

Paņēma alikvotu šūnu un lizēja. Savāca lizāta supernatantu un pārbaudīja konjugāta nogulsnēšanu ar dažāda daudzuma piesātinātu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (skat. 3.1. tab.).

3.1. tabula

Konjugāta nogulsnēšana ar piesātinātu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Nr.	Lizāts, µL	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, µL
1	100	10	11
2	100	20	25
3	100	30	43
4	100	40	67

Pēc $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pievienošanas suspensiju 1 h turēja uz ledus, pēc tam centrifugēja un paņēma alikvotu no supernatanta (L). Atlikušo supernatantu nolēja un nogulsnēm pievienoja ekstrakcijas buferšķīdumu, suspendēja un centrifugēja. Paņēma alikvotu no supernatanta (ES) un nogulsnēm (EP) un veica SDS-PAGE elektroforēzi.

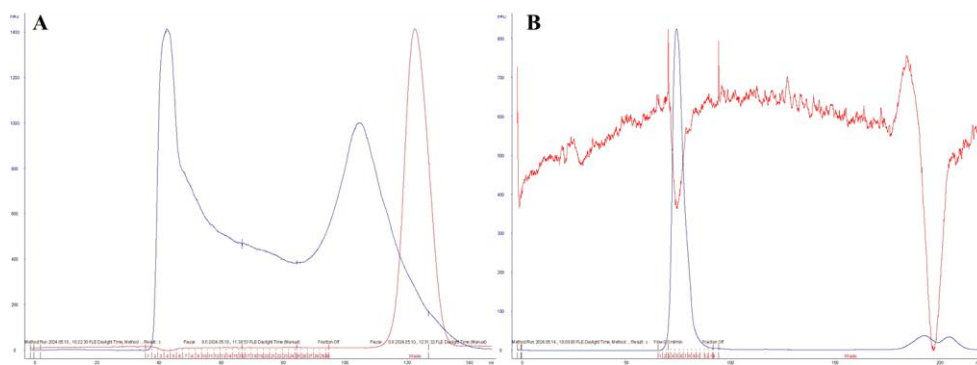
Iegūtie rezultāti parādīja, ka AP205- α -sinukleīna konjugāts pēc gulsnēšanas praktiski neatrodas šķīdumā, savukārt pēc ekstrakcijas tas atrodas gan supernatantā, gan pie nogulsnēm, taču nogulšņu frakcijā arī pāriet lielākais piemaisījums. Līdz ar to pieņēma lēmumu turpmāk iekļaut nogulsnēšanu kā vienu no attīrīšanas soļiem.

Atlikušo daudzumu lizēja, gulsnēja un ekstrahēja. Ekstrakcijas supernatantu attīrīja ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju *Sepharose 4 Fast Flow* kolonnu. Pēc frakciju analizēšanas ar NAGE elektroforēzi novēroja, ka VLP daļiņas ir sadalījušās.

Tā kā iegūtie rezultāti pēc gelfiltrācijas hromatogrāfijas atšķīrās no neiezīmētā parauga rezultātiem, secināja, ka, iespējams, atšķirības radās barotnes pagatavošanas laikā: neiezīmētajā barotnē NH_4Cl autoklavēja, bet iezīmētajā – ne. Tādēļ pārbaudīja $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ autoklavēšanas ietekmi.

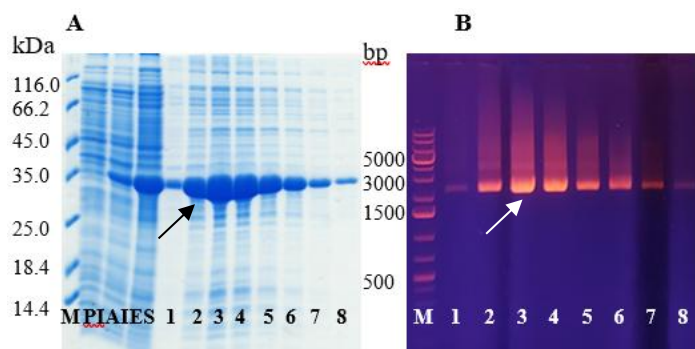
Pagatavoja M9 barotni ar $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ iezīmi. Barotni sadalīja divās vienādās daļās – vienā pievienoja parasto glikozi, bet otrā – ^{13}C iezīmētu. Šoreiz sējmateriālu pagatavoja LB barotnē, pirms tā pievienošanas M9 barotnei veica tā pārmazgāšanu ar fizioloģisko šķīdumu. Pēc centrifugēšanas fizioloģisko šķīdumu nolēja, šūnas resuspendēja M9 barotnē un producēja konjugātu. Iegūtās šūnas lizēja un attīrīja kā iepriekš. Frakciju NAGE gelā novēroja VLP klātbūtni gan ^{12}C , gan ^{13}C glikozes paraugā.

Visbeidzot veica AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšanu ^{15}N un ^{13}C iezīmētā barotnē (1,5 L) pēc vislabākajiem optimizēšanas rezultātiem (skat. 2.2.2. apakšnodaļu): $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ autoklavēja, inducēja ar 0,25 mM IPTG, producēja 25 °C 16 h. Konjugātu attīrīja, nogulsnējot to ar 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ un attīrot ar *Sepharose 4 Fast Flow* gelfiltrācijas kolonnu, pēc kuras sekmīgi attīrīja konjugātu ar atkārtotu gelfiltrācijas hromatogrāfiju (kolonna *Superdex 200*, skat. 3.4. att.).



3.4.att. Hromatogrammu attēli pēc ^{13}C un ^{15}N iezīmēta konjugāta attīrīšanas. A: *Sepharose 4FF* gelfiltrācija; B: *Superdex 200* gelfiltrācija.

Iegūto tīra konjugāta frakciju analīze ar SDS-PAGE un NAGE elektroforēzi parādīta 3.5. attēlā (pēc otrās attīrīšanas).



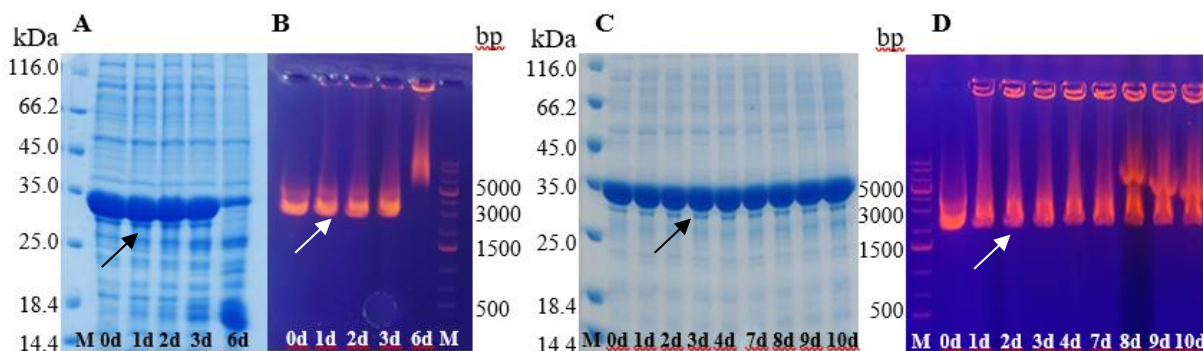
3.5.att. A: SDS-PAGE gels un B: NAGE gels pēc otrās gelfiltrācijas ^{13}C un ^{15}N iezīmētam AP205- α -sinukleīna, kur M- marķieris, PI- pirms indukcijas, AI- pēc indukcijas, ES- ekstrakta supernatants un 1-8 - frakcijas.

Pēc elektroforēzes rezultātiem novēroja, ka konjugātā esošās VLP daļiņas ir saglabājušās, kā arī konjugāts ir iegūts ar augstu tīrību. Ieguva AP205- α -sinukleīna konjugātu ar koncentrāciju 24 mg/mL (kopējais tilpums - 0,72 mL).

3.3. AP205- α -sinukleīna konjugāta fibrilizēšana un oligomerizēšana

Lai pārbaudītu, vai iegūtais AP205- α -sinukleīna konjugāts fibrilizējas vai oligomerizējas, veica vairākus mēģinājumus ar dažādiem apstākļiem, balstoties uz literatūrā atrodamajām metodēm (skat. 2. nodaļas 2.2. tab.). Ja nav norādīts citādi, katram paraugam pievienoja PMSF līdz beigu koncentrācijai 1 mM. Katram paraugam ņēma alikvotas katru dienu līdz 10 dienām, un tās pēc fibrilizēšanas beigām pārbaudīja ar SDS-PAGE un NAGE elektroforēzi.

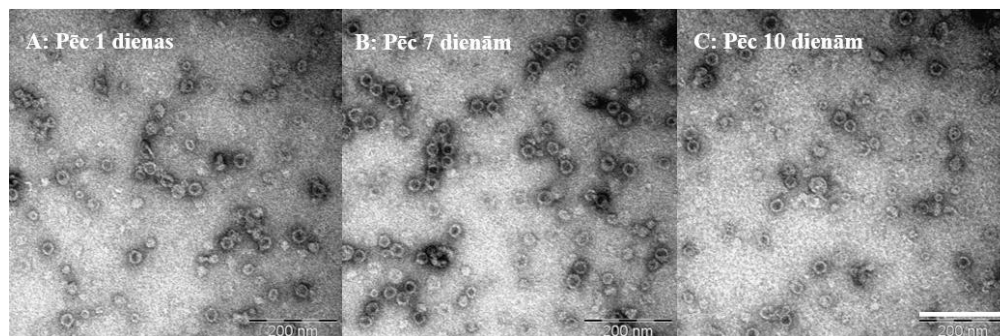
Visos apstākļos, izņemot 1. un 2., nenovēroja izmaiņas, salīdzinot ar sākotnējo nefibrilizēto paraugu. Pirmajā mēģinājumā (nr. 1, skat. 2.2. tab.), kad nebija pievienots PMSF, SDS-PAGE gelā novēroja α -sinukleīna atšķelšanos no AP205 (skat. 3.6. att. A un B), kā arī NAGE gelā nenovēroja ierasto VLP signālu. Savukārt, veicot atkārtotu mēģinājumu tajā pašā buferšķīdumā, bet ar pievienotu PMSF, NAGE gelā novēroja jauna signāla rašanos, bet SDS-PAGE gels neuzrādīja nekādas izmaiņas (skat. 3.6. att. C un D).



3.6.att. A un B: SDS-PAGE un NAGE gels fibrilizēšanai 1x PBS bez PMSF; C un D: SDS-PAGE un NAGE gels fibrilizēšanai 1x PBS buferšķīdumā ar PMSF.

Var secināt, ka PMSF pievienošana ir nepieciešama, lai konjugāts nesadalītos fibrilizēšanas laikā.

Pēc tam paņēma alikvotas no 1., 7. un pēdējās fibrilizēšanas dienas paraugiem no fibrilizēšanas apstākļiem 2 līdz 6 (skat. 2.2. tab.) un uzņēma elektronmikroskopijas attēlus, lai pārbaudītu, vai novēro fibrillas (skat. 3.7. att.).



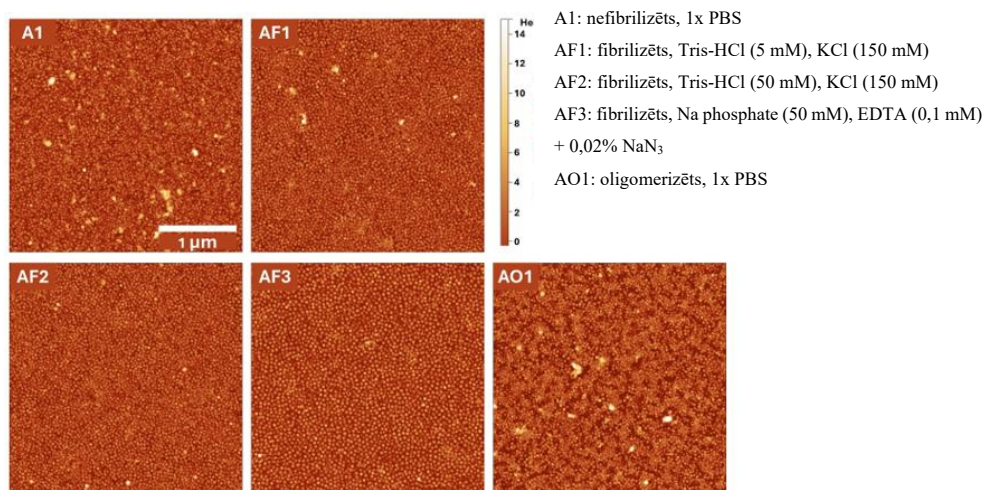
3.7.att. TEM attēli fibrilizētajiem paraugiem (1x PBS + 1 mM PMSF).

Nevienam paraugam nenovēroja fibrillām vai oligomēriem līdzīgas struktūras.

Veica arī vienu oligomerizēšanas mēģinājumu (skat. 2.2.4. apakšnodaļu), taču arī šajā gadījumā nenovēroja izmaiņas SDS-PAGE, NAGE vai elektronmikroskopijas analīzē.

