

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos fakultetas

Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra



Biochemijos studijų programos IV kurso studentė

Akvilė BOTYRIŪTĖ

Bakalauro darbas

**Epigalokatechingalato įtakos insulino amiloidinių fibrilių
susidarymui tyrimai**

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

Vilnius, 2014

Epigalokatechinalato įtakos insulino amiloidinių fibrilių susidarymui tyrimai

Darbas atliktas VU Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Studentė:

Akvilė BOTYRIŪTĖ

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

TURINYS

Sutrumpinimų sąrašas	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Amiloidai.....	6
1.1.1. Ligos, susijusios su netaisyklingu baltymų susivyniojimu	6
1.1.2. Prionų infektyvumas	8
1.1.3. Amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmas.....	8
1.1.4. Insulino agregacija	10
1.2. Amiloidinių fibrilių nustatymas Tioflaviniu T	11
1.3. Amiloidinės agregacijos slopikliai	12
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	15
2.1. Medžiagos ir tirpalai	15
2.2. Tioflavino T fluorescencijos matavimas	15
2.2.1. Spontantinės insulino agregacijos tyrimai	16
2.2.2. Insulino fibrilių ilgėjimo tyrimai	16
2.3. Atominės jėgos mikroskopija.....	16
2.4. Elektroninė mikroskopija	17
2.5. Duomenų apdorojimas	17
3. REZULTATAI IR JŪ APTARIMAS	20
3.1. Spontantinės agregacijos tyrimai	20
3.1.1. Insulino koncentracijos įtaka fibrilių susidarymui.....	20
3.1.2. Epigalokatechingalato įtakos insulino agregacijai tyrimas.....	21
3.1.3. Insulino agregacijos ir slopinimo EGCG* mechanizmo tyrimas	24
3.2. Fibrilių ilgėjimo tyrimai	26
3.2.1. Insulino fibrilių ilgėjimo kinetika	26
3.2.2. Fibrilių ilgėjimo slopinimo mechanizmas	27
IŠVADOS	29
SANTRAUKA.....	30
SUMMARY.....	31
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	32
LITERATŪROS SĄRAŠAS	33

Sutrumpinimų sąrašas

AJM	Atominės jėgos mikroskopija
Ins	Insulinas
EGCG	Epigalokatechingalatas
EGCG*	Epigalokatechingalato darinys
PrP ^C	Prioninio baltymo natyvi forma
PrP ^{Sc}	Prioninio baltymo infektyvi forma
ThT	Tioflavinas T
TSE	Perduodamos spongiforminės encefalopatijos

IVADAS

Amiloidai – iš neteisingos konformacijos baltymų sudaryti fibriliniai agregatai. Amiloidinių agregatų kaupimasis organizme siejamas su plačiai paplitusiomis ir mažiau žinomomis, tačiau kol kas neišgydomomis degeneracinėmis ligomis, tokiomis kaip Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono ligos. 2013 m. pasaulyje užregistruota 44 milijonai Alzheimerio ligos ar panašios demencijos atvejų, prognozuojama, kad nesuradus efektyvių vaistų 2030 m. šis skaičius išaugs iki 75 milijonų (Alzheimer's Disease International). Norint sukurti veiksmingus tokioms ligoms gydyti skirtus vaistus, būtina suprasti amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmą ir surasti šį procesą slopinančius junginius.

Prieš keletą metų nustatyta, kad iš žaliosios arbatos išskiriamas flavonoidas – epigalokatechingalatas (EGCG) – slopina su amiloidinėmis ligomis susijusių baltymų (α -sinukleino, amiloido- β) fibrilizaciją, tačiau slopinimo mechanizmas nėra aiškus.

Šiame darbe kaip modelinis baltymas, formuojantis amiloidines fibriles, tirtas rekombinantinis žmogaus insulinas. Epigalokatechingalato įtaka insulino agregacijai stebėta fluorescencinės spektrometrijos metodu.

Darbo tikslas: ištirti epigalokatechingalato įtaką amiloidogeninei insulino agregacijai.

Darbo uždaviniai:

- Nustatyti insulino fibrilių susidarymo kinetiką esant skirtingoms insulino koncentracijoms;
- Įvertinti EGCG įtaką insulino agregacijos kinetikai;
- Patikrinti ar insulino fibrilių ilgėjimas gali būti aprašomas fermentine kinetika;
- Nustatyti EGCG įtaką insulino fibrilių ilgėjimui;
- Patikrinti fermentinės kinetikos modelio tinkamumą insulino fibrilių ilgėjimo slopinimui aprašyti.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Amiloidai

Pirmą kartą terminas „amiloidas“ buvo panaudotas vokiečių mokslininko Rudolph Virchow 1854 metais. Pasinaudojęs tobuliausia to meto metodika ir medicinos žiniomis Virchow atliko histocheminius tyrimus su keistomis žmogaus smegenyse rastomis struktūromis (lot. *corpora amylacea*), panašiomis į krakmolo granules. Jodo spalvinės reakcijos metu struktūros nusidažė šviesiai mėlynai, o papildomai pridėjus sieros rūgšties – violetine spalva. Virchow nusprendė, kad smegenyse aptikti dariniai yra sudaryti iš celiuliozės ir pavadino juos amiloidais (lot. *amylum*, graik. *amylon* – krakmolos). Buvo manoma, kad krakmolos ir celiuliozė yra izomerai, besiskiriantys tik atomų išsidėstymu. 1859 metais Friedreich ir Kekule atlikdami „baltos masės“, paimtos iš pažeistos blužnies, cheminę analizę, aptiko didelius kiekius azoto. Remiantis gautais rezultatais jie padarė išvadą, jog amiloidai yra sudaryti iš baltymų, o ne iš angliavandenių, kaip buvo manyta anksčiau (Puchtler and Sweat, 1966).

Nuo dvidešimto amžiaus amiloidai apibūdinami trimis požymiais (Makin and Serpell, 2005): specifine sąveika su Kongo raudonuoju dažu (poliarizuotoje šviesoje matomos žalios spalvos fibrilės (Puchtler and Sweat, 1965)); būdinga struktūra (aukštos raiškos elektronine mikroskopija vizualizuojamos amiloidinės fibrilės yra tiesios, nesišakančios, 70-120 Å diametro, sudarytos iš 20-35 Å pločio protofilamentų (Sipe and Cohen, 2000)); ir β-klostyta polipeptidinės grandinės antrine struktūra (β-klosčių išsidėstymas, statmenas fibrilės ašiai, nustatomas rentgeno spindulių difrakcijos analize (Marshall and Serpell, 2009)).

Amiloidais yra vadinami netaisyklingos konformacijos baltymų suformuoti fibriliniai agregatai (Sipe and Cohen, 2000). Daugelis polipeptidų, besiskiriančių savo dydžiu, aminorūgščių seka ar antrine struktūra, esant tam tikroms sąlygoms, gali formuoti panašios morfologijos amiloidines fibriles. Šis procesas susijęs su konkrečiomis mutacijomis gene, baltymų sintezės sutrikimais, temperatūros ar pH pasikeitimais, neįprasta sąveika su metalo jonais ar cheminėmis modifikacijomis (Stefani and Dobson, 2003).

1.1.1. Ligos, susijusios su netaisyklingu baltymų susivyniojimu

Baltymų nesugebėjimas taisyklingai susivynioti ar išlaikyti natyvią struktūrą lemia įvairius biologinius sutrikimus, pasireiškiančius daugiau nei dvidešimtyje degeneracinių ligų (1 lentelė). Tai spontaniškos (savaiminės), paveldimos ar užkrečiamos (perduodamos) ligos, kurios pažeidžia smegenis ir centrinę nervų sistemą (Alzheimerio, Creutzfeldt-Jakobo ligos), taip pat periferinius organus, tokius kaip širdis, kepenys, blužnis (sisteminė amiloidozė, II tipo

diabetas), bei skeleto audinius ir sąnarius. Amiloidozės būdingos ne tik žmonėms, bet ir gyvūnams. Keletas degeneracinių ligų susiję su šaperonų, ubikvitino, fermentų, vykdančių ubikvitilinimą ir deubikvitilinimą, aktyvumo sumažėjimu bei proteosomos sutrikimais, dėl kurių nevyksta normalus baltymų brendimas. Neteisingai susivynioję baltymai ar peptidai sudaro agregatus (amiloidų sankaupas), kurie sąveikauja su ląstelės komponentais, sutrikdydami jos funkcijas, ir taip lemdami ląstelės žūtį (Stefani and Dobson, 2003).

1 lentelė. Kelios amiloidozės ir jas sukeltys baltymai ar peptidai (adaptuota iš Stefani and Dobson, 2003).

<i>Ligos</i>	<i>Sukeliantis komponentas</i>
Alzheimerio liga	Aβ peptidas, tau baltymas
Kempinligė	Prionas
Parkinsono liga	α-sinukleinas
II tipo diabetas	Amilino fragmentas
Hantingtono liga	Hantingtinas
Pirminė sisteminė amiloidozė	Ig lengvoji grandinė
Injekcinė amiloidozė	Insulinas

Perduodamos spongiforminės encefalopatijos (TSE – transmissible spongiform encephalopathies), tokios kaip Kuru, Creutzfeldt-Jakobo liga, mirtina šeimyninė nemiga, kempinligė, išsiskiria iš kitų degeneracinių ligų, nes yra užkrečiamos ir turi keletą infektyvių atmainų, lemiančių skirtingus ligų fenotipus. Vienintelė žmonių TSE epidemija užfiksuota XX amžiaus viduryje Papua Naujojoje Gvinėjoje, kuomet žmonės užsikrėsdavo Kuru liga laidojimo apeigų metu valgydami sirgusio individo smegenis. Devintajame dešimtmetyje didelio visuomenės dėmesio sulaukė kempinligės protrūkis Didžiojoje Britanijoje, kurio metu nuo sirgusių karvių liga galėjo būti perduodama ir žmonėms. Dėl savo užkrečiamumo, ilgo inkubacijos periodo ir skirtingo ligų fenotipo buvo manyta, kad TSE sukelia „lėtas virusas“, bet kadangi patogenas buvo atsparus radiacijai ir nukleazėms, ši hipotezė buvo mažai tikėtina. Stanley Prusiner nustatė, kad TSE atveju infekciją perneša ne genetinė medžiaga, o neteisingai susivyniojęs baltymas, kurį jis pavadino prionu. Už šiuos tyrimus 1997 metais Prusiner buvo apdovanotas Nobelio premija (Cobb and Surewicz, 2009). Sergant TSE, infektyvus prioninis baltymas kaupiasi centrinės nervų sistemos audinių ląstelėse ar tarpląstelinėje erdvėje, skatindamas neuronų žūtį, dėl to sutrinka smegenų funkcijos, prarandama atmintis, pablogėja motorika.

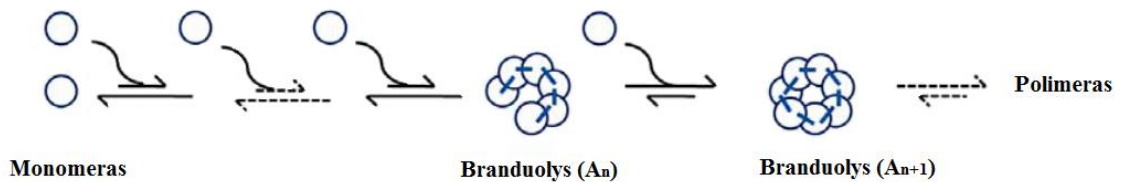
1.1.2. Prionų infektyvumas

Prioninis baltymas (PrP) yra žinduolių glikoproteinas, kuris po signalinio peptido ir fosfatidilinozitolio (membraninio inkaro) atskėlimo yra sudarytas iš 208 aminorūgščių. Esant perduodamoms spongiforminėms encefalopatijoms, tirpus, proteazei jautrus PrP (PrP^C – nuo *cellular* (ląstelinis)) yra paverčiamas į netirpų, proteazei atsparų PrP (PrP^{Sc} – nuo *Scrapie* (kempinligė)) (Oesch et al., 1985), kurio pirminė struktūra yra identiška PrP^C, o antrinė struktūra pasižymi dideliu β-klosčių kiekiu (Pan et al., 1993). Susidarymo metu PrP^{Sc} gali įgauti keletą infektyvių konformacijų, besiskiriančių specifiskumu ir užkrečiamumo barjeru. PrP^C transformacija gali vykti spontaniškai, esant mutacijai ar į organizmą patekus PrP^{Sc} agregatams (sėklai) (R. a Moore et al., 2009; Prusiner et al., 1998), kurie jungdamiesi prie PrP^C konformaciškai pakeičia jį į PrP^{Sc}. PrP^C pavertimo PrP^{Sc} mechanizmas nėra tiksliai žinomas, bet toks prionų gebėjimas savaime daugintis primena amiloidinių fibrilių susidarymą iš pirminio baltymo vykstant polimerizacijos reakcijai (R. A. Moore et al., 2009).

1.1.3. Amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmas

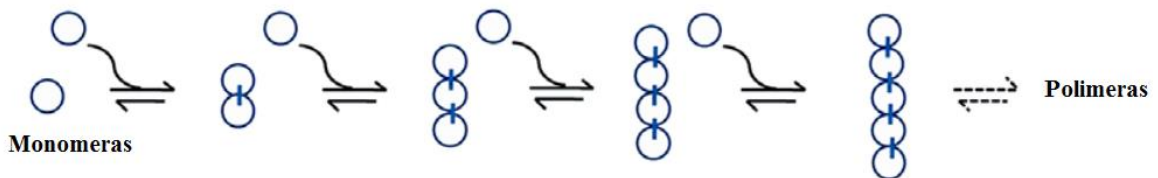
Norint gydyti degeneracines ligas, reikia suprasti amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmą. Būtinasis žingsnis, nuo kurio prasideda baltymo fibrilizacija, yra natyvios struktūros dalinis išsivyniojimas, susidarant labiau linkusiai agreguoti baltymo formai. Tokios konformacijos pirmatai hidrofobinių ir elektrostatiinių sąveikų dėka asocijuoja tarpusavyje, sudarydami branduolio tipo ar linijinius oligomeras, kurie polimerizuojasi iki protofibrilių, iš kurių susidaro subrendusios amiloidinės fibrilės (Kumar and Udgaonkar, 2010). Parodyta, kad pre-fibriliniai agregatai dėl neteisingo susivyniojimo metu atsidengusių polipeptidinės grandinės hidrofobinių paviršių yra toksiškesni nei subrendusios fibrilės (Stefani and Dobson, 2003).

Santosh Kumar įvardija du galimus fibrilių formavimosi modelius: branduolių ir linijinių. Branduolių susidarymo modelis (1.2 pav.) sudarytas iš dviejų fazių: pirmos – lėtos *lag* fazės, kurios metu baltymo monomero molekulės asocijuoja tarpusavyje, sudarydamos branduolį, ir antros – greitos ilgėjimo fazės. Iniciacijos stadija lėta, nes disociacijos konstanta yra didesnė nei asociacijos. Taip pat iniciacijos greitis priklauso ir nuo sudaromo branduolio dydžio bei baltymo koncentracijos. Kai kurių baltymų atveju branduolių susidarymo modelis ne visiškai atitinka polimerizacijos kinetiką, todėl jis patobulintas įvedant antrinių branduolių susidarymą, kai nauji augimo centrai formuojasi jau susidariusioje fibrilėje.



1.1 pav. Branduolių susidarymo modelio schema (adaptuota iš Kumar and Udgaonkar, 2010).

Linijinis polimerizacijos modelis yra panašus į branduolių susidarymo modelio ilgėjimo stadiją, tik polimero susidarymas gali prasidėti nuo bet kurio atskiro monomero (1.3 pav.). Monomerams asocijuojant visada susidaro identiškas ryšys, todėl polimerizacijos greičio konstanta yra nepriklausoma nuo polimero dydžio. Reakcijos pradžioje, esant didelei monomero koncentracijai, reakcijos greitis yra didelis, vėliau, artėjant prie pusiausvyros, jis mažėja.



1.2 pav. Linijinio polimerizacijos modelio schema (adaptuota iš Kumar and Udgaonkar, 2010).

Kiti autoriai pateikia tik vieną amiloidinių fibrilių formavimosi mechanizmą – branduolių susidarymo modelį (Andersen et al., 2009; Buell et al., 2012; Lin et al., 2008).

Amiloidinių fibrilių formavimąsi galima aprašyti įvairiomis matematinėmis funkcijomis. Branduolių susidarymą gali apibūdinti paprastos funkcijos (Naiki and Gejyo, 1999), fibrilių ilgėjimą – pirmo laipsnio kinetika (Esler et al., 1996). Polimerizaciją galima aprašyti dar sudėtingesniais trijų pakopų (Cannon et al., 2004) ar išsamesniais modeliais, atsižvelgiančiais į pirminį branduolių formavimąsi, fibrilių ilgėjimą ir antrinį branduolių susidarymą (Knowles et al., 2009; Xue et al., 2008).