Papildus TEM, veica arī daļu fibrilizēto paraugu atomspēku mikroskopijas (AFM) attēlu uzņemšanu.

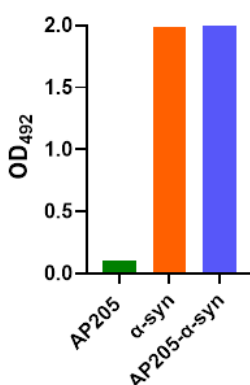
AFM attēlus uzņēma katram fibrilizētajam paraugam. Nevienā no iegūtajiem AFM attēliem nenovēroja fibrillāriem vai oligomeriskiem agregātiem tipiskas struktūras. Lielākus sakopojumus ar lielāku augstumu varēja novērot paraugos 1x PBS buferšķīdumā (skat. 3.8. att.), bet tas tik un tā neliecināja par fibrillu veidošanos.



3.8.att. AFM attēli nefibrilizētajam (A1) un fibrilizētajiem (AF1, AF2, AF3) un oligomerizētajam (AO1) konjugāta paraugiem.

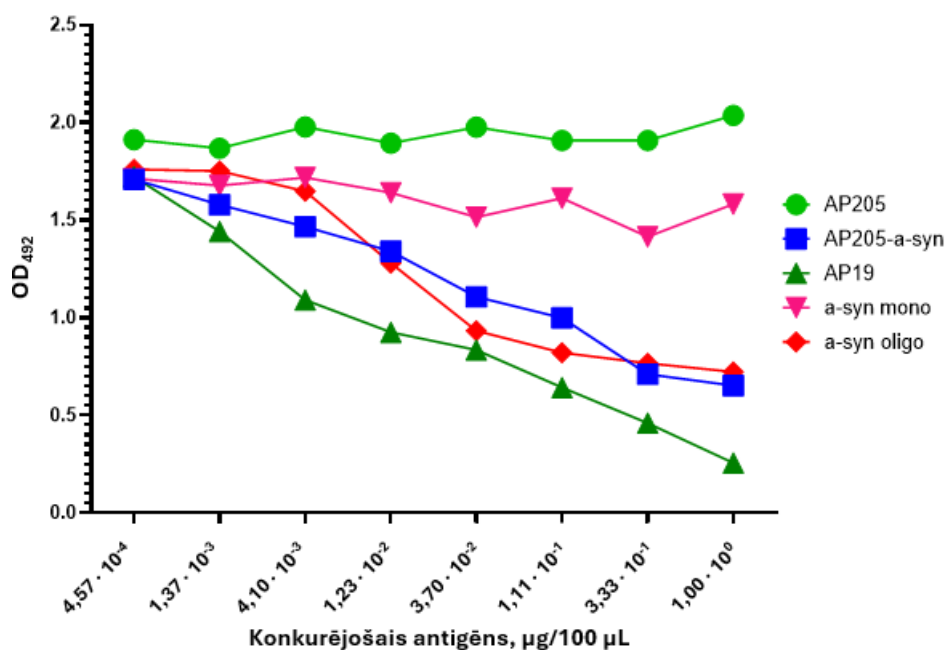
3.4. AP205- α -sinukleīna konjugāta antigenitātes tests

Lai pārbaudītu, vai iegūtais konjugāts saistās ar α -sinukleīna trušu MJFR 14-6-4-2 šķīdumu antivielām, veica tā *ELISA* testu un salīdzināja ar monomērisku AP205 un monomērisku α -sinukleīnu. Veica trīs paralēlus mērījumus un no tiem aprēķināja vidējo aritmētisko, ko izmantoja tālākiem aprēķiniem. Iegūtie rezultāti parādīja, ka monomēriskais AP205 nesaista antivielas, ko varēja novērot pēc OD vērtībām. Savukārt AP205- α -sinukleīna konjugāts un monomēriskais α -sinukleīns tās saista vienlīdz labi. Antivielu titru varēja noteikt pie atšķaidījuma 1:64000. Salīdzinājumam iegūtie rezultāti pie antivielu atšķaidījuma 1:1000 parādīti 3.9. attēlā.



3.9. att. *ELISA* testa OD₄₉₂ vērtības pie antivielu atšķaidījuma 1:1000.

Papildus netiešajam *ELISA* testam veica arī konkurējošo *ELISA*. Ar konkurējošo *ELISA* pārbaudīja, kāda ir AP205- α -sinukleīna spēja saistīt antivielas, salīdzinot ar monomērisku, oligomērisku α -sinukleīnu, AP19 (AP205 un α -sinukleīna 127-140 epitops) un AP205. Sākotnēji uz plates bedrītēm uznestas AP205- α -sinukleīna konjugātu, un pēc bloķēšanas bedrītēs pievienoja antivielu un 5 antigēnu maisījumu. Pēc *ELISA* testa veikšanas un iegūtajām OD₄₉₂ vērtībām novēroja, ka AP205 un monomēriskais α -sinukleīns nesaista antivielas, bet vislabāk antivielas saista AP19. AP205- α -sinukleīna konjugāts un α -sinukleīna oligomēri antivielas saista vienlīdz labi (skat. 3.10. att.). Vērtības uz *x* ass ir attēlotas logaritmiskā skalā.

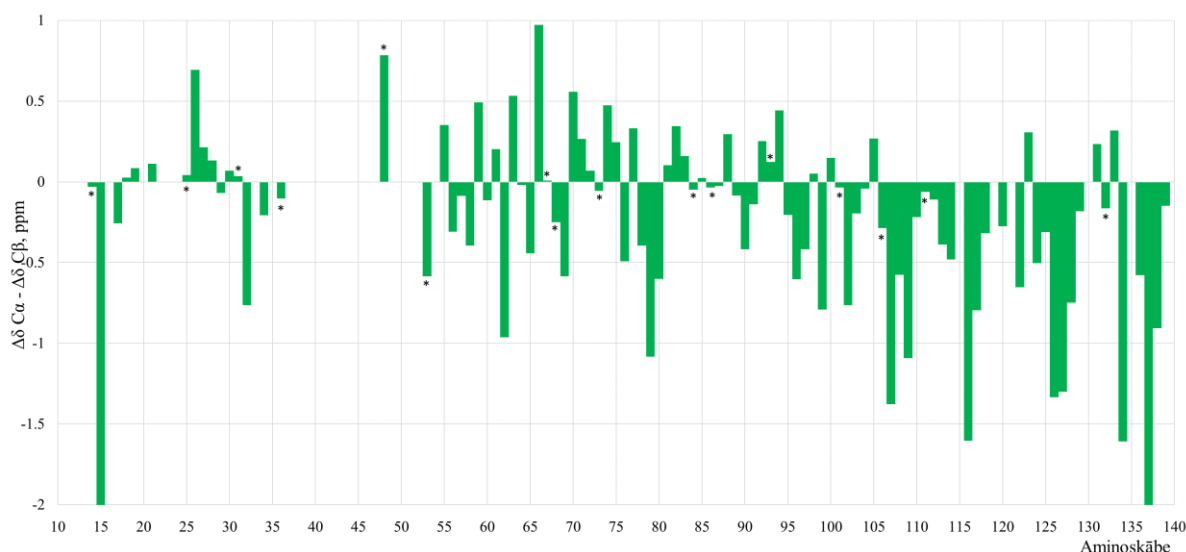


3.10. att. Konkurējošās ELISA tests (pret AP205- α -sinukleīna konjugātu) pie OD= 492 nm. Vērtības uz x ass attēlotas log skalā.

3.5. AP205- α -sinukleīna konjugāta biofizikālā analizēšana

3.5.1. KMR spektroskopija

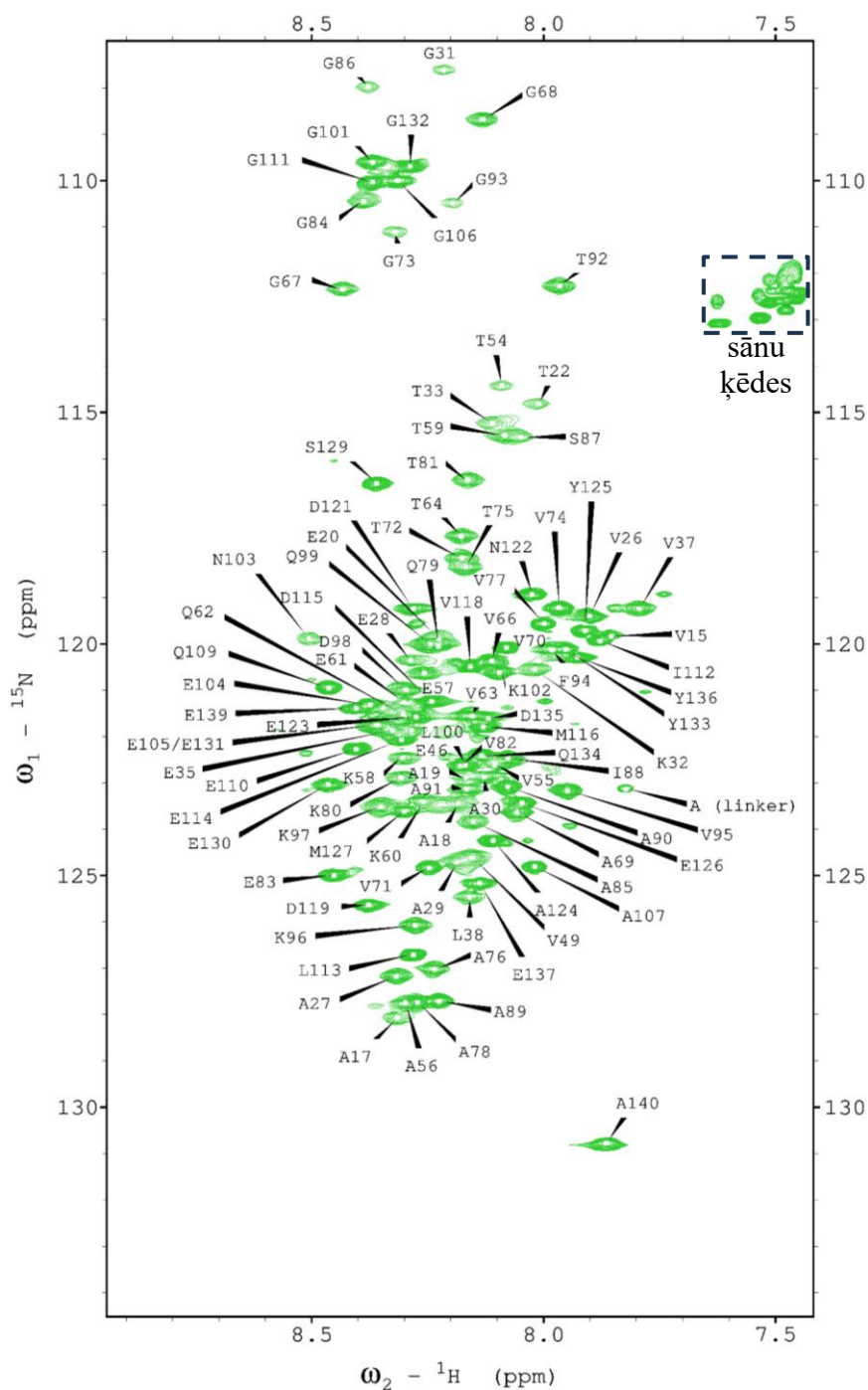
AP205- α -sinukleīna pamatvirknes ^1H , ^{13}C un ^{15}N ķīmisko nobīžu interpretāciju veica ar multidimensionāliem spektriem [59–61]. Noteica proteīna pamatvirknes HN, C=O, C α un C β ķīmiskās nobīdes. Izmantojot C α un C β vērtības, aprēķināja aminoskābju tieksmi veidot otrējās struktūras elementus, kā aprakstīts 2. nodaļā [55]. No 140 α -sinukleīna aminoskābēm noteica 103 no tām (74%). Ieguva grafiku, kurā atliktas aminoskābes no 14 līdz 140, kurām aprēķināta $\Delta\delta\text{C}\alpha - \Delta\delta\text{C}\beta$ vērtība (skat. 3.11. att.). Sīkāka interpretācija veikta 4.4.1. apakšnodaļā.



3.11. att. AP205- α -sinukleīna $\Delta\delta\text{C}\alpha - \Delta\delta\text{C}\beta$ vērtību shematiskais attēlojums.

Pēc iegūtajiem rezultātiem novēro, ka proteīns ir nestrukturēts: ja tam būtu β -sloksnes, tad novērotu vismaz trīs pēc kārtas esošo aminoskābes ar vērtību -1,0 ppm vai vairāk. Savukārt α -spirālei ir raksturīga 4 pēc kārtas esošu aminoskābju secība ar 1,0 ppm vērtību vai vairāk. Grafikā ar zvaigznīti ir atzīmēti glicīna atlikumi, tā kā glicīnam nav C β oglekļu.

Noteikto aminoskābju atlikumu H-N korelāciju atlika 2D H-N-HSQC spektrā (skat. 3.12. att.). Numerācija veikta pēc α -sinukleīna aminoskābju ķēdes. Ar raustīto līniju ir iezīmēts sānu ķēžu reģions, kuram neveica ķīmisko nobīžu noteikšanu. Sānu ķēdes neņem vērā otrējās struktūras aprēķināšanai, un to ķīmisko nobīžu noteikšanai ir nepieciešami papildus KMR eksperimenti, kas ir sarežģīti un prasa ilgāku laiku. Pilna konjugāta sekvenca, molmasa un ekstinkcijas koeficienta vērtība redzama 4. pielikumā. Noteiktās ķīmiskās nobīdes atrodamas 6. pielikumā.



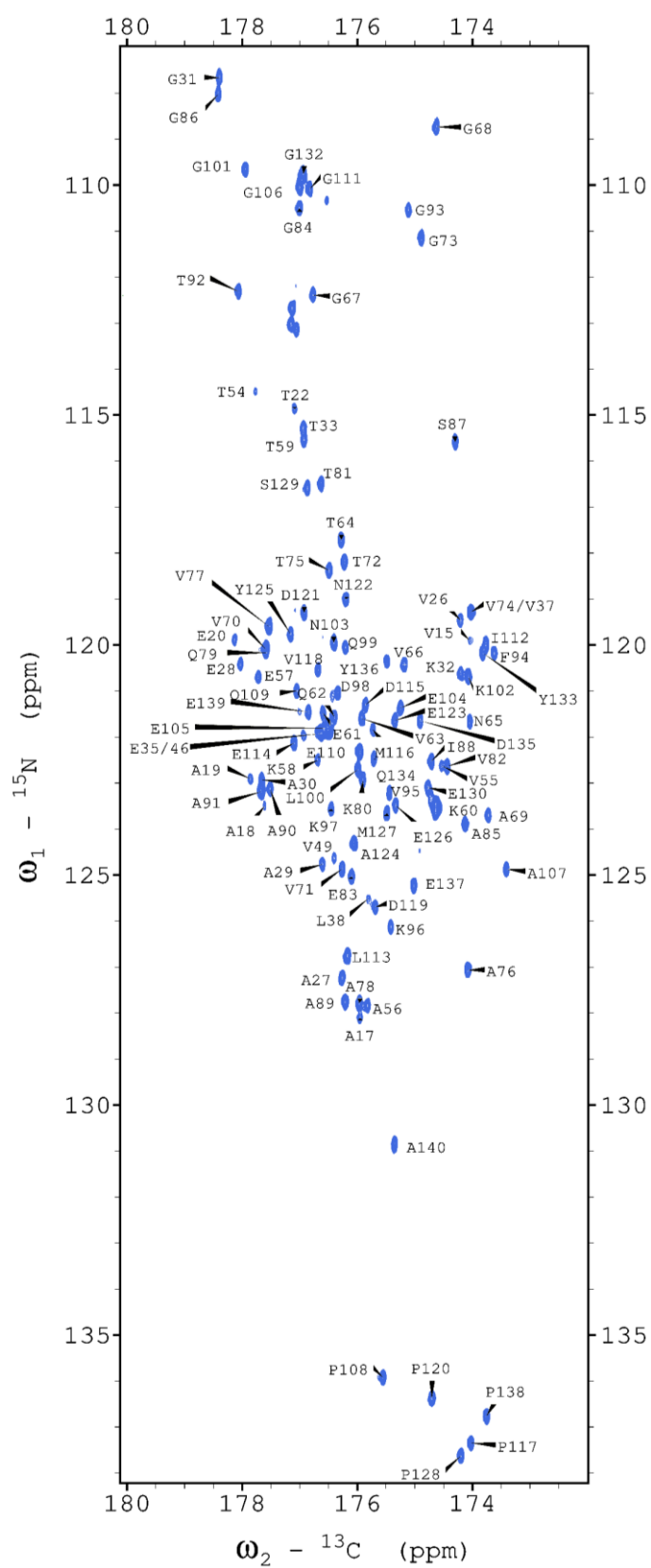
3.12. att. AP205- α -sinukleīna 2D H-N-HSQC spektrs.

Kopumā novēroja korelācijas signālus, kas atbilst α -sinukleīnam, kā arī vienu linkera daļas aminoskābes atlikumu. Pilnībā noteica proteīna NAC un C- gala esošās aminoskābes, savukārt no N- galā esošajām aminoskābēm izdevās noteikt tikai trešdaļu.

Alfa-sinukleīna sekvencē ir pieci prolīni, kas apgrūtina pamatvirknes ķīmisko nobīžu noteikšanu. Prolīns ir otrējais amīns, kuram peptīdsaites veidošanās rezultātā rodas amīda protona iztrūkums, kas neveido magnetizācijas pārnesei svarīgo H-N saiti. Tas veido pārtraukumus proteīna pamatķēdes noteikšanas eksperimentos, kas ir bāzēti uz NH protonu detekciju. Līdz ar to ir nepieciešams veikt eksperimentus, kuros neizmanto ^1H detektēšanu, piemēram, ^{13}C detekcijas eksperimentus.

Šos spektrus uzņēma ar ^{13}C detektēšanai paredzēto kriožondi, un tas ļāva uzlabot jutību KMR spektros. Kopumā identificēti 98% no 105 signāliem NCO korelācijas signāliem. Divus NCO signālus nebija iespējams noteikt, jo tie neuzrādīja nekādu korelāciju 3D eksperimentos, līdz ar to nebija iespējams noteikt, kāda aminoskābe tā varētu būt. Ķīmiskās nobīdes vienam no signāliem bija 121,12/176,43 ppm, bet otram – 121,98/176,93 ppm. Šīs nobīdes atbilst vairākām aminoskābēm, izņemot glicīnu, alanīnu, treonīnu, serīnu un prolīnu.

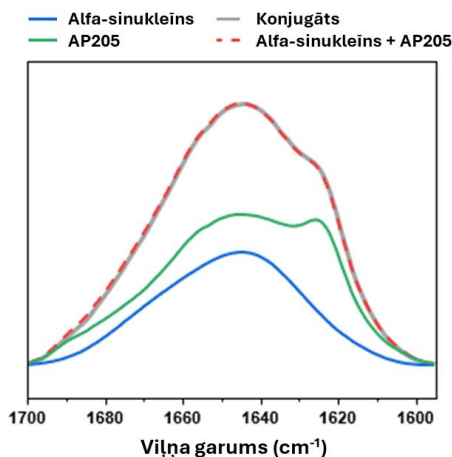
Iegūtais NCO spektrs redzams 3.13. attēlā. Ar raustīto līniju ir iezīmēts sānu ķēžu reģions, kuram neveica KMR spektru uzņemšanu un ķīmisko nobīžu noteikšanu.



3.13. att. AP205- α -sinukleīna 2D NCO spektrs.

3.5.2. FTIR spektroskopija

Lai noskaidrotu, vai AP205- α -sinukleīna konjugātam otrējā proteīnu struktūra atšķiras no tīra AP205, α -sinukleīna un to maisījuma, uzņēma un salīdzināja visu paraugu FT-IR (*FTIR*). Rezultāti parādīti 3.14. attēlā.



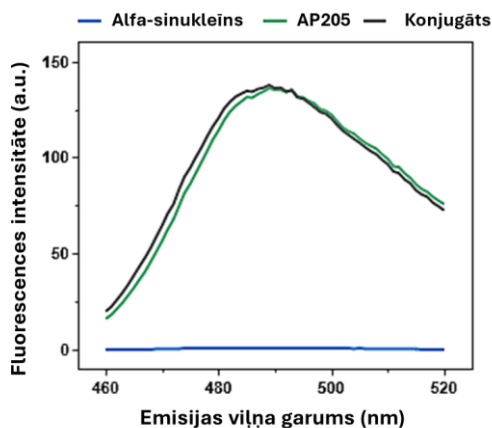
3.14. att. AP205, α -sinukleīna, to maisījuma (α -sinukleīns + AP205) un konjugāta FTIR spektri.

Pēc iegūtajiem rezultātiem novēroja, ka α -sinukleīna, AP205 un to konjugāta absorbcijas līknes savstarpēji atšķīrās, savukārt nekonjugētā α -sinukleīna un AP205 maisījuma līkne pilnībā sakrita ar konjugāta līkni.

Konjugāta un abu komponentu maisījuma līknes formā ir izteikti divi pleci ar maksimumu pie 1645 cm⁻¹ un 1625 cm⁻¹. Visām līknēm absorbcijas maksimums novērojams ap 1645 cm⁻¹.

3.5.3. ThT saistīšanās

Veica ThT saistīšanās fluorescences mērījumus monomēriskam α -sinukleīnam, AP205 un abu konjugātam (skat. 3.15. att.).



3.15. att. AP205, α -sinukleīna un to konjugāta ThT saistīšanās fluorescences līkne.

Pēc ThT saistīšanās novēroja, ka monomēriskam α -sinukleīnam nav fluorescences, bet AP205 un abu konjugātam fluorescences līkne ir praktiski vienāda – tās intensitātes maksimums ir ap 150 a. u. Tas liecina par to, ka AP205 saistījās ar ThT, bet α -sinukleīns nav saistījies.

4. DISKUSIJA

4.1. AP205- α -sinukleīna konjugāta producēšana M9 barotnē

Proteīna parauga iegūšanai KMR analīzei bija jāveic iezīmēta proteīna iegūšana. Tādā gadījumā proteīna producēšanu veic minimālajā M9 barotnē, kur par slāpekļa avotu kalpo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, bet par oglekļa – pilnībā ar ^{13}C iezīmēta glikoze. Kopumā veiksmīgi izdevās iegūt tīru konjugātu pietiekamā daudzumā pēc optimizēšanas veikšanas: pēc 2 hromatogrāfijām no 1,5 L barotnes ar ^{13}C un ^{15}N iezīmi ieguva konjugāta šķīdumu ar koncentrāciju 24 mg/mL (0,72 mL). Ja salīdzina ar konjugāta producēšanu parastajā 2TY barotnē, kur iznākums no četrreiz mazāka barotnes daudzuma (0,4 L) pēc 3 hromatogrāfijām ir 10 mg/mL (1,00 mL), tad var secināt, ka M9 barotnē iegūtais daudzums ir mazāks. Šāds rezultāts bija sagaidāms, jo minimālajā M9 barotnē nav tik liels *E. coli* augšanai nepieciešamo komponentu skaits.

Lai pārbaudītu, vai M9 barotnē producētais proteīns strukturāli neatšķiras no 2TY producētā, uzņēma ^1H -KMR spektrus un secināja, ka signāli sakrīt. Tas parāda, ka nav strukturālu atšķirību, ja producēšanu veic M9 un 2TY barotnēs.

4.2. AP205- α -sinukleīna konjugāta agregēšanas eksperimenti

Viens no Parkinsona slimības iemesliem ir abnormāla α -sinukleīna agregēšanās oligomēros un fibrillās, līdz ar to mēģināja pārbaudīt, kā notiek AP205- α -sinukleīna konjugāta agregācija.

Tā kā iepriekš literatūrā nav aprakstīta šāda konjugāta agregēšanās eksperimenti, mēģināja iegūt fibrillas vai oligomērus pēc iepriekš aprakstītajām monomēriska α -sinukleīna fibrilizēšanas [49, 50] un oligomerizēšanas metodēm [51]. Ir atrodami vairāki piemēri, kuros ar AFM vai EM uzņemtajos attēlos ir skaidri redzamas α -sinukleīna veidotās fibrillas. Arī ThT saistīšanās fibrilizēšanas eksperimenti uzrāda, ka, veidojoties fibrillām, palielinās fluorescences intensitāte, kas liecina par β -slokšņu veidošanos.

Sākotnēji fibrilizētos paraugus pārbaudīja ar SDS-PAGE un NAGE elektroforēzi. Paraugos ar pievienotu 1M PMSF SDS-PAGE gelos nenovēroja izmaiņas, savukārt NAGE gelā novēroja gan AP-205- α -sinukleīna VLP daļiņu klātbūtni, gan jaunu joslu 8., 9. un 10. dienā kā parādīts 3.3. nodaļā. Tas liecina par to, ka konjugāta molmasa ir saglabājusies, taču ir notikusi izmaiņa ar VLP daļiņu struktūru.

Fibrilizētos un oligomerizētos paraugus analizēja ar AFM un TEM mikroskopiju, un nevienā paraugā neatrada fibrillām vai oligomēriem līdzīgas struktūras. Tas var liecināt par to, ka proteīna konjugēšana ar VLP ir agregēšanai traucējošs faktors. Iespējams, ka konjugēšana izraisīja stēriskus traucējumus, kas traucēja daļiņām savstarpēji saistīties un veidot agregātus vai VLP virsmas veidotās hidrofoobās/hidrofilās vai lādiņa atkarīgās mijiedarbības traucē agregācijas norisei.

Pārbaudīja nefibrilizēta AP205- α -sinukleīna konjugāta, monomēriskā AP205 un monomēriskā α -sinukleīna saistīšanās spēju ar ThT. Ieguva rezultātus, kuros novēroja, ka AP205 un tā konjugāta ar α -sinukleīnu emisijas līknes ir vienādas, taču α -sinukleīna līkne neuzrādīja fluorescenci. Tas liecina par to, ka AP205 spēj saistīties ar ThT AP205 struktūrā esošo β -slokšņu dēļ.