Vienintelis agregacijos procesas, kurį galima atskirti nuo kitų, ir kuris gali būti inicijuojamas pridendant į reakcijos mišinį sėklos (amiloidinių agregatų), yra fibrilių ilgėjimas (Milton et al., 2013). Pastebėta, kad fibrilių ilgėjimas yra panašus į fermentinę reakciją (Chatani et al., 2010), kur fibrilių galai gali būti laikomi fermentų aktyviais centrais, o prie jų prisijungiantys monomerai ar oligomerai – substratais. Tada fibrilių ilgėjimas gali būti aprašomas lygtimi:



kur F – fibrilė, M – monomeras, o FM – trumpai gyvuojantis kompleksas, egzistuojantis nuo momento, kai monomeras prisijungia prie fibrilės, iki kol jis yra galutinai pritvirtinamas.

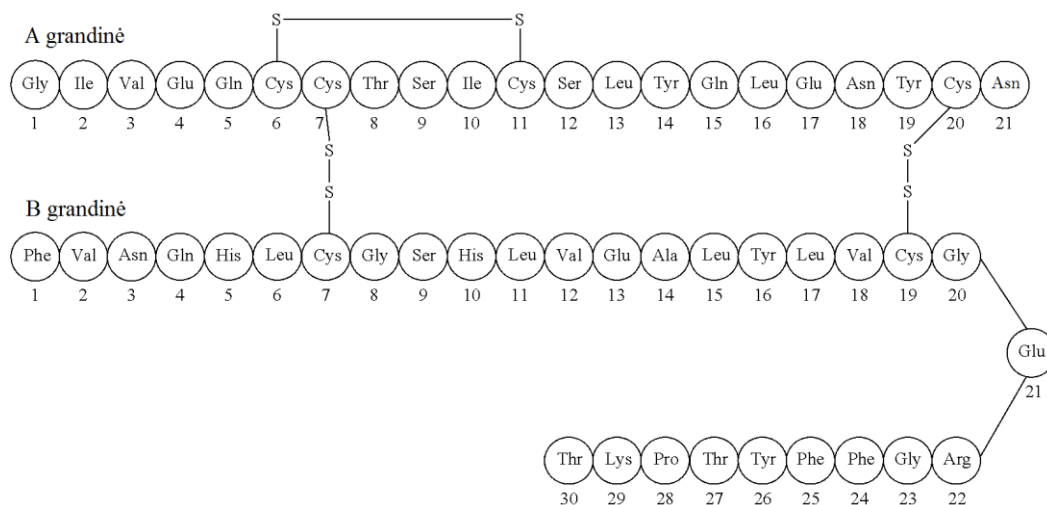
Fibrilių ilgėjimo greitį apibūdina Michaelio-Menten lygtis:

$$v = \frac{v_{max} \times M}{K_M + M} \quad (2)$$

kur M – monomero koncentracija, v_{max} – maksimalus greitis ($v_{max} = k_2 F_g$, k_2 – FM komplekso susidarymo į ilgesnę fibrilę greitis, F_g – fibrilės galų koncentracija), K_M – Michaelio konstanta ($K_M = (k_2 + k_{-1})/k_1$, k_1 – monomero jungimosi prie fibrilės greičio konstanta, k_{-1} – FM komplekso disociacijos konstanta).

1.1.4. Insulino agregacija

Insulinas – kasoje gaminamas hormonas, reguliuojantis gliukozės kiekį kraujyje. Insulino monomeras sudarytas iš dviejų polipeptidinių grandinių: A (21 aminorūgštis) ir B (30 aminorūgščių), sujungtų dviem tarpgrandininiais ir vienu vidugrandininio disulfidiniu ryšiu. Insulino hormonas yra heksamerinės struktūros, kurią palaiko du Zn^{+2} jonai (Lee et al., 2007).



1.3 pav. Insulino polipeptidinių grandinių schema (adaptuota iš Lantus, 2014 05 25).

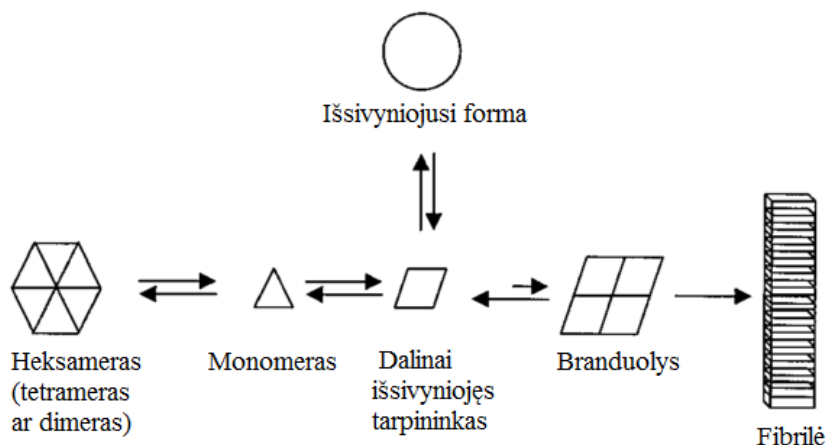
Taip pat insulinas gali egzistuoti ir dimerinėje (kai baltymo koncentracija mažesnė nei 1,5 mg/ml) ar tetramerinėje formoje (koncentracija didesnė nei 1,5 mg/ml) (Nielsen et al., 2001). Esant insulino nepakankamumui ar atsparumui sergant diabetu, pacientai dažnai gydomi hormono injekcijomis. Viena iš retesnių amiloidinių ligų yra injekcinė amiloidozė, kai nuolatinėje vaistų įšvirkštimo vietoje randama insulino agregatų (Dische et al., 1988). Be to, fibrilių susidarymas taip pat yra veiksnys, ribojantis ilgalaikį insulino vaistų saugojimą (Ivanova et al., 2009). Inkubuojant aukštoje temperatūroje ir žemame pH *in vitro* insulinas sudaro fibriles (Librizzi and Rischel, 2005), kurios atitinka bendras amiloidų savybes (Burke

and Rougvie, 1972). Insulino fibrilės sudarytos iš keturių tarpusavyje susivijusių protofilamentų (1.5 pav.) (Jiménez et al., 2002).



1.4 pav. Insulino fibrilės modelis. 4 fibrilę formuojantys iš β -klosčių sudaryti protofilamentai pavaizduoti skirtingomis spalvomis (adaptuota Jiménez et al., 2002).

Dėl nedidelės baltymo kainos ir lengvai susidarančių amiloidinių fibrilių insulinas agregacijos tyrimuose pradėtas naudoti kaip modelinis baltymas. Ištyrus insulino agregaciją galima būtų suprasti amiloidinių fibrilių formavimosi mechanizmą bei sustabdyti fibrilių susidarymą terapeutiniuose preparatuose. Nielsen 2001 metais pasiūlė galimą insulino agregacijos mechanizmą, kurio metu insulino molekulė, esanti heksamerinėje, tetramerinėje ar dimerinėje formoje, disocijuoja į monomerus, kurie yra pusiausvyroje su dalinai išsivyniojusiomis tarpinėmis formomis, turinčiomis didelį polinkį oligomerizuotis. Pusiausvyrai pasislinkus, susidariusios tarpinės formos, esant kritinei jų koncentracijai, suformuoja branduolius, o vėliau ir fibriles (1.6 pav.).



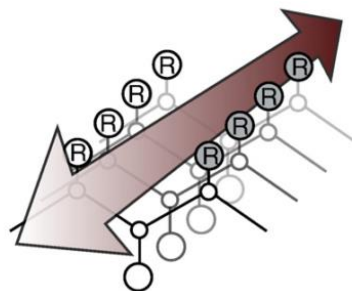
1.5 pav. Insulino fibrilių susidarymo schema (adaptuota iš Nielsen et al., 2001).