Lai pārbaudītu, vai AP205- α -sinukleīna konjugātam nav spējas fibrilizēties vai oligomerizēties, būtu jāveic lielāka agregēšanas apstākļu pārbaude. Taču fakts, ka šāds vakcīnas prototips neagregējas, parāda to, ka tas varētu būt drošs un pats par sevi neveidotu neirotoksiskus agregātus. Šajā darbā veiktie agregēšanās eksperimentu rezultāti tika pārbaudīti ar vairākām metodēm, kas parāda, ka iegūtie rezultāti ir ticami.

4.3. *ELISA* antigenitātes testi

Iegūtie netiešās *ELISA* testa rezultāti parādīja, ka antivielas vienlīdz labi saista gan AP205- α -sinukleīns, gan monomēriskis α -sinukleīns. Monomēriskis α -sinukleīns antivielas saista tādēļ, ka, to absorbējot uz plates bedrītes, tas uzvedas kā oligomērs. Kopumā pēc rezultātiem var spriest, ka VLP konjugāts spēj atdarināt α -sinukleīna agregātus, ko sekmīgi atpazīst antivielas. Savukārt pats AP205 monomērs to nespēj izdarīt.

Pēc konkurējošā *ELISA* testa datiem var secināt, ka vislabāk antivielas saista AP19. Tad nedaudz labāk par α -sinukleīna oligomēriem antivielas spēj saistīt AP205- α -sinukleīna konjugāts. Tas parāda to, ka izveidotais konjugāts ir potenciāls vakcīnkandidāts, jo antivielas to spēj atpazīt tikpat labi kā kaitīgos oligomērus. Jau iepriekš literatūrā *Liekņina* [5] apraksta, ka AP19, kas ir AP205 konjugāts ar α -sinukleīna C- gala epitopu no 127 līdz 140 aminoskābes atlikumam, ļoti labi saistās ar antivielām. Var secināt, ka pilna uz garuma AP205- α -sinukleīna konjugāta atrodas tas pats 127-140 epitops nemainītā stāvoklī, un tas saista antivielas.

4.4. AP205- α -sinukleīna konjugāta biofizikālie eksperimenti

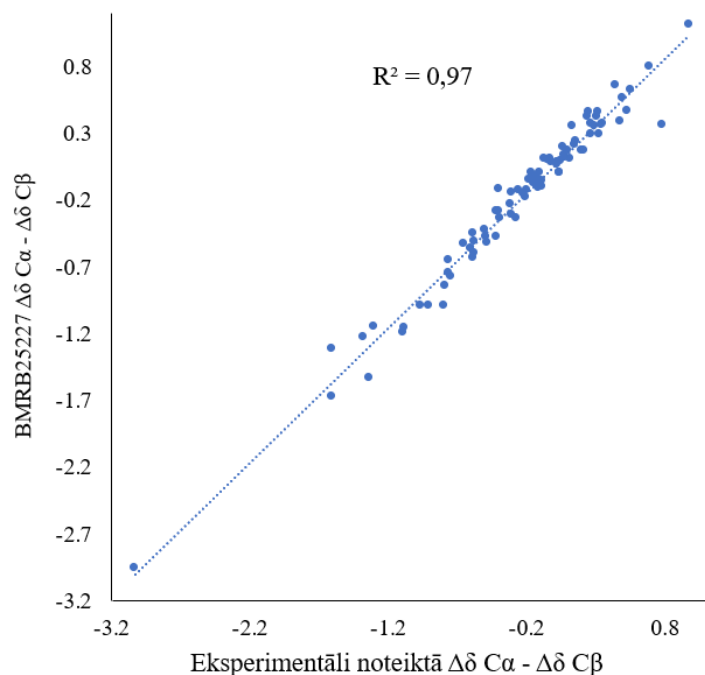
4.4.1. KMR spektroskopija

Pēc iegūtajiem rezultātiem VLP daļu šķīduma KMR nenovēro. Tas izskaidrojams ar daļiņas lielo izmēru: tā lēni kustas šķīdumā, un iegūtie signāli ir pārāk plati, lai tos detektētu. Arī iepriekš *Lieknina et al.* demonstrēja, ka AP205 VLP daļa šķīduma KMR spektros neuzrādās [5].

Alfa-sinukleīnam novēroja C-gala un NAC reģionā esošo aminoskābju atlikumus, savukārt N-gala aminoskābju atlikumus novēroja vien trešdaļai. To varētu skaidrot ar to, ka N-gals atrodas tuvu pie AP205 daļas un mijiedarbību dēļ tas ir mazkustīgs un praktiski nedetektējams ar šķīduma KMR. Lai to novērotu, būtu jāveic papildus eksperimenti ar cietvielu KMR, kas ļauj iegūt informāciju par mazkustīgiem reģioniem.

Alfa-sinukleīna aminoskābju sekvencē ir novērojami 4 reģioni, kuros aminoskābju secība ir ļoti līdzīga (EGTKQGV, GKTKEGV, SKTKEGV un EKTKEQV), līdz ar to tas apgrūtina precīzu konkrētās aminoskābes noteikšanu. Piemēram, identificēt konkrētus lizīnus. Arī literatūrā ir minēts, ka šādi atkārtojumi traucē KMR spektru interpretācijai [62]. Lai pareizāk noteiktu aminoskābju atlikumu atrašanās vietu sarežģītos gadījumos, izmantoja salīdzinājumu ar vairākiem literatūrā atrodamajiem avotiem, kuri arī veica monomēriskā α -sinukleīna pētīšanu ar KMR [44, 62, 63]. Kopumā iegūtie signāli korelēja gan salīdzinot dažādus literatūras avotus savstarpēji, gan salīdzinot eksperimentāli noteiktos signālus ar literatūras avotiem.

Lai salīdzinātu, vai iegūtie otrējo struktūru aprēķinu rezultāti korelē ar literatūrā atrodamajām vērtībām BMRB bankā [64–68], aprēķināja literatūrā atrodamo monomēriskā α -sinukleīna otrējo struktūru pēc $C\alpha$ un $C\beta$ ķīmiskām nobīdēm. Iegūtos rezultātus salīdzināja ar eksperimentāli noteiktajām un izveidoja korelācijas grafikus (skat. 7. pielikumā). Kopumā iegūtie rezultāti bija ļoti līdzīgi – iegūtās R^2 vērtības uzrādīja augstu korelāciju. Vislielākā korelācija bija ar BMRB#25227: R^2 koeficienta vērtība bija 0,97 (skat. 4.1. att.) [64]. Autori spektra uzņemšanu veica nātrija fosfāta buferšķīdumā ar pievienotu NaCl ar pH=5 10 °C temperatūrā.



4.1.att. Korelācijas grafiks eksperimentāli noteiktajām un no BMRB 25227 [64] aprēķinātajām $\Delta\delta C\alpha - \Delta\delta C\beta$ vērtībām.

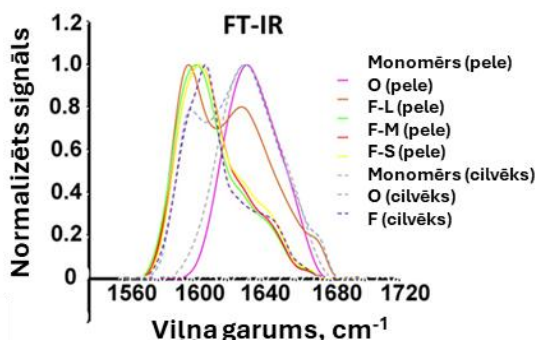
Atšķirības varēja rasties parauga vides dēļ – izmantotais buferšķīduma sastāvs, pH un eksperimenta temperatūra. Sliktāku korelāciju novēroja ar paraugiem, kas tika uzņemti HEPES buferšķīdumā [66, 68] Korelācija ar literatūras datiem ir augsta – tas liecina par to, ka AP205- α -sinukleīna konjugāta proteīna daļa saglabā tā monomērisko stāvokli un ir līdzīga brīvā formā esošajam α -sinukleīnam: AP205- α -sinukleīna konjugāts kā vakcīnas prototips atdarina α -sinukleīna monomēru un tas neveido sakārtotu struktūru, kāda ir novērojama agregātiem.

4.4.2. FTIR spektroskopija

Zandomenighi *et al.* [69] jau 2004. gadā aprakstīja to, ka FTIR spektroskopija ir efektīva metode monomērisku β -slokšņu proteīnu un amiloido fibrillu atšķiršanai. Lai pārbaudītu, vai konjugētā AP205- α -sinukleīna otrējā struktūra atšķiras no monomērisko komponentu sajaukuma un atsevišķi no AP205 un α -sinukleīna, veica paraugu FTIR analīzi. Visos gadījumos novēroja signālus ar maksimumu pie 1645 cm^{-1} (skat. 3.14. att. 3.5.2. apakšnodaļā), kas atbilst pamatvirknes peptīdsaitē esošā C=O svārstībām. AP205 un α -sinukleīna konjugētās un nekonjugētās formas spektri pilnībā sakrita, kas liecina par to, ka, konjugējot abus komponentus, struktūra nemainās. Monomēriska AP205 spektrs atšķiras no monomēriska α -sinukleīna spektru ar izteiktāku “plecu” ap 1625 cm^{-1} . Tas liecina par to, ka AP205 struktūrā atrodas elementi, kas atšķiras no α -sinukleīna.

Pēc literatūrā atrodamajām proteīnu FTIR spektriem, var noteikt, ka β -sloksnēm atbilst signāls ap 1625 cm^{-1} , bet ap 1645 cm^{-1} - nesakārtotām struktūrām. Tas liecina par to, ka mūsu iegūtā konjugāta FTIR spektrā ir novērojams AP205 veidotais β -slokšņu reģions, bet šis reģions

nav raksturīgs β -slokšņu bagātajām fibrillām. Kā arī, salīdzinot ar *Froula et al.* [70] datiem iegūtajiem monomēriska, oligomerizēta un fibrilizēta α -sinukleīna FTIR spektriem (skat. 4.2. att.), var secināt, ka šajā darbā iegūtā konjugāta FTIR spektrs (skat. 3.5.2. apakšnodaļas 3.14. att.) atbilst nefibrilizētajam, monomēriskajam α -sinukleīnam.



4.2. att. FTIR spektri monomēriskam, oligomerizētajam (O) un fibrilizētajam (F-L, F-M, F-S) α -sinukleīnam [70].

Kopumā pēc FTIR spektroskopijas var secināt, ka konjugāta struktūrā ir novērojama nesakārtotas struktūras signāls ap 1645 cm⁻¹, kas sakrīt ar literatūrā [70] atrodamo nefibrilizēta α -sinukleīna FTIR spektru. Signāls ap 1625 cm⁻¹ (skat. 3.5.2. apakšnodaļas 3.14. att.) liecina par AP205 struktūrā esošajām β -sloksnēm. Iegūtie rezultāti korelē ar ThT saistīšanās rezultātiem: AP205 struktūrā ir β -sloksnes, bet α -sinukleīnam tās nenovēro.