1.2. Amiloidinių fibrilių nustatymas Tioflavinu T

1959 metais Vassar and Culling parodė, kad dažui Tioflavinui T (ThT) jungiantis prie amiloidinių sankauptų audiniuose, labai stipriai padidėja jo fluorescencijos intensyvumas (Vassar and Culling, 1959) (emisija esant ~ 480 nm, o sužadimas ~ 450 nm bangos ilgiui (LeVine, 1993; Naiki et al., 1989)). Nustatyta, kad ThT jungimasis prie amiloidinių fibrilių yra

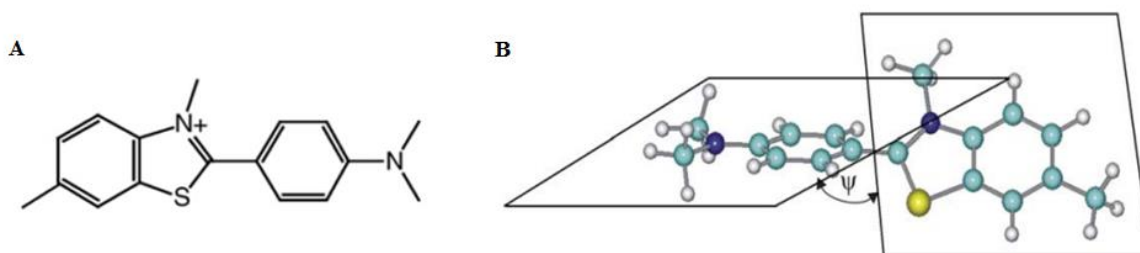
susijęs su jų β -klostyta struktūra, o fluorescencijos signalo sustiprėjimas tiesiogiai proporcingas susidariusių fibrilių kiekiui.

Nepaisant intensyvaus naudojimo amiloidų tyrimuose, tikslus ThT jungimosi mechanizmas kol kas nėra žinomas, bet manoma, kad dažas jungiasi prie visoms fibrilėms bendro struktūrinio motyvo (Sabaté et al., 2008). β -klostės sudaro savitą šoninių grandinių išsidėstymą, vadinamą β -klosčių kopėčiomis (Tsai et al., 2006), kuriam esant fibrilėse susiformuojamas kanalas, prie kurio gali jungtis ThT molekulės (1.7 pav.). Tokia šoninių grupių struktūra egzistuoja nepriklausomai nuo peptido sekos (Nelson et al., 2005).



1.6 pav. ThT jungimosi prie amiloidinių fibrilių modelis. ThT jungiasi prie šoninių grandinių paviršiuje susiformavusio kanalo (adaptuota iš Biancalana and Koide, 2010).

ThT yra optiškai neaktyvus fluoroforas, sudarytas iš benzotiazolo ir benzeno žiedų, laisvai besisukančių aplink bendrą C–C ryšį. Viena iš Tioflavino T fluorescencijos hipotezių teigia, kad amiloidinės fibrilės sudaro chiralinę aplinką, į kurią patekus ThT laisvas sukimasis tarp žiedų yra sustabdomas ir molekulės įgauna optiškai aktyvią *twisted* konformaciją (1.8 pav.) (Dzwolak and Pecul, 2005).



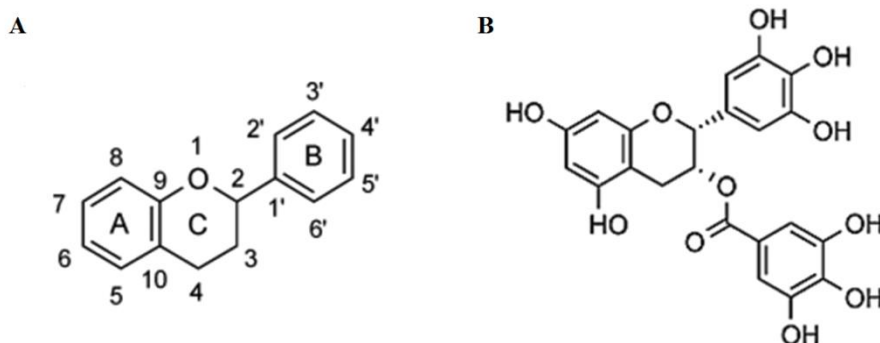
1.7 pav. Tioflavinas T **A)** Tioflavino T struktūra (Biancalana and Koide 2010). **B)** Optiškai aktyvaus ThT konformacija, pažymėtas dvisienis kampas tarp plokštumų (Dzwolak and Pecul, 2005).

1.3. Amiloidinės agregacijos slopikliai

Norint gydyti amiloidines ligas reikia rasti junginius, sumažinančius amiloidinių fibrilių citotoksiškumą. Tokie junginiai galėtų stabilizuoti amiloidinio baltymo natyvią struktūrą, slopinti su neteisingu baltymų susivyniojimu susijusius fermentus, optimizuoti baltymo sintezę ir pagerinti blogai susivyniojusiu baltymų kontrolę. Potencialiais vaistais galėtų būti ir

medžiagos, selektyviai reaguojančios su agreguojančiais polipeptidais ir slopinančios amiloidinių fibrilių formavimąsi arba suardančios jau susidariusias fibriles (Hudson et al., 2009). Ištirta, kad įvairiausi junginiai, tokie kaip salvianolinė rūgštis B (Durairajan et al., 2008), nitrofenoliai (De Felice et al., 2001) ir kitos medžiagos slopina fibrilių susidarymą.

Dėl antioksidantinio, priešauglinio ir antimikrobinio aktyvumo ypač susidomėta augalinės kilmės polifenoliais, vadinamais flavonoidais (1.9 pav. A), kurie dažniausiai randami lapų epidermyje ir vaisių odelėje. Parodyta, kad flavonoidai gali slopinti fibrilių susidarymą *in vitro*, *in vivo* ir ląstelių kultūrose (Chandrashekar et al., 2010). Yra keletas flavonoidų klasių: flavonoliai (kempferolis, kvercetas), flavonai (apigeninas, luteolinas), flavan-3-oliai (katechinas, epigalokatechingalatas), flavanonai (hesperidinas) ir kiti (Crozier et al., 2009).

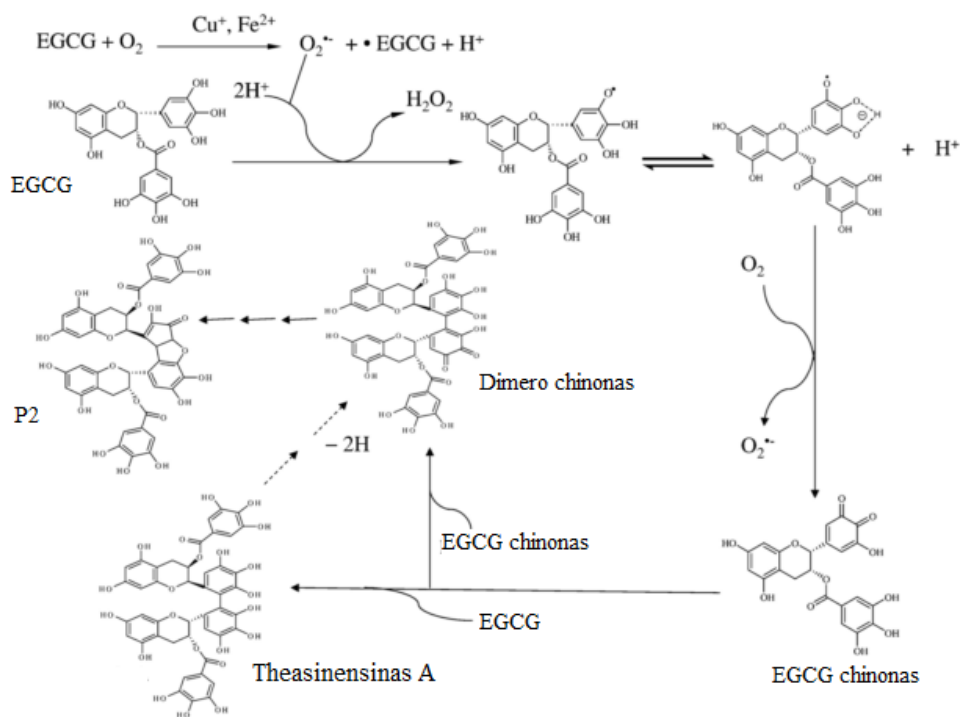


1.8 pav. Flavonoidų struktūra A) Flavonoidų struktūros pagrindinis motyvas B) EGCG struktūra (adaptuota iš Crozier et al., 2009).