SECINĀJUMI

1. Rekombinantā ekspresijas sistēma *E. coli* šūnās un attīrīšana ar gelfiltrācijas un jonapmaiņas hromatogrāfiju ir efektīva metode AP-205- α -sinukleīna konjugāta iegūšanai pietiekamā daudzumā un tīrībā turpmāko analīžu veikšanai.
2. Specifisko anti- α -sinukleīna antivielu MJFR14-6-4-2 saistīšanās ar AP205- α -sinukleīna konjugātu ELISA testā liecina, ka konjugāts saglabā konformacionāli specifiskus epitopus. Tas parāda, ka konjugātam ir potenciāls kā vakcīnu kandidātam.
3. Sekmīga AP205- α -sinukleīna konjugāta iegūšana *E. coli* šūnās ar ^{13}C un ^{15}N iezīmi ir iespējama minimālajā M9 barotnē, pēc tam veicot attīrīšanu ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju. Metode ir pielietojama konjugāta iegūšanai pietiekamā daudzumā un tīrībā, lai veiktu šķīduma KMR eksperimentus.
4. Iegūtie FTIR rezultāti liecina, ka VLP daļa konjugātā saglabā otrējo struktūru, bet ThT fluorescence, TEM un AFM parāda, ka iegūtais AP205- α -sinukleīna konjugāts netiecas veidot agregātus.
5. Multidimensionālajos šķīduma KMR eksperimentos novēroja 74% no α -sinukleīna pamatvirknē esošajiem aminoskābju atlikumiem, galvenokārt NAC un C- gala reģionu, kas saglabā nestrukturētu stāvokli. Iegūtie rezultāti parāda, ka šķīduma KMR spektroskopija ir pielietojama kustīgu fragmentu analizēšanai šādos konjugātos, bet mazkustīgu fragmentu (VLP) analizēšanai ir nepieciešams izmantot citas metodes, piemēram, cietvielu KMR spektroskopijas izmantošanu.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Pasaules Veselības organizācijas dati par Parkinsona slimību [tiešsaiste]. 2023. gada 9. augustā - [atsauce 10.02.2025.]. Pieejams: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>.
2. Mohsen, M. O.; Bachmann, M. F. Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cell. Mol. Immunol.* 2022, 19, 993–1011.
3. Pumpens, P.; Renhofa, R.; Dishlers, A.; Kozlovskā, T.; Ose, V.; Pushko, P.; Tars, K.; Grens, E.; Bachmann, M. F. The True Story and Advantages of RNA Phage Capsids as Nanotools. *Intervirology* 2016, 59, 74–110.
4. Vidović, M.; Rikalovic, M. G. Alpha-Synuclein Aggregation Pathway in Parkinson's Disease: Current Status and Novel Therapeutic Approaches. *Cells* 2022, 11, 1732.
5. Liekniņa, I.; Reimer, L.; Panteļevs, T.; Lends, A.; Jaudzems, K.; El-Turabi, A.; Gram, H.; Hammi, A.; Jensen, P. H.; Tārs, K. Structural basis of epitope recognition by anti-alpha-synuclein antibodies MJFR14-6-4-2. *Npj Park. Dis.* 2024, 10, 206.
6. Poewe, W.; Seppi, K.; Tanner, C. M.; Halliday, G. M.; Brundin, P.; Volkmann, J.; Schrag, A.-E.; Lang, A. E. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2017, 3, 17013.
7. Tolosa, E.; Garrido, A.; Scholz, S. W.; Poewe, W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2021, 20, 385–397.
8. Parkinson, J. An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2002.
9. Bloem, B. R.; Okun, M. S.; Klein, C. Parkinson's disease. *The Lancet* 2021, 397, 2284–2303.
10. Krawczuk, D.; Groblewska, M.; Mroczko, J.; Winkel, I.; Mroczko, B. The Role of α -Synuclein in Etiology of Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 9197.
11. Spillantini, M. G.; Goedert, M. Neurodegeneration and the ordered assembly of α -synuclein. *Cell Tissue Res.* 2018, 373, 137–148.
12. Oliveira, L. M. A.; Gasser, T.; Edwards, R.; Zweckstetter, M.; Melki, R.; Stefanis, L.; Lashuel, H. A.; Sulzer, D.; Vekrellis, K.; Halliday, G. M.; Tomlinson, J. J.; Schlossmacher, M.; Jensen, P. H.; Schulze-Hentrich, J.; Riess, O.; Hirst, W. D.; El-Agnaf, O.; Mollenhauer, B.; Lansbury, P.; Outeiro, T. F. Alpha-synuclein research: defining strategic moves in the battle against Parkinson's disease. *Npj Park. Dis.* 2021, 7, 65.
13. Estaun-Panzano, J.; Arotcarena, M.-L.; Bezard, E. Monitoring α -synuclein aggregation. *Neurobiol. Dis.* 2023, 176, 105966.
14. Neupane, S.; Cecco, E. D.; Aguzzi, A. The Hidden Cell-to-Cell Trail of α -Synuclein Aggregates. 2023.

15. Pumpens, P.; Pushko, P.; Le Mercier, P. *Virus-Like Particles: A Comprehensive Guide*; 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, 2022.
16. Doucet, M.; El-Turabi, A.; Zabel, F.; Hunn, B. H. M.; Bengoa-Vergniory, N.; Cioroch, M.; Ramm, M.; Smith, A. M.; Gomes, A. C.; Cabral De Miranda, G.; Wade-Martins, R.; Bachmann, M. F. Preclinical development of a vaccine against oligomeric alpha-synuclein based on virus-like particles. *PLOS ONE* 2017, 12, e0181844.
17. Gonzalez-Artero, A.; Pujols, J.; Ventura, S. Harnessing the immune system: vaccines to fight neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* 2024, S1471491424002193.
18. Kim, C.; Hovakimyan, A.; Zagorski, K.; Antonyan, T.; Petrushina, I.; Davtyan, H.; Chailyan, G.; Hasselmann, J.; Iba, M.; Adame, A.; Rockenstein, E.; Szabo, M.; Blurton-Jones, M.; Cribbs, D. H.; Ghochikyan, A.; Masliah, E.; Agadjanyan, M. G. Efficacy and immunogenicity of MultiTEP-based DNA vaccines targeting human α -synuclein: prelude for IND enabling studies. *Npj Vaccines* 2022, 7, 1.
19. Saite uz rakstu par MultiTEP DNS vakcīnām un raksta pārskatīšanu neprecizitāšu dēļ. 2022. gads - [atsauce 17.03.2025.]. Pieejams internetā: <https://www.nature.com/articles/s41541-021-00424-2>.
20. Raksts par datu viltošanu saistībā ar neiroloģisko saslimšanu pētījumiem. 2024. gada 17. oktobris - [atsauce 17.03.2025.]. Pieejams internetā: <https://www.alzforum.org/news/community-news/data-fabrication-ousted-nia-neuroscience-director-eliezer-masliah>.
21. Alfaidi, M.; Barker, R. A.; Kuan, W.-L. An update on immune-based alpha-synuclein trials in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 2025, 272, 21.
22. Klīnisko pētījumu mājaslapa - [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams internetā: <https://clinicaltrials.gov/>.
23. Eijsvogel, P.; Misra, P.; Concha-Marambio, L.; Boyd, J. D.; Ding, S.; Fedor, L.; Hsieh, Y.-T.; Sun, Y. S.; Vroom, M. M.; Farris, C. M.; Ma, Y.; De Kam, M. L.; Radanovic, I.; Vissers, M. F. J. M.; Mirski, D.; Shareghi, G.; Shahnawaz, M.; Singer, W.; Kremer, P.; Groeneveld, G. J.; Yu, H. J.; Dodart, J.-C. Target engagement and immunogenicity of an active immunotherapeutic targeting pathological α -synuclein: a phase 1 placebo-controlled trial. *Nat. Med.* 2024, 30, 2631–2640.
24. Poewe, W.; Volc, D.; Seppi, K.; Medori, R.; Lühns, P.; Kutzelnigg, A.; Djamshidian, A.; Thun-Hohenstein, C.; Meissner, W. G.; Rascol, O.; Schneeberger, A. and Staffler, G. on behalf of the AFF011 investigators. Safety and Tolerability of Active Immunotherapy Targeting α -Synuclein with PD03A in Patients with Early Parkinson's Disease: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 1 Study. *J. Park. Dis.* 2021, 11, 1079–1089.

25. Volc, D.; Poewe, W.; Kutzelnigg, A.; Lühns, P.; Thun-Hohenstein, C.; Schneeberger, A.; Galabova, G.; Majbour, N.; Vaikath, N.; El-Agnaf, O.; Winter, D.; Mihailovska, E.; Mairhofer, A.; Schwenke, C.; Staffler, G.; Medori, R. Safety and immunogenicity of the α -synuclein active immunotherapeutic PD01A in patients with Parkinson's disease: a randomised, single-blinded, phase 1 trial. *Lancet Neurol.* 2020, 19, 591–600.
26. Vassilakopoulou, V.; Karachaliou, C.-E.; Evangelou, A.; Zikos, C.; Livaniou, E. Peptide-Based Vaccines for Neurodegenerative Diseases: Recent Endeavors and Future Perspectives. *Vaccines* 2021, 9, 1278.
27. Pesch, V.; Flores-Fernandez, J. M.; Reithofer, S.; Ma, L.; Özdüzenciler, P.; Busch, Y.; Sriraman, A.; Wang, Y.; Amidian, S.; Kroepel, C. V. M.; Müller, L.; Lien, Y.; Rudtke, O.; Friege, B.; Schröder, G. F.; Wille, H.; Tamgüney, G. Vaccination with structurally adapted fungal protein fibrils induces immunity to Parkinson's disease. *Brain* 2024, 147, 1644–1652.
28. Shahaduzzaman, M.; Nash, K.; Hudson, C.; Sharif, M.; Grimmig, B.; Lin, X.; Bai, G.; Liu, H.; Ugen, K. E.; Cao, C.; Bickford, P. C. Anti-Human α -Synuclein N-Terminal Peptide Antibody Protects against Dopaminergic Cell Death and Ameliorates Behavioral Deficits in an AAV- α -Synuclein Rat Model of Parkinson's Disease. *PLOS ONE* 2015, 10, e0116841.
29. Markova, N.; Cairns, S.; Jankevics-Jones, H.; Kaszuba, M.; Caputo, F.; Parot, J. Biophysical Characterization of Viral and Lipid-Based Vectors for Vaccines and Therapeutics with Light Scattering and Calorimetric Techniques. *Vaccines* 2021, 10, 49.
30. Nooraie, S.; Bahrulolum, H.; Hoseini, Z. S.; Katalani, C.; Hajizade, A.; Easton, A. J.; Ahmadian, G. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnology* 2021, 19, 59.
31. Soliakov, A.; Harris, J. R.; Watkinson, A.; Lakey, J. H. The structure of *Yersinia pestis* Caf1 polymer in free and adjuvant bound states. *Vaccine* 2010, 28, 5746–5754.
32. McCraw, D. M.; Gallagher, J. R.; Torian, U.; Myers, M. L.; Conlon, M. T.; Gulati, N. M.; Harris, A. K. Structural analysis of influenza vaccine virus-like particles reveals a multicomponent organization. *Sci. Rep.* 2018, 8, 10342.
33. Bangaru, S.; Ozorowski, G.; Turner, H. L.; Antanasijevic, A.; Huang, D.; Wang, X.; Torres, J. L.; Diedrich, J. K.; Tian, J.-H.; Portnoff, A. D.; Patel, N.; Massare, M. J.; Iii, J. R. Y.; Nemazee, D.; Paulson, J. C.; Glenn, G.; Smith, G.; Ward, A. B. Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate. 2020.

34. Carvalho, S. B.; Silva, R. J. S.; Sousa, M. F. Q.; Peixoto, C.; Roldão, A.; Carrondo, M. J. T.; Alves, P. M. Bioanalytics for Influenza Virus-Like Particle Characterization and Process Monitoring. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022, 10, 805176.
35. Duprez, J.; Kalbfleisch, K.; Deshmukh, S.; Payne, J.; Haer, M.; Williams, W.; Durowoju, I.; Kirkitadze, M. Structure and compositional analysis of aluminum oxyhydroxide adsorbed pertussis vaccine. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021, 19, 439–447.
36. Rizzo, D.; Cerofolini, L.; Giuntini, S.; Iozzino, L.; Pergola, C.; Sacco, F.; Palmese, A.; Ravera, E.; Luchinat, C.; Baroni, F.; Fragai, M. Epitope Mapping and Binding Assessment by Solid-State NMR Provide a Way for the Development of Biologics under the Quality by Design Paradigm. *J. Am. Chem. Soc.* 2022, 144, 10006–10016.
37. Koers, E. J.; López-Deber, M. P.; Weingarth, M.; Nand, D.; Hickman, D. T.; Mlaki Ndao, D.; Reis, P.; Granet, A.; Pfeifer, A.; Muhs, A.; Baldus, M. Dynamic Nuclear Polarization NMR Spectroscopy: Revealing Multiple Conformations in Lipid-Anchored Peptide Vaccines. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 10905–10908.
38. Jaudzems, K.; Kirsteina, A.; Schubeis, T.; Casano, G.; Ouari, O.; Bogans, J.; Kazaks, A.; Tars, K.; Lesage, A.; Pintacuda, G. Structural Analysis of an Antigen Chemically Coupled on Virus-Like Particles in Vaccine Formulation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60, 12847–12851.
39. Cerofolini, L.; Giuntini, S.; Ravera, E.; Luchinat, C.; Berti, F.; Fragai, M. Structural characterization of a protein adsorbed on aluminum hydroxide adjuvant in vaccine formulation. *Npj Vaccines* 2019, 4, 20.
40. Kim, D.-H.; Lee, J.; Mok, K.; Lee, J.; Han, K.-H. Salient Features of Monomeric Alpha-Synuclein Revealed by NMR Spectroscopy. *Biomolecules* 2020, 10, 428.
41. Binolfi, A.; Theillet, F.-X.; Selenko, P. Bacterial in-cell NMR of human α -synuclein: a disordered monomer by nature? *Biochem. Soc. Trans.* 2012, 40, 950–954.
42. Waudby, C. A.; Camilloni, C.; Fitzpatrick, A. W. P.; Cabrita, L. D.; Dobson, C. M.; Vendruscolo, M.; Christodoulou, J. In-Cell NMR Characterization of the Secondary Structure Populations of a Disordered Conformation of α -Synuclein within *E. coli* Cells. *PLoS ONE* 2013, 8, e72286.
43. Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuiver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; Van Rossum, M.; Goldfarb, D.; Selenko, P. Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* 2016, 530, 45–50.
44. Eliezer, D.; Kutluay, E.; Jr, R. B.; Browne, G. Conformational Properties of α -Synuclein in its Free and Lipid-associated States.