Epigalokatechingalatas (EGCG) (1.9 pav. B) – gausiausiai žaliojoje arbatoje randamas flavonoidas. Viename puodelyje žaliosios ar ulongo arbatos (200 ml) yra nuo 30 iki 130 mg EGCG, o juodojoje arbatoje iki 70 mg. Ištirta, kad žalioji ir juodoji arbatos, bei EGCG pasižymi vėžio prevenciniu aktyvumu (Higdon and Frei, 2003; Yang et al., 2002). Epigalokatechingalatas efektyviai slopina transtiretino (Ferreira et al., 2009) α -sinukleino, amiloido- β (Ehrnhoefer et al., 2008) fibrilių susidarymą bei prioninio baltymo PrP^{Sc} formavimąsi (Rambold et al., 2008). Taip pat jis gali paversti jau susiformavusias α -sinukleino ir amiloido- β fibriles į mažiau ląstelėms toksiškus amorfinius agregatus (Bieschke et al., 2010). EGCG veikimo mechanizmas kol kas nėra tiksliai žinomas. Neutralioje terpėje EGCG yra nestabilus ir gali oksiduotis, sudarydamas superoksidą ir chinonus (Sang et al., 2005). Manoma, kad EGCG ar jo oksiduotų produktų ir amiloidinių fibrilių hidrofobinių jungimosi vietų susirišimas yra svarbus veiksnys fibrilių rekonstrukcijai. Kai fibrilių laisvos amino ar tiolinės grupės yra arti flavono hidrofobinių vietų, iš EGCG susidarę chinonai gali kovalentiškai modifikuoti amiloidinius baltymus susidarant Šifo bazei ar panašioms

junginiams. Toks pakeitimas apsaugo amiloidines fibriles nuo disociacijos ir fragmentacijos, kurių metu susidaro toksiški oligomerai. Hidrofobinis jungimosi mechanizmas greičiausiai lemia ir EGCG savybę slopinti amiloidinių baltymų agregaciją (Palhano et al., 2013).

pH, temperatūra, deguonies ir antioksidantų kiekis, metalo jonai, kiti arbatos komponentai ir EGCG koncentracija daro įtaką jo stabilumui. Galimo EGCG savaiminės oksidacijos mechanizmo schema pavaizduota 1.10 pav. (Sang et al., 2007). Esant neutraliam ar lengvai šarminiam pH, EGCG yra oksiduojamas molekulinio deguonies susidarant EGCG radikalui (EGCG[•]) ir superoksido radikalui (O₂^{•-}); šią reakciją greičiausiai katalizuoja metalo jonai. O₂^{•-} gali reaguoti su kita EGCG molekule, vėl susidarant EGCG[•] ir vandenilio peroksidui. Esant toms pačioms sąlygoms, EGCG[•] gali būti ir anijoninis radikalas (EGCG^{•-}), kuris sąveikauja su molekulinio deguonimi susidarant EGCG chinonui ir O₂^{•-}. O₂^{•-} gali reaguoti su kita EGCG molekule, vykstant EGCG savaiminės oksidacijos grandinei reakcijai. EGCG chinonas gali reaguoti su EGCG susidarant EGCG dimerui theasinensinui A, kuris taip pat gali sąveikauti su EGCG chinonu susidarant dimero chinonui, o jis gali būti toliau oksiduotas iki P2.



1.9 pav. Savaiminės EGCG oksidacijos mechanizmas (adaptuota iš Sang et al., 2007).

EGCG oksidaciją neutralioje terpėje tiria ir Hatano grupė, kuri yra išskyrusi ir išgryninusi dvylika EGCG oksidacijos produktų (Hatano et al., 2004, 2005, 2010).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos ir tirpalai

Medžiagos:

- Cayman Chemical Company: EGCG
- Fisher Scientific: uranilacetatas, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , NaOH , HCl , NaCl
- Sigma: Tioflavinas T, rekombinantinis žmogaus insulinas, EGCG
- Tocris bioscience: EGCG

Tirpalai:

Insulinas: insulinas tirpintas 100 mM pH 2 fosfatiniame buferyje.

EGCG: pradiniuose slopinimo eksperimentuose buvo naudojamas 10 mM koncentracijos EGCG, tirpintas 10 mM pH 2 fosfatiniame buferyje.

Vėlesniuose eksperimentuose naudotas 10 mM koncentracijos EGCG, tirpintas pH 7 fosfatiniame buferyje ir 24 valandas inkubuotas 37°C temperatūroje (Fisher Scientific termostatas). Tokiomis sąlygomis EGCG tirpalas pakinta, todėl jis pavadintas EGCG*.

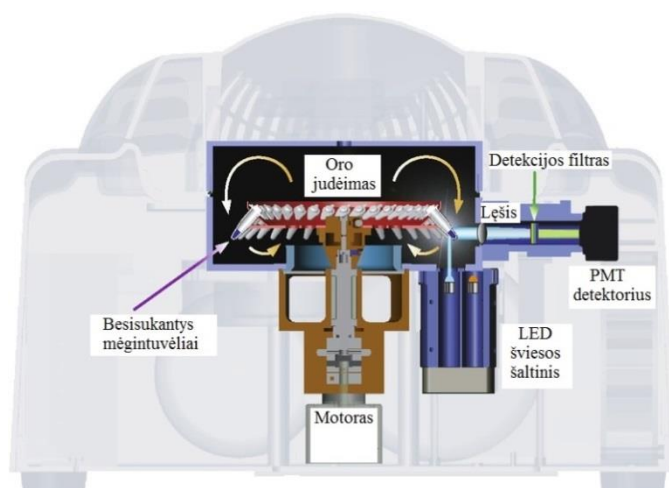
Insulino agregatai: agregatai ruošiami 1 mM koncentracijos insulino tirpalą inkubuoiant termomikseryje (purtymas – 300 apsisukimų per minutę, Ditas MHR 23) 60°C temperatūroje 24 valandas. Insulino agregatai tokiomis pat sąlygomis ruošiami ir mišinyje esant 1 mM EGCG*, tokie mėginiai inkubuojami 48 valandas.

Sėkla: insulino fibrilių ilgėjimo tyrimuose naudojama sėkla. Sėkla ruošama iš 1 ml susidariusių insulino agregatų, kurie 10 minučių ardomi ultragarsu naudojant Bandolin Sonopuls dezintegratorių su MS 73 antgaliu (amplitudė 50 %, 30 s/30 s ultragarsinimo/poilsio ciklai). Ardymo metu mėginiai laikomi lede.

2.2. Tioflavino T fluorescencijos matavimas

ThT fluorescencija stebima naudojantis Rotor-Gene Q (Qiagen) ir Rotor-Gene 6000 (Corbett) realaus laiko PGR aparatais. Reakcijos mišiniai (po 20 μl) išpilstomi į 200 ml mėgintuvėlius, kuriems sukantis rotoriuje (400 apsisukimų per minutę) išcentrinė jėga sulaiko skystį mėgintuvėlio dugne. Patekęs į LED šviesos šaltinį mėgintuvėlyje esantis mišinys yra sužadinas 470 \pm 10 nm ilgio šviesa, o emisija matuojama esant 510 \pm 5 nm bangos ilgiui (žaliasis kanalas). Gaunamos fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo agregacijos

laiko kreivės. Matavimo paklaidos mažos, nes rotorius sukantis visi mėginiai palaikomi toje pačioje temperatūroje judančio oro dėka.



2.1 pav. Rotor-Gene veikimo schema (adaptuota iš Qiagen, 2014 05 20).

2.2.1. Spontinės insulino agregacijos tyrimai

Visi spontinės insulino agregacijos tyrimai buvo atliekami 60°C temperatūroje 15 valandų. ThT fluorescencijos metodu esant ir nesant 100 mM NaCl buvo stebimas skirtingų insulino koncentracijų 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM spontinis fibrilių susidarymas.

Insulino agregacija analizuota ir pridėjus 5 mM EGCG, bei 1 mM, 0,2 mM, 0,15 mM, 0,1 mM, 0,08 mM ir 0,06 mM EGCG*. Esant 100 mM NaCl agregacija vykdyta su 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,15 mM, 0,1 mM EGCG*. Visuose eksperimentuose galutinė ThT koncentracija reakcijos mišinyje buvo 50 μM.

2.2.2. Insulino fibrilių ilgėjimo tyrimai

Insulino fibrilių ilgėjimo tyrimai atliekami 37°C temperatūroje 15 valandų, reakcijos mišinyje esant 10 % sėklos. Pirmųjų fibrilių ilgėjimo eksperimentų metu buvo stebima 5 mg/ml insulino agregacija esant ir nesant 100 mM NaCl.

Insulino fibrilių ilgėjimo slopinimas buvo tiriamas agreguojant skirtingoms insulino koncentracijoms (1,5 mM, 1,2 mM, 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM) esant 1 mM ir 2 mM EGCG*. Galutinė ThT koncentracija visuose eksperimentuose buvo 50 μM.

2.3. Atominės jėgos mikroskopija

Insulino agregatai su ir be EGCG* buvo 100 kartų skiedžiami dejonizuotu vandeniu ir 10 μl mišinio užnešama ant švaraus, ką tik nulupto žėručio. AJM naudojamas žėrutis yra

daugiasluoksnis, norint pastebėti kelių nm aukščio skirtumus žėručio paviršius turi būti labai lygus ir švarus, todėl mėginys kiekvieną kartą užnešamas ant naujai nulupto žėručio sluoksnio. Agregatai 1 minutę paliekami adsorbuotis, paskui žėručio paviršius nuplaunamas 1 ml vandens ir atsargiai išdžiovinamas, naudojant suspaustas azoto dujas.