45. Bertonecini, C. W.; Jung, Y.-S.; Fernandez, C. O.; Hoyer, W.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Zweckstetter, M. Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005, 102, 1430–1435.
46. Ghosh, D.; Singh, P. K.; Sahay, S.; Jha, N. N.; Jacob, R. S.; Sen, S.; Kumar, A.; Riek, R.; Maji, S. K. Structure based aggregation studies reveal the presence of helix-rich intermediate during α -Synuclein aggregation. *Sci. Rep.* 2015, 5, 9228.
47. Rienstra, C. M. ¹³C and ¹⁵N Resonance Assignments of Alpha Synuclein Fibrils Amplified from Lewy Body Dementia Tissue.
48. Toleikis, Z.; Paluch, P.; Kuc, E.; Petkus, J.; Sulskis, D.; Org-Tago, M.-L.; Samoson, A.; Smirnovas, V.; Stanek, J.; Lends, A. Solid-state NMR backbone chemical shift assignments of α -synuclein amyloid fibrils at fast MAS regime. *Biomol. NMR Assign.* 2024, 18, 181–186.
49. Bousset, L.; Pieri, L.; Ruiz-Arlandis, G.; Gath, J.; Jensen, P. H.; Habenstein, B.; Madiona, K.; Olieric, V.; Böckmann, A.; Meier, B. H.; Melki, R. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* 2013, 4, 2575.
50. Kloepper, K. D.; Woods, W. S.; Winter, K. A.; George, J. M.; Rienstra, C. M. Preparation of α -synuclein fibrils for solid-state NMR: Expression, purification, and incubation of wild-type and mutant forms. *Protein Expr. Purif.* 2006, 48, 112–117.
51. Santos, J.; Cuellar, J.; Pallarès, I.; Byrd, E. J.; Lends, A.; Moro, F.; Abdul-Shukoor, M. B.; Pujols, J.; Velasco-Carneros, L.; Sobott, F.; Otzen, D. E.; Calabrese, A. N.; Muga, A.; Pedersen, J. S.; Loquet, A.; Valpuesta, J. M.; Radford, S. E.; Ventura, S. A Targetable N-Terminal Motif Orchestrates α -Synuclein Oligomer-to-Fibril Conversion. *J. Am. Chem. Soc.* 2024, 146, 12702–12711.
52. Sattler, M. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1999, 34, 93–158.
53. Vranken, W. F.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Fogh, R. H.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; Ionides, J.; Laue, E. D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2005, 59, 687–696.
54. Lee, W.; Tonelli, M.; Markley, J. L. NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics* 2015, 31, 1325–1327.
55. Wang, Y.; Jardetzky, O. Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data. *Protein Sci.* 2002, 11, 852–861.

56. Mikalauskaite, K.; Ziaunys, M.; Smirnovas, V. Lysozyme Amyloid Fibril Structural Variability Dependence on Initial Protein Folding State. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5421.
57. Sambti, I.; Gatti-Lafranconi, P.; Longhi, S.; Lotti, M. How disorder influences order and vice versa – mutual effects in fusion proteins containing an intrinsically disordered and a globular protein. *FEBS J.* 2010, 277, 4438–4451.
58. Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. 2002.
59. Grzesiek, S.; Bax, A. An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.* 1992, 99, 201–207.
60. Kay, L. E.; Ikura, M.; Tschudin, R. Three-Dimensional Triple-Resonance NMR Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins.
61. Nováček, J.; Zawadzka-Kazimierczuk, A.; Papoušková, V.; Žídek, L.; Šanderová, H.; Krásný, L.; Koźmiński, W.; Sklenář, V. 5D ¹³C-detected experiments for backbone assignment of unstructured proteins with a very low signal dispersion. *J. Biomol. NMR* 2011, 50, 1–11.
62. Antonschmidt, L.; Dervişoğlu, R.; Sant, V.; Tekwani Movellan, K.; Mey, I.; Riedel, D.; Steinem, C.; Becker, S.; Andreas, L. B.; Griesinger, C. Insights into the molecular mechanism of amyloid filament formation: Segmental folding of α -synuclein on lipid membranes. *Sci. Adv.* 2021, 7, eabg2174.
63. Wu, K.-P.; Kim, S.; Fela, D. A.; Baum, J. Characterization of Conformational and Dynamic Properties of Natively Unfolded Human and Mouse α -Synuclein Ensembles by NMR: Implication for Aggregation.
64. Porcari, R.; Proukakis, C.; Waudby, C. A.; Bolognesi, B.; Mangione, P. P.; Paton, J. F. S.; Mullin, S.; Cabrita, L. D.; Penco, A.; Relini, A.; Verona, G.; Vendruscolo, M.; Stoppini, M.; Tartaglia, G. G.; Camilloni, C.; Christodoulou, J.; Schapira, A. H. V.; Bellotti, V. The H50Q Mutation Induces a 10-fold Decrease in the Solubility of α -Synuclein. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 2395–2404.
65. Mariño, L.; Ramis, R.; Casasnovas, R.; Ortega-Castro, J.; Vilanova, B.; Frau, J.; Adrover, M. Unravelling the effect of N (ϵ)-(carboxyethyl)lysine on the conformation, dynamics and aggregation propensity of α -synuclein. *Chem. Sci.* 2020, 11, 3332–3344.
66. Lin, W.; Insley, T.; Tuttle, M. D.; Zhu, L.; Berthold, D. A.; Král, P.; Rienstra, C. M.; Murphy, C. J. Control of Protein Orientation on Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 2015, 119, 21035–21043.
67. Kang, L.; Janowska, M. K.; Moriarty, G. M.; Baum, J. Mechanistic Insight into the Relationship between N-Terminal Acetylation of α -Synuclein and Fibril Formation Rates by NMR and Fluorescence. *PLoS ONE* 2013, 8, e75018.

68. Rao, J. N.; Kim, Y. E.; Park, L. S.; Ulmer, T. S. Effect of Pseudorepeat Rearrangement on α -Synuclein Misfolding, Vesicle Binding, and Micelle Binding. *J. Mol. Biol.* 2009, 390, 516–529.
69. Zandomenighi, G.; Krebs, M. R. H.; McCammon, M. G.; Fändrich, M. FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci.* 2004, 13, 3314–3321.
70. Froula, J. M.; Castellana-Cruz, M.; Anabtawi, N. M.; Camino, J. D.; Chen, S. W.; Thrasher, D. R.; Freire, J.; Yazdi, A. A.; Fleming, S.; Dobson, C. M.; Kumita, J. R.; Cremades, N.; Volpicelli-Daley, L. A. Defining α -synuclein species responsible for Parkinson's disease phenotypes in mice. *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 10392–10406.

Izmantotā aparatūra

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Centrifūgas	Centrifuge 5418	Eppendorf (Vācija)
	Himac Ultracentrifuge CP 80NX	Eppendorf (Vācija)
	5804 R	Eppendorf (Vācija)
	5424	Eppendorf (Vācija)
	Allegra X-30 R	Beckman Coulter (ASV)
	Avanti J-E	Beckman Coulter (ASV)
Centrifūga/vortekss	Multi-Spin MSC-6000	Biosan (Latvija)
Autoklāvs	Systec DX-65	Systec GmbH & Co. (Vācija)
pH metrs	SevenDirect SD20	Mettler Toledo (Šveice)
Laminārs	Streamline Class II BSC	ESCO Lifesciences group (Singapūra)
Saldētavas	WiseCryo	Daihan Scientific (Dienvidkoreja)
Spektrofotometri	Nanodrop 2000C	Thermo Fischer Scientific (ASV)
	Cφ-26X JI42	(Krievija)
Fluorimetrs	Invitrogen Qubit fluorometer	Thermo Fischer Scientific (ASV)
Kratītāji	Thermo-Shaker TS-100	Biosan (Latvija)
	Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i	Biosan (Latvija)
	Orbital Shaker PSU-10i	Biosan (Latvija)
Vorteksi	MS 3 basic	IKA (Vācija)
Svari	PLJ 750-3N	KERN & SOHN (Vācija)
Elektroforēzes barošanas bloki	CS-300V	Cleaver Scientific Ltd (Apvienotā Karaliste)
	Power Pac Universal	Bio-rad Laboratories Inc. (ASV)
	EPS 600	Pharmacia Biotech (Zviedrija)
Elektroforēzes kasetes	Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-rad Laboratories Inc. (ASV)
Gelu skenētājs	gelONE Gel documentation system	Cleaver Scientific Ltd (Apvienotā Karaliste)
Elektriskā plītiņa ar magnētisko maisītāju	RCT basic	IKA (Vācija)
Ūdens attīrītājs	PURELAB Quest VF LC-291	ELGA Veolida (Apvienotā Karaliste)
Ultraskaņas dezintegrators	Ultrasonic Processor UP200S	Hielscher Ultrasonics GmbH (Vācija)
Kodolmagnētiskās rezonanses spektrometri	600 MHz Bruker Avance Neo spektrometrs, 5-mm ¹ H/ ¹⁹ F (¹³ C/ ¹⁵ N) Quadrupole-Resonance CryoProbe with Z-Grad zonde	Bruker (ASV)
Elektronmikroskops	JEM-1230 elektronmikroskops	JEOL Ltd. (Japāna)
FTIR spektrometrs	Bruker Invenio S	Bruker (ASV)
Termostats	BINDER	BINDER (Vācija)
Inkubators	Multitron	Mentor GmbH (Apvienotā Karaliste)
Hromatogrāfi	AktaPure	Danaher Corporation (ASV)
	AktaPrime plus	Danaher Corporation (ASV)
Plašu lasītājs	BDSL Immunoskan MS 355	Labsystems (Somija)

Izmantotie reaģenti un šķīdinātāji

Reaģents	Tīrības pakāpe	Ražotājs
Agaroze	-	Sigma Aldrich (ASV)
40% Akrilamīda šķīdums (akrilamīds/bisakrilamīds 29:1)	-	Fisher Bioreagents (ASV)
Tris	99,9%	Carl Roth GmbH (Ķīna)
Nātrija dodecilsulfāts	Elektroforēzes gela tīrības pakāpe >99%	Fisher Chemical (Japāna)
Amonija persulfāts	-	Fisher Bioreagents (ASV)
TEMED	99%	Acros Organics (Beļģija)
D-glikoze (U- ¹³ C6)	99%	Cambridge Isotope Laboratories Inc. (ASV)
Amonija hlorīds	99,6%	Thermo Scientific (ASV)
Amonija hlorīds (¹⁵ N)	99% ¹⁵ N atoms	Eurisotop (ASV)
D-glikoze	Analītiskas tīrības pakāpe	Fisher Chemical (Vācija)
Nātrija dihidrogēnfosfāta monohidrāts	98%	Thermo Scientific (Indija)
Dinātrija hidrogēnfosfāts	99%	Acros Organics (Nīderlande)
Kālija dihidrogēnfosfāts	-	Fisher Bioreagents (Indija)
Nātrija hlorīds	99%	Fisher Bioreagents (ASV)
Kālija hlorīds	99%	Fisher Bioreagents (ASV)
Etīdijbromīds (10% šķīdums)	-	Fisher Bioreagents (ASV)
Kalcija hlorīds	97%	Thermo Scientific (Vācija)
Magnija sulfāta monohidrāts	99%	Acros Organics (Spānija)
Tiamīna hidrohlorīds	99%	Sigma Aldrich (Vācija)
D-biotīns	-	Fluorochem (Apvienotā Karaliste)
Dikālija hidrogēnfosfāts	98%	Fisher Bioreagents (Indija)
Virkons-S	-	LANXESS (Vācija)
EDTA	99%	Acros Organics (Beļģija)
Deiterēts ūdens (D ₂ O)	99,9%	Eurisotop (ASV)
PMSF	99%	Thermo Scientific (Vācija)
IPTG	99,8%	Formedium (Apvienotā Karaliste)
Ampicilīna nātrija sāls	-	Fisher Bioreagents (Ķīna)
Agars	-	Fisher Scientific (ASV)
LB barotne (triptons 10 g/L, rauga ekstrakts 5 g/l, NaCl 10 g/L)	-	Carl Roth GmbH (Vācija)
Triptons (enzimātiski šķelts no kazeīna)	-	Millipore Sigma Aldrich (Vācija)
Rauga ekstrakts	-	Acros Organics (Beļģija)
Glicerīns	99,5%	Fisher Bioreagents (ASV)

2. pielikums (turpinājums)