Insulino amiloidinių fibrilių vaizdai gauti su MultiMode skenuojamojo zondo mikroskopu su Nanoscope IIIa kontrolieriu ir AS-12 E skanieriu ir aliuminiu dengtu NCHR silicio zonu (adata) (Nanosensors). Atominiuo mikroskopo zondas kontaktuoja su mėginiu virpinamuoju (TappingMode™) režimu.

2.4. Elektroninė mikroskopija

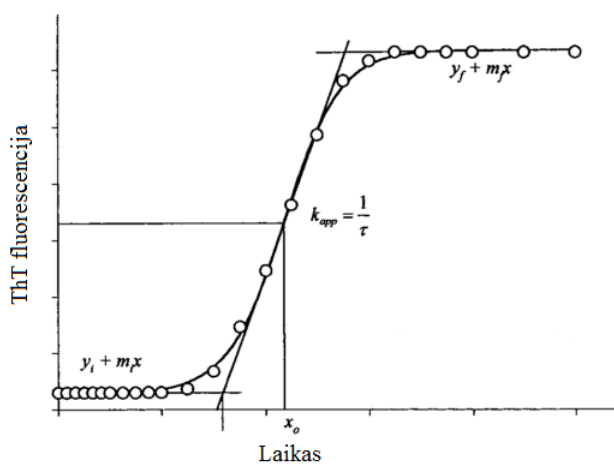
Su ir be EGCG* susidariusios insulino fibrilės 20 kartų skiedžiamos dejonizuotu vandeniu ir 3 μ l mišinio užnešama ant anglimi dengtų vario grotelių. Po 1 minutės skystis atsargiai nusausinamas su filtriniu popieriumi ir užlašinama 3 μ l 2 % vandeninio uranilacetato tirpalo. Dažas laikomas 30 sekundžių, paskui grotelės vėl švelniai nusausinamos popieriumi ir paliekamos džiūti 10 – 15 minučių.

Insulino fibrilių vaizdai buvo gauti naudojant FEI Morgagni 268 elektroninį mikroskopą.

2.5. Duomenų apdorojimas

Eksperimentų metu gautos ThT fluorescencijos kreivės buvo apdorojamos Microsoft Excel ir Origin 8 programomis.

Spontaninės insulino agregacijos kinetika gali būti apibūdinama sigmoidine kreive, kur pradžioje (*lag fazėje*) ThT fluorescencijos beveik nėra, paskui, didėjant susidariusių fibrilių kiekiui, matomas ThT fluorescencijos intensyvumo augimas, kuris galiausiai stabilizuojasi pasibaigus fibrilių formavimuisi (2.2 pav.) (Nielsen et al., 2001).



2.2 pav. Spontaninio insulino fibrilių susidarymo kreivė (adaptuota iš Nielsen et al., 2001).

Spontaninės insulino agregacijos metu gautos ThT fluorescencijos priklausomybės nuo laiko kreivės pirmiausia buvo normalizuotos nuo 0 (nėra susidariusių fibrilių – *lag* fazė) iki 1 (visas baltymas yra fibrilėse). Tada matavimai Origin programa buvo aproksimuoti naudojant sigmoidinę kreivę pagal lygtį:

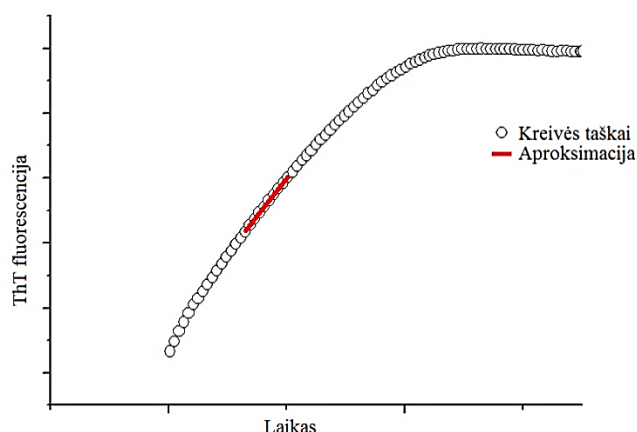
$$Y = y_i + m_i x + \frac{y_f + m_f x}{1 + e^{-(x-x_0)/\tau}} \quad (3)$$

kur Y – fluorescencijos intensyvumas, x – laikas ir x_0 – laikas, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio insulino (Nielsen et al., 2001). Skirtingų sąlygų įtaka spontaniniam insulino amiloidinių fibrilių susidarymui buvo vertinama lyginant gautą dydį x_0 .

Fibrilių ilgėjimo eksperimentų metu gauti fluorescenciniai matavimai negali būti aproksimuojami sigmoidine kreive, nes įdėjus sėklos iš karto prasideda amiloidinių fibrilių ilgėjimas (nėra *lag* fazės, kurios metu susidaro branduoliai) (2.3 pav.). Insulino fibrilių ilgėjimo kreivės normalizuojamos pagal ThT fluorescencijos intensyvumo maksimumą (fluorescencija stabili). Norint išsiaiškinti, ar insulino fibrilių ilgėjimas gali būti aprašomas Michaelio-Menten kinetiniu modeliu, normalizuotos kreivės Origin 8 programa buvo aproksimuojamos pagal lygtį:

$$F_{t+i} = F_t + \frac{v_{max}(M_{tot}-F_t)}{K_M+(M_{tot}-F_t)} i \quad (4)$$

kur F_t – fibrilizuoto baltymo koncentracija laiko momentu t , F_{t+i} – fibrilizuoto baltymo koncentracija laiko momentu $t+i$, i – iteracijos laiko intervalas, M_{tot} – baltymo koncentracija, v_{max} – maksimalus reakcijos greitis, K_M – Michaelio konstanta (Milton et al., 2013). Iš sutartiniais vienetais gautų K_m ir v_{max} reikšmių žinant baltymo koncentraciją apskaičiuojamos realios konstantų reikšmės. Tiesioginiam kreivės aprašymui Michaelio-Menten lygtimi reikalingi ypač geros kokybės eksperimentiniai duomenys. Tačiau insulino fibrilių ilgėjimo slopinimo tyrimų metu nepavyko gauti geros kokybės duomenų, todėl reakcijos kinetiniai parametrai nustatyti naudojantis Lineweaver-Burk koordinatėmis.



2.3 pav. Tiesiškai aproksimuota insulino fibrilių ilgėjimo kreivė.

Origin 8 programoje tiesiškai aproksimuojant fluorescencijos kreivę (2.3 pav.) ties žinoma monomero koncentracija gaunamas kreivės nuolinkio koeficientas, iš kurio apskaičiuojamas reakcijos greitis. Koordinačių ašyse atidedama $1/v$ priklausomybė nuo $1/[S]$. Iš Lineweaver-Burk koordinatėse tiesių atkertamų atkarpų ilgių apskaičiuojami kinetinės konstantos: maksimalus reakcijos greitis (v_{max}) ir Michaelio konstanta (K_M).

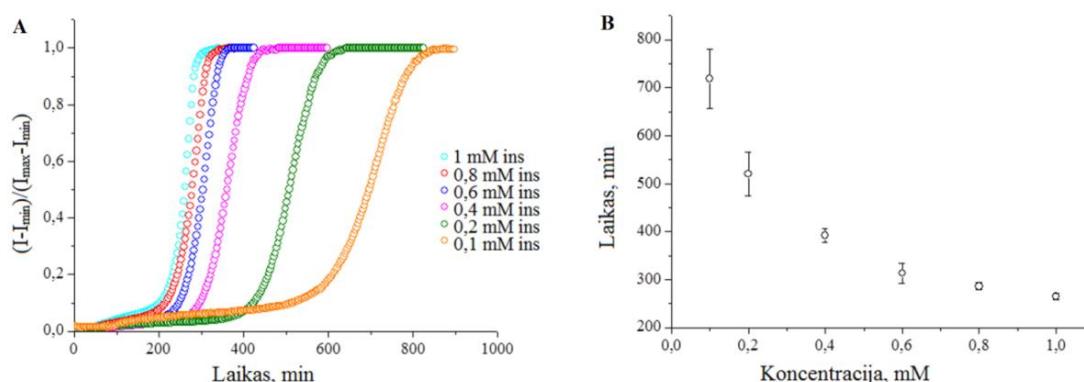
Statistinė duomenų analizė buvo atliekama iš 6 – 24 eksperimentų, naudojant Stjudento t skirstinį, kai $p = 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Spontaninės agregacijos tyrimai