Etiķskābe (99,9%)	-	RK Chem (Latvija)
Sālsskābe (35-28%)	-	RK Chem (Latvija)
Nātrija hidroksīds	98,7%	Fisher Chemical (Čehija)
2-merkaptotetanolis	99%	Thermo Scientific (Vācija)
Bromfenolzilais	-	Fisher Bioreagents (Indija)
Tritons x100	-	Fisher Scientific (ASV)
Tween-20	Molek. bioloģijas grāda tīrības pakāpe	Prolabo (Beļģija)
Urīnviela	99,5%	Acros Organics (Vācija)
Glicīns	98,5%	Fisher Bioreagents (ASV)
Proteīnu molekulārās masas marķieris (<i>BLUeye Prestained Protein Ladder</i>)	-	Sigma Aldrich (ASV)
DNS marķieris (<i>MassRuler DNA Ladder</i>)	-	Thermo Scientific (Lietuva)
DNS krāsviela (<i>6x MassRuler DNA Loading dye</i>)	-	Thermo Scientific (Lietuva)
DNS marķieris (<i>GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder</i>)	-	Thermo Fisher Scientific Baltics UAB (Lietuva)
Proteīnu molekulārās masas marķieris (<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>)	-	Thermo Fisher Scientific Baltics UAB (Lietuva)
Briljantzilais		AppliChem GmbH (Vācija)
BSA	>98%	Sigma Aldrich
Antivielas		
o-fenilēndiamīna dihidrohlora substrāts		Thermo Scientific (ASV)
30% H ₂ O ₂ šķīdums	Molek. bioloģijas grāda tīrības pakāpe	Chempur (Polija)
TCA	Molek. bioloģijas grāda tīrības pakāpe	AppliChem GmbH (Vācija)
Fosfāta-citrata buferšķīduma tableres	Molek. bioloģijas grāda tīrības pakāpe	Sigma-Aldrich (Vācija)
Qubit protein assay kit	-	Thermo Fisher (ASV)
Anti-α-sinukleīna agregātu antivielas MJFR 14-6-4-2 antivielas (#ab214033)	-	Abcam (Apvienotā Karaliste)
HRP-conjugated goat anti- rabbit IgG antibodies (#A8275)	-	SigmaAldrich (Vācija)
<i>GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit</i>	-	Thermo Scientific (ASV)

Izmantotie šķīdumi

Šķīdums	Sastāvs
LB barotne (šķidrā)	NaCl (5.0 g) Tryptons (5.0 g) Rauga ekstrakts (2.5 g) H ₂ O (0.5 L) Ampicilīna šķīdums (0.5 mL, 100 mg/mL)
LB agarizētā barotne	NaCl (1.0 g) Tryptons (1.0 g) Rauga ekstrakts (0.5 g) Agars (2.0 g) H ₂ O (0.1 L) Ampicilīna šķīdums (0.1 mL, 100 mg/mL)
2 TY barotne	NaCl (5.0 g) Tryptons (16.0 g) Rauga ekstrakts (10.0 g) H ₂ O (1.0 L) Ampicilīna šķīdums (1.0 mL, 100 mg/mL)
CaCl ₂ šķīdums (1 M)	CaCl ₂ (1.11 g) H ₂ O (10 mL)
MgSO ₄ šķīdums (1M)	MgSO ₄ (1.20 g) H ₂ O (10 mL)
Tiamīna šķīdums (5%)	Tiamīns (0.5 g) H ₂ O (9.5 g)
Biotīna šķīdums (1%)	Biotīns (0.1 g) 50% EtOH šķīdums ūdenī (9.9 mL)
M9 barotne	NH ₄ Cl vai ¹⁵ NH ₄ Cl (0.5 g) KH ₂ PO ₄ (1.5 g) Na ₂ HPO ₄ (3.0 g) NaCl (1.25 g) H ₂ O (500 mL) 1M CaCl ₂ (50 µL) 1M MgSO ₄ (1.25 mL) 5% tiamīns (40 µL) 1% biotīns (100 µL) Ampicilīna šķīdums (0.5 mL, 100 mg/mL)
Ampicilīna šķīdums (100 mg/mL)	Ampicilīns (2.0 g) H ₂ O (20 mL)
IPTG šķīdums (1M)	IPTG (2.38 g) H ₂ O (10 mL)
PMSF šķīdums (1M)	PMSF (1.74 g) DMSO (10 mL)
Lizēšanas buferšķīdums	Tris-HCl (50 mM, pH=8.0) NaCl (150 mM) Triton X-100 (0.1%) H ₂ O
5M NaCl šķīdums	NaCl (292.2 g) H ₂ O (1.0 L)

3. pielikums (turpinājums)

Ekstrakcijas buferšķīdums	Urīnviela (0.5 M) Tween (0.1%) 1x PBS
SDS šķīdums (10%)	SDS (10 g) H ₂ O (90 mL)
PBS (10x, pH=7.4)	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (17.8 g) KH ₂ PO ₄ (2.4 g) NaCl (80.0 g) KCl (2.0 g) H ₂ O: 1.0 L
Tris buferšķīdums (1.5 M, pH=8.8)	Tris (181.7 g) H ₂ O (1.0 L)
Tris buferšķīdums (0.5 M, pH= 6.8)	Tris (60.57 g) H ₂ O (1.0 L)
Amonija persulfāta šķīdums, APS (10%)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (1 g) H ₂ O (9 mL)
Elektroforēzes buferšķīdums (10 x)	Tris (30. 2 g) Glicīns (144.1 g) SDS (10.0 g) H ₂ O (1.0 L)
SDS-PAGE koncentrējošais gels (4%)	H ₂ O (3.15 mL) 40% akrilamīda/bisakrilamīda šķīdums (0.5 mL) 0.5 M Tris (pH 6.8, 1.25 mL) 10% SDS (50 µL) 10% APS (50 µL) TEMED (5 µL)
SDS-PAGE sadalošais gels (15%)	H ₂ O (2.85 mL) 40% akrilamīda/bisakrilamīda šķīdums (3.0 mL) 1.5 M Tris (pH 8.8, 2 mL) 10% SDS (80 µL) 10% APS (80 µL) TEMED (16 µL)
Agarozes NAGE gels (1%)	Agarozē (1 g) 1x TAE (99 mL) Etīdijbromīds (5 µL)
<i>Laemmli</i> krāsviela	Tris (0.125 M, pH=6.8) SDS (4%) β-merkaptotetanolis (10%) Glicerīns (20%) Bromfenolzilaiss (0.05%)
<i>Coomassie</i> krāsviela	<i>Coomassie</i> briljantzilaiss G250 (0.1 g) Etanols (96%, 12 mL) TCA (50%, 8 mL) H ₂ O (80 mL)
BSA šķīdums (1%)	BSA (1 g) PBS (1x, 100 mL)
Na fosfātu buferšķīdums (50 mM, pH=7.4)	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (0.073 g) Na ₂ HPO ₄ (0.279 g) H ₂ O (50 mL)

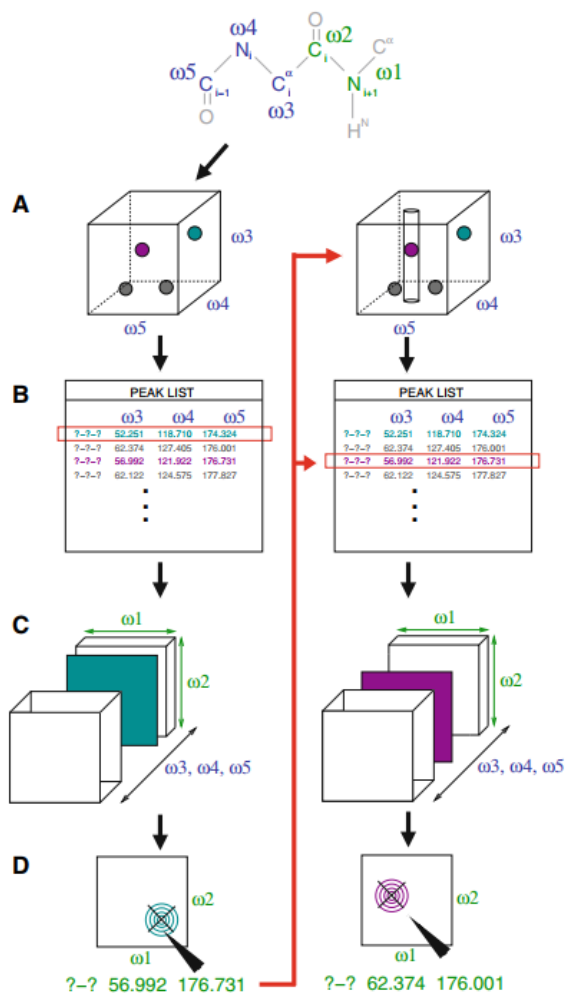
3. pielikums (turpinājums)

Karbonātu buferšķīdums (10x, pH=9.5)	Na ₂ CO ₃ (5.3 g) NaHCO ₃ (4.2 g) H ₂ O (100 mL)
TAE (1x, pH=8)	Tris (40 mM) EDTA (1 mM) CH ₃ COOH (20 mM) H ₂ O
Fizioloģiskais šķīdums	NaCl (0.9 g) H ₂ O (100 mL)
PBST šķīdums	Tween-20 (25 µL) PBS (1x, 500 mL)
<i>o</i> -fenilēdiamīna dihidrochlorīda substrāts	Fenilēdiamīna dihidrochlorīda substrāts (1 tablete) H ₂ O (10 mL)

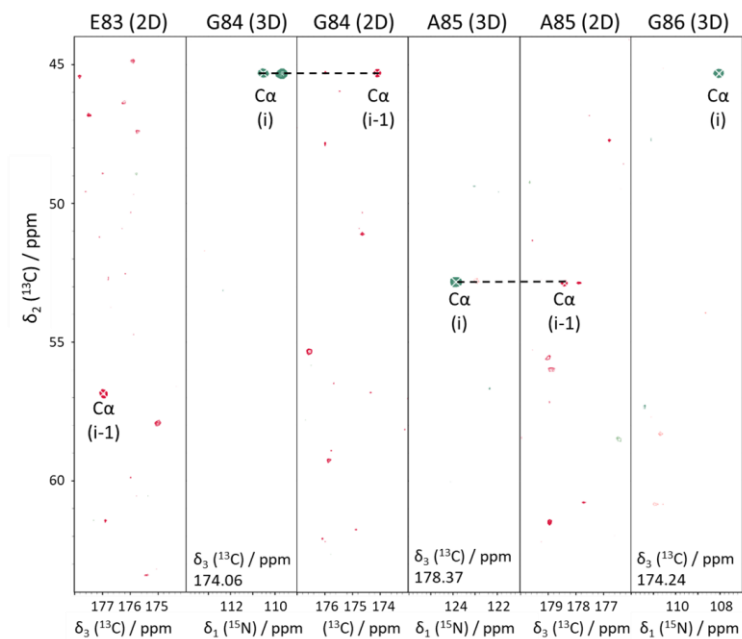
AP-205- α -sinukleīna konjugāta un α -sinukleīna sekvence

α-sinukleīna sekvence	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTK EGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGA VVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNE EGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA
AP205-α-sinukleīna sekvence Ar zaļu: linkeris Ar zilu: α -sinukleīna daļa	MANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLSTTFSSASLLRQRV KVGIAELNNVSGQYVSUYKRPAPKPEGCADACVIMP NENQSIRTVISGSAENLATLKAEWETHKRNVDTLFAS GNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGSGSGASGSDVFMK GLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTKEGVLYVG SKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVT AQAQTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGI LEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA
AP205-α-sinukleīna molmasa	29,03 kDa
AP205-α-sinukleīna ϵ_{280}	19300 M ⁻¹ cm ⁻¹

5D spektra analīzes piemērs [61]



Darbā veiktās pamatvirknes 5D CACONCACO spektra analizēšanas piemērs



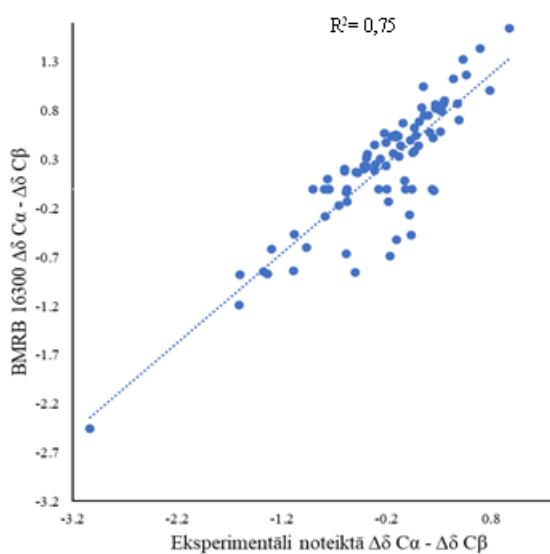
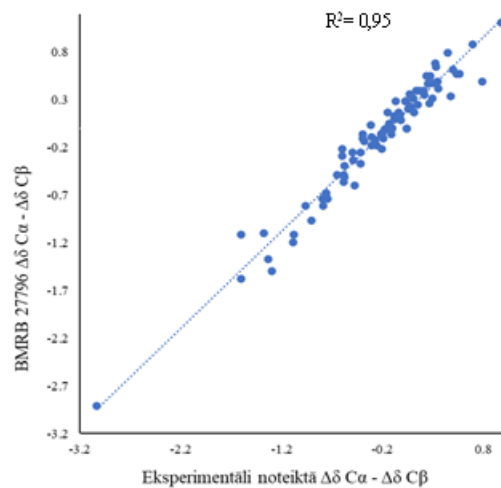
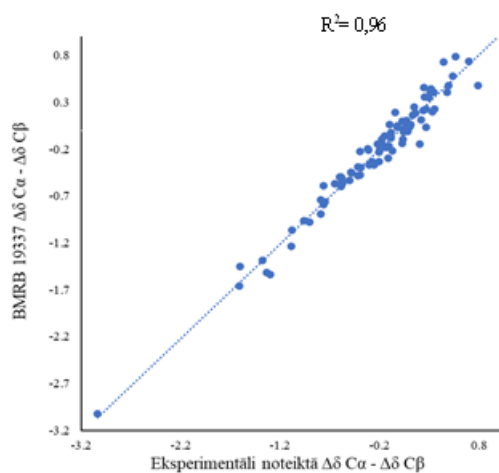
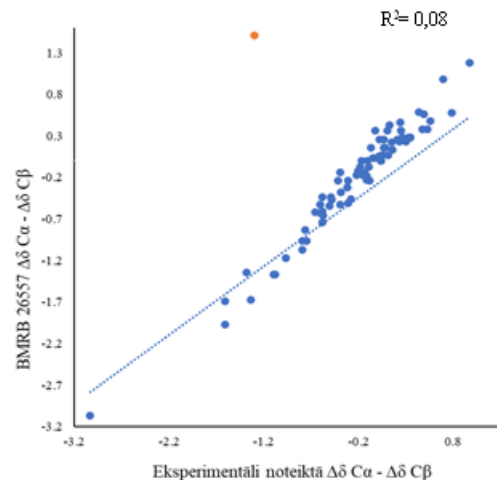
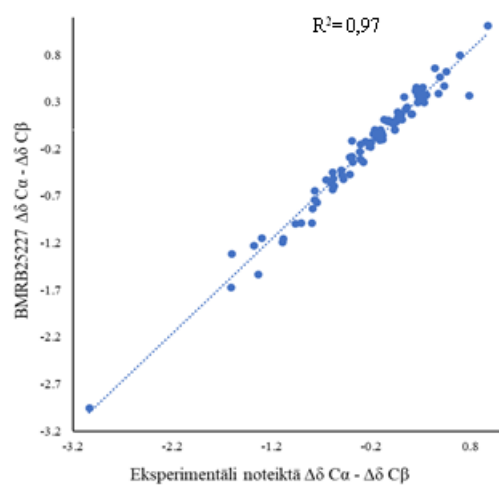
Noteiktās AP205- α -sinukleīna ķīmiskās nobīdes