3.1.1. Insulino koncentracijos įtaka fibrilių susidarymui

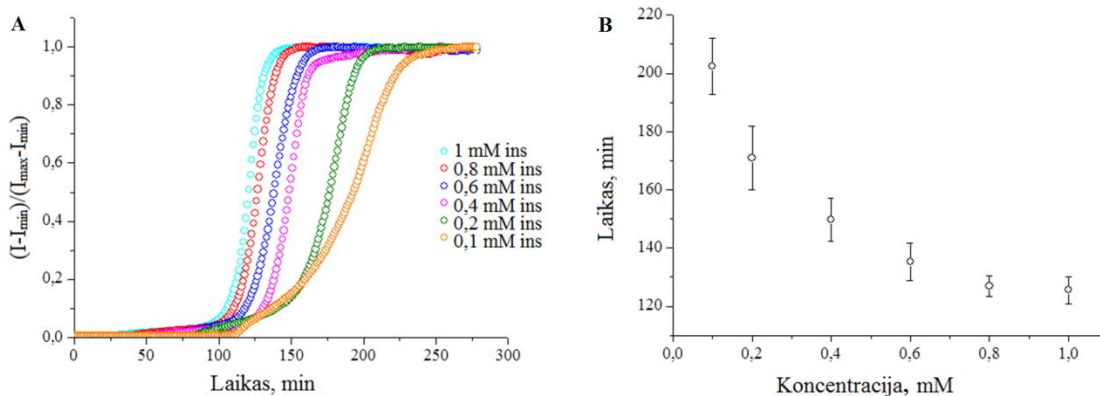
Atliekant insulino spontaninės agregacijos tyrimus, pirmiausia buvo iširta agregacijos laiko priklausomybė nuo insulino koncentracijos. 3.1 paveiksle matome, kad didėjant insulino koncentracijai agregacijos laikas trumpėja eksponentiškai. Pvz., baltymo koncentracijai esant 0,1 mM fibrilių susidarymas vyksta apie 3 kartus ilgiau, nei esant 10 kartų didesnei (1 mM) koncentracijai. Baltymo agregacija yra atsitiktinis procesas, tai ypač pastebima esant mažesnėms insulino koncentracijoms, jų agregacijos laiko paklaidos didesnės.



3.1 pav. Spontaninės insulino agregacijos laiko priklausomybė nuo koncentracijos **A)** Insulino agregacijos esant skirtingoms jo koncentracijoms ThT fluorescencijos kreivės. Mažėjant insulino koncentracijai fibrilių ilgėjimas vyksta lėčiau. **B)** Eksponentinė insulino agregacijos laiko priklausomybė nuo baltymo koncentracijos. Paklaidos apskaičiuotos iš 6 eksperimentų.

Žinoma, kad reakcijos mišinyje esant NaCl, spontaninis insulino fibrilių susidarymas vyksta greičiau (Grudzielanek et al., 2006). Insulino agregacijos tyrimų, atliktų reakcijos mišinyje esant 100 mM NaCl, rezultatai taip pat parodė mažesnę agregacijos laiko priklausomybę nuo baltymo koncentracijos. Ekperimentuose su druska 1 mM insulino agreguoja apytiksliai per 120 minučių, o nesant druskos agregacija trunka 2 kartus ilgiau (250 minučių), 0,1 mM insulino agreguoja per 200 minučių, o be druskos daugiau nei 3 kartus ilgiau (700 minučių) (3.2 pav.). Agregacijos laiko priklausomybė nuo insulino koncentracijos – eksponentinė.

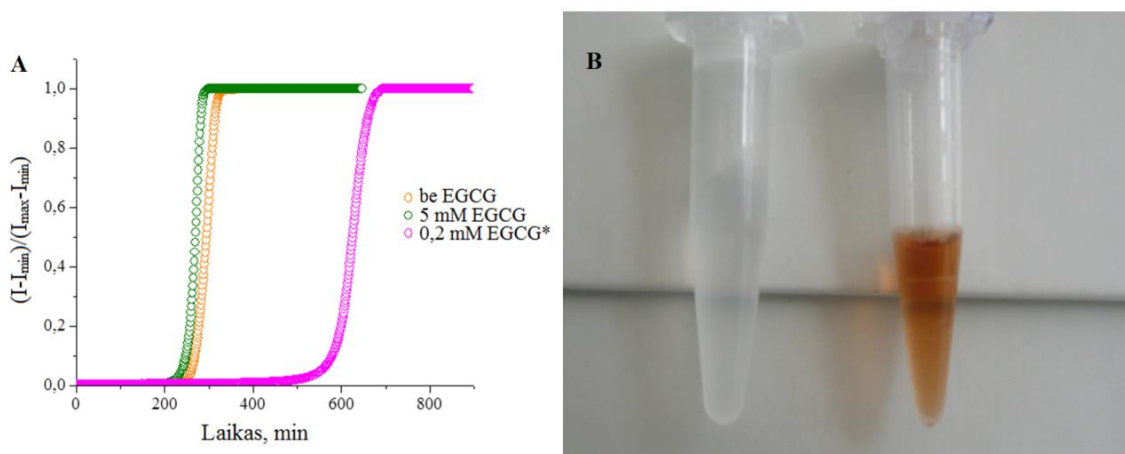
Insulino fibrilių susidarymas trunka ilgai, siekiant optimizuoti insulino agregacijos slopinimo eksperimentus, tolesniuose tyrimuose nuspręsta naudoti 1 mM insulino koncentraciją (tokiomis sąlygomis nesant slopiklio agregacija trunka apie 250 minučių).



3.2 pav. Spontaninės insulino agregacijos (esant 100 mM NaCl) laiko priklausomybė nuo koncentracijos **A)** Insulino agregacijos esant skirtingoms jo koncentracijoms ThT fluorescencijos kreivės. Mažėjant insulino koncentracijai fibrilių ilgėjimas vyksta lėčiau. **B)** Eksponentinė insulino agregacijos laiko priklausomybė nuo baltymo koncentracijos. Paklaidos apskaičiuotos iš 6 eksperimentų.

3.1.2. Epigalokatechingalato įtakos insulino agregacijai tyrimas

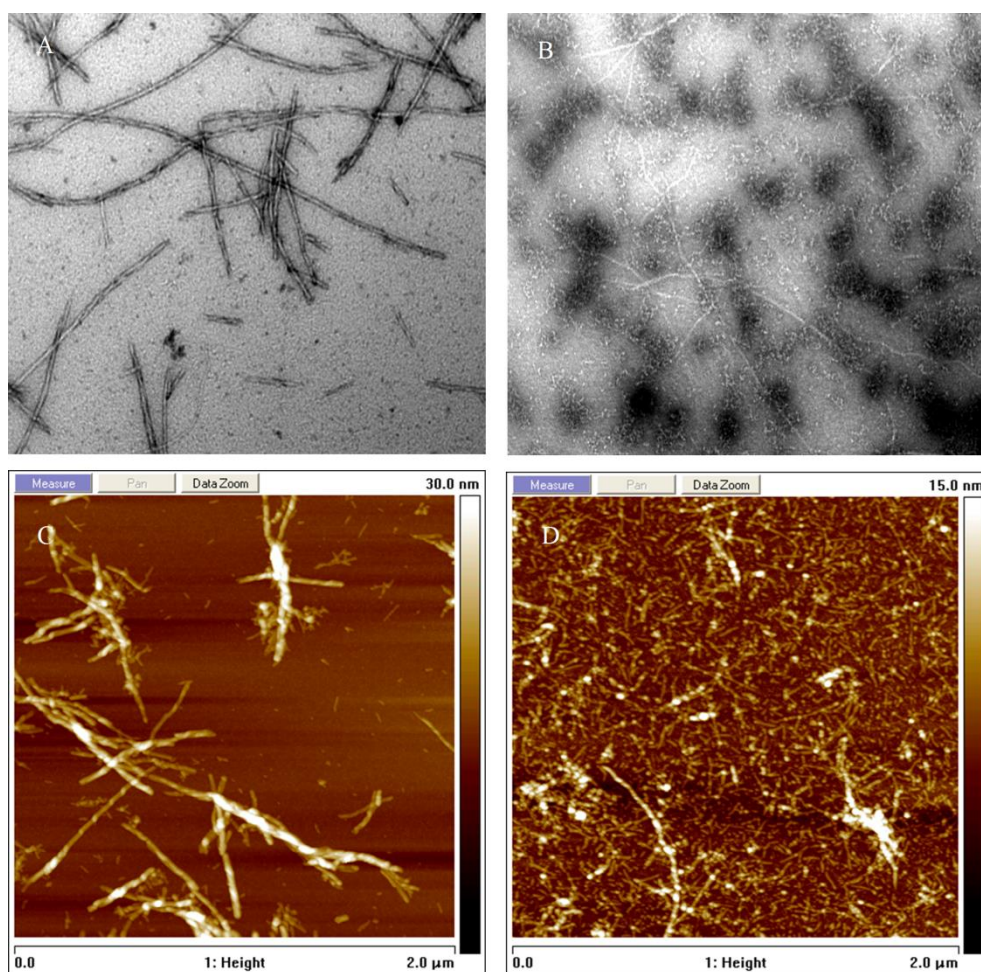
Pradiniuose insulino agregacijos slopinimo tyrimuose buvo naudojamas fosfatiniame buferyje pH 2 tirpintas EGCG. Viename iš literatūros šaltinių (Levy-Sakin et al., 2009) aprašoma, kad toks EGCG tirpalas slopino amiloidinę agregaciją, tačiau mūsų darbo metu EGCG įtaka insulino fibrilių susidarymui nebuvo stebima, net EGCG koncentracijai esant 5 kartus didesnei nei insulino (3.3 pav. A). Įdomu tai, kad straipsniuose, kuriuose EGCG įvardijamas kaip amiloidinės agregacijos slopiklis, eksperimentai atliekami neutraliame pH (Bieschke et al., 2010; Rambold et al., 2008; Roberts et al., 2009). Neutralioje terpėje EGCG yra nestabilus, jis gali savaime oksiduotis (Sang et al., 2007) sudarant daugybei skirtingų produktų (Hatano et al., 2004, 2005, 2010).