Nr.	AA	C'	C α	H	N	C β	Nr.	AA	C'	C α	H	N	C β	Nr.	AA	C'	C α	H	N	C β
	G	172.85	45.22				36	G	173.71	45.24				68	G	173.71	45.09	8.16	108.72	
	A			7.84	123.16		37	V	175.81		7.81	119.31		69	A	177.57	52.31	8.09	123.69	19.26
14	G	174.03	45.31				38	L			8.18	125.50		70	V	176.25	62.44	8.11	120.11	32.76
15	V	176.39	56.11	7.89	119.89		45	K	176.61	56.62			33.01	71	V	176.21	62.17	8.27	124.86	32.79
16	V	175.95					46	E			8.35	121.91		72	T	174.87	61.81	8.20	118.19	69.91
17	A	177.60	52.57	8.34	128.11	19.19	48	V	176.39	62.62			32.72	73	G	174.00	45.29	8.35	111.15	
18	A	177.85	52.77	8.21	123.49	19.10	49	V			8.18	124.64		74	V	176.47	62.42	7.92	119.28	32.82
19	A	178.12	52.87	8.20	122.90	19.15	53	A	177.76	52.37		124.42	19.31	75	T	174.07	61.84	8.20	118.38	69.75
20	E			8.26	119.87		54	T	174.53		8.12	114.46		76	A	177.51	52.44	8.26	127.06	19.30
21	K	177.08	56.81	8.05		32.87	55	V	175.82	62.29	8.13	122.61	32.82	77	V	175.95	62.26	8.03	119.60	32.81
22	T			8.03	114.86		56	A	177.71	52.57	8.35	127.80	19.24	78	A	177.55	52.50	8.30	127.78	
25	G	174.20	45.38	7.94			57	E	176.67	56.79	8.29	120.68	30.51	79	Q	175.90	55.79	8.26	120.07	29.60
26	V	176.25	62.59	7.92	119.45	32.78	58	K	176.92	56.46	8.33	122.50	33.03	80	K	176.62	56.36	8.33	122.93	33.13
27	A	178.02	52.90	8.35	127.23	19.05	59	T	174.62	62.15	8.11	115.52	69.82	81	T	174.43	61.86	8.19	116.49	69.91
28	E	176.59	56.99	8.31	120.40	30.48	60	K	176.59	56.61	8.29	123.49	32.89	82	V	176.09	62.30	8.20	122.64	32.83
29	A	177.65	52.69	8.22	124.76	19.12	61	E	176.39	56.86	8.35	121.47	30.29	83	E	176.99	56.87	8.48	125.03	30.34
30	A	178.38	52.85	8.16	122.92	19.14	62	Q	175.92	55.83	8.33	121.56	29.52	84	G	174.11	45.29	8.42	110.51	
31	G	174.19	45.38	8.24	107.65		63	V	176.27	62.44	8.19	121.59	32.79	85	A	178.41	52.88	8.18	123.88	19.21
32	K	176.93	56.22	8.08	120.60	33.16	64	T	174.03	61.74	8.20	117.71	69.92	86	G	174.28	45.30	8.41	108.03	
33	T			8.13	115.28		65	N	175.18	53.16	8.41	121.67	38.88	87	S	174.71	58.40	8.08	115.58	63.95
34	K	176.61	56.62			33.01	66	V	176.76	62.63	8.14	120.42	32.53	88	I	176.20	61.37	8.10	122.52	38.70
35	E			8.35	121.91		67	G	174.61	45.35	8.46	112.39		89	A	177.50	52.62	8.25	127.75	19.07

6.pielikums (turpinājums)

Nr.	AA	C'	C α	H	N	C β	Nr.	AA	C'	C α	H	N	C β	Nr.	AA	C'	C α	H	N	C β
90	A	177.66	52.45	8.10	123.12	19.23	112	I	176.16	60.96	7.91	119.97	38.69	134	Q	174.89	55.51	8.16	122.47	29.84
91	A	178.05	52.65	8.19	123.18	19.15	113	L	177.09	54.98	8.31	126.75	42.39	135	D	175.47	54.36	8.15	121.63	
92	T	175.10	61.95	7.99	112.31	69.86	114	E	175.84	56.51	8.34	122.11	30.62	136	Y	175.01	57.55	7.95	120.34	39.12
93	G	173.61	45.46	8.22	110.54		115	D	175.71	54.31	8.26	121.29		137	E	173.74	53.70	8.17	125.22	30.36
94	F	175.43	57.71	8.01	120.17	39.75	116	M	174.01	53.21	8.15	121.83	32.63	138	P	176.83	62.95		136.76	32.19
95	V	175.41	62.01	7.98	123.21	33.10	117	P	176.67	62.92		137.35	32.05	139	E	175.34	56.62	8.43	121.45	30.40
96	K	176.44	56.30	8.31	126.13	33.07	118	V	175.68	61.88	8.19	120.53	33.08	140	A			7.89	130.82	
97	K	176.32	56.54	8.37	123.55	33.13	119	D	174.69	52.13	8.41	125.69								
98	D	176.19	54.50	8.32	121.04	41.12	120	P	176.92	63.52		136.40	32.14							
99	Q	175.98	55.87	8.27	120.04	29.39	121	D	176.18	54.65	8.31	119.29								
100	L	177.93	55.44	8.20	122.69	42.31	122	N	175.34	53.46	8.05	119.00	39.40							
101	G	174.06	45.31	8.40	109.65		123	E	176.05	56.91	8.30	121.63	30.23							
102	K	176.40	56.19	8.12	120.66	33.13	124	A	177.15	52.30	8.14	124.29	19.17							
103	N	175.23	53.33	8.53	119.94	38.80	125	Y	175.32	57.68	7.94	119.75	38.98							
104	E	176.50	56.67	8.40	121.36	30.34	126	E	175.48	55.80	8.08	123.48	30.76							
105	E	176.98	56.93	8.40	121.81	30.30	127	M	174.19	53.28	8.33	123.65	32.39							
106	G	173.40	45.05	8.34	110.04		128	P	176.85	63.05		137.62	32.14							
107	A	175.55	50.46	8.05	124.86	18.20	129	S	174.76	58.27	8.39	116.58	63.98							
108	P	177.03	63.09		135.92	32.01	130	E	176.47	56.58	8.49	123.09								
109	Q	175.94	55.77	8.49	120.99	29.59	131	E	176.93	56.95	8.38	121.79	30.35							
110	E	176.82	56.71	8.43	122.31	30.56	132	G	173.81	45.18	8.32	109.75								
111	G	173.75	45.28	8.40	110.08		133	Y	175.70	58.10	7.98	120.16	38.77							

Eksperimentāli aprēķināto $\Delta C\alpha - \Delta C\beta$ salīdzinājums ar literatūras avotiem



Apliecinājums par dalību konferencē

Jana Petkus 2025. gada 25. aprīlī piedalījās starptautiskā konferencē “BaltiMagnet” ar prezentāciju “Solution-state NMR chemical shift assignment of the full-length VLP- α -synuclein conjugate in vaccine formulations”. Apliecinājums pievienots programmas formā. Vairāk informācijas: <https://www.nmri.eu › 26-balti-magnet>.

Friday, April 25				Flash Talks Chair: Vytautas Klimavičius			
9:00 - 10:00	Arrival/ registration/ Coffee			15:30 - 15:35	Ursule Tarvydyte	Pushing the sensitivity boundaries of X-band EPR cryoprobe using a fast microwave switch	Vilnius University
10:00 - 10:20	Ago Samoson	Welcome Talk		15:35 - 15:40	Justinas Turčak	EPR spectrometer with arbitrary waveform generation	Vilnius University, Faculty of Physics, Institute of Applied Electrodynamics and Telecommunications
10:20 - 10:40	Raiker Witter	Chair: Ago Samoson Has Solid-State-NMR become useless?	Tallinn University of Technology	15:40 - 15:45	Aistė Peštenytė	DEER spectroscopy of S100A8 and S100A9 proteins	Faculty of Physics, Vilnius University
10:40 - 11:00	Alons Lends	Structural characterization of Intact Fungal Cell Wall Architecture Using Proton Detected Solid-State NMR Spectroscopy at 60-150 kHz MAS	Latvian Institute of Organic Synthesis	15:45 - 15:50	Giedre Kuktaite	ESEEM and HYSCORE spectroscopy: Unlocking the secrets of spin-nuclear interaction	Vilnius University, Faculty of Physics
11:00 - 11:20	Vytautas Klimavičius	Solid-State NMR of Functional Materials in Vilnius	Vilnius University, Institute of Chemical Physics	15:50 - 15:55	Gediminas Usevičius	YBCO microresonators for the conventional pulsed EPR spectroscopy	Vilnius university
11:20 - 11:40	Istvan Furo	Electrophoretic NMR	KTH Stockholm	15:55 - 16:00	Ignas Pocius	Modelling and testing of low frequency EPR resonators	Vilnius University
11:40 - 12:00	Coffee break			16:00 - 16:05	Jana Petkus	Solution-state NMR chemical shift assignment of the full-length VLP- α -synuclein conjugate in vaccine formulations	Latvian Institute of Organic Synthesis
12:00 - 12:20	Martin Jakobi	Chair: Alons Lends Studying nanomaterials using liquid and solid-state NMR	KBFI	16:05 - 16:10	Lauri Vares	NMR capabilities in Tartu	Tartu University
12:20 - 12:40	Katarzyna Dziubinska-Kuehn	The role of NMR in rational design of non-aqueous solvents	Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut	16:10 - 16:15	Liisi Karlep	NMR of citrus fruit and COVID	SDL TUT
12:40 - 13:00	Kristaps Jaudzems	Protein NMR in Latvia	University of Latvia / Latvian Institute of Organic Synthesis				
13:00 - 13:20	Laurynas Dagys	Hyperpolarization using SABRE with additional level of control	Vilnius university				
13:20 - 14:40	Lunch break						
14:40 - 15:00	Andris Antuzevics	Chair: Vytautas Klimavičius Photochromism and Persistent Luminescence in Complex Oxides: Insights from EPR and Correlated Optical Spectroscopy	Institute of Solid State Physics, University of Latvia				
15:00 - 15:20	Mantas Simenas	EPR research at Vilnius University	Vilnius University, Faculty of Physics				

Pateicības

Darba vadītājam **Dr. Nat. sc. Alonam Lendam** par iespēju izstrādāt darbu, par darba vadīšanu, apmācīšanu un padomiem.

Dr. biol. Ilvai Liekniņai par apmācīšanu un palīdzību.

Dr. biol. Kasparam Tāram un viņa grupai Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Recenzentam **Dr. chem. Raitim Bobrovam** par darba recenzēšanu.

Dr. Jurim Jansonam par TEM mērījumiem.

Ph. D. Jozef Hritz un **Viliam Volko** no *CEITEC* institūta Brno, Čehijā par 3D un 5D KMR spektru uzņemšanu, apstrādi un apmācīšanu to analizēšanā.

Viļņas Universitātes *LSC* Amiloidu pētniecības grupas darbiniekiem **Dr. Mantas Žiaunys** par FTIR un ThT saistīšanās eksperimentu veikšanu un **Dr. Andrius Sakalauskas** par ATM analīzi.