3.3 pav. EGCG ir EGCG* palyginimas **A)** Insulino agregacija esant skirtingoms EGCG ir EGCG* koncentracijoms. **B)** EGCG tirpalo pasikeitimas esant skirtingoms paruošimo sąlygoms. Kairėje pusėje EGCG 100 mM pH 2 fosfatiniame buferyje, dešinėje – EGCG 100 mM pH 7 fosfatiniame buferyje, inkubuotas 24 valandas.

Paruošus EGCG tirpalą pH 7 fosfatiniame buferyje ir palaikius jį 37°C temperatūroje 24 valandas, matomas akivaizsus tirpalo pasikeitimas: iš bespalvio jis tampa rudas (3.3 pav. B). Susidaro nežinomas junginys pavadintas – EGCG*, kuris buvo naudojamas tolesniuose tyrimuose. Vykdamt insulino agregacijos tyrimus su EGCG*, slopinimo efektas stebimas flavonoido koncentracijai esant 5 kartus mažesnei nei insulino (3.3 pav. A). Remiantis pradiniais tyrimais galima daryti išvadą, kad tikrasis amiloidinės agregacijos slopiklis yra ne EGCG, o jo darinys EGCG*.

Amiloidinių fibrilių susidarymas insulino agregacijos su slopikliu ir be jo metu buvo patvirtintas elektronine ir atominės jėgos mikroskopija (3.4 pav.).



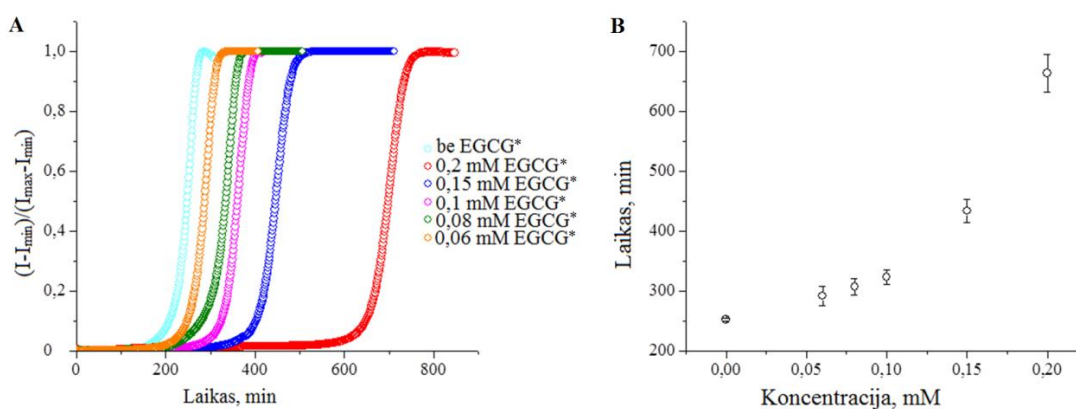
3.4 pav. Fibrilių vizualizavimas. Elektroninės mikroskopijos: **A)** insulino fibrilių ir **B)** insulino fibrilių susidariusių esant EGCG* nuotraukos. Atominės jėgos mikroskopijos: **C)** insulino fibrilių ir **D)** insulino fibrilių susidariusių esant EGCG* nuotraukos.

Skirtingomis sąlygomis ruoštų fibrilių morfologija nevienoda. Elektroniniu mikroskopu matomos insulino fibrilės ilgos, nesišakojančios (3.4 pav. A). Tuo metu insulino fibrilės, susidariusios mišinyje esant EGCG*, yra nedidelės, daug mažesnio diametro (3.4 pav. B). Atominės jėgos mikroskopijos nuotraukose matomos insulino fibrilės taip pat ilgos, sudarytos

iš kelių tarpusavyje susivijusių fibrilių (3.4 pav. C), o fibrilės gautos su EGCG* labai smulkios, sudarytos iš vienos fibrilės (3.4 pav. D).

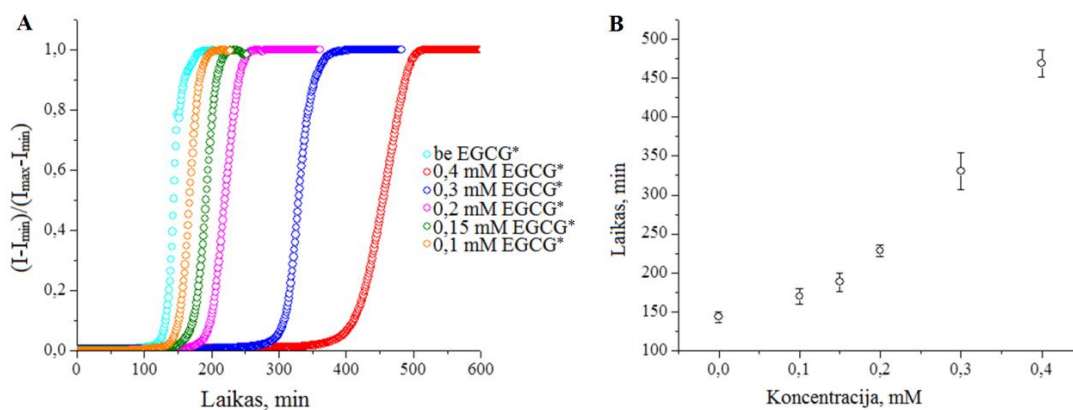
Fibrilių struktūra atominės jėgos mikroskopu nustatyta komandiruotės į Dortmundą Technikos universitetą metu.

Atlikus insulino agregacijos tyrimus su skirtingomis EGCG* koncentracijomis, nustatyta, kad insulino fibrilių susidarymo priklausomybė nuo slopiklio koncentracijos yra eksponentinė. Didėjant EGCG* koncentracijai reakcijos mišinyje, insulino agregacijos laikas ilgėja, pvz., esant 0,2 mM EGCG* agregacija trunka apie 2,6 kartus ilgiau, nei mišinyje nesant slopiklio (3.5 pav.).



3.5 pav. Spontaninės insulino agregacijos laiko priklausomybė nuo EGCG* koncentracijos. **A)** Insulino agregacijos esant skirtingoms EGCG* koncentracijoms ThT fluorescencijos kreivės **B)** Eksponentinė insulino agregacijos laiko priklausomybė nuo EGCG* koncentracijos. Paklaidos apskaičiuotos iš 12 eksperimentų.

Slopiklio įtaka insulino fibrilių susidarymui patikrinta ir esant NaCl. Kaip ir pradiniuose eksperimentuose, esant druskos, agregacijos laikas sutrumpėja. Rezultatai taip pat parodė eksponentinę agregacijos laiko priklausomybę nuo slopiklio koncentracijos (3.6 pav.). Slopinimo efektui pastebėti reikalinga didesnė EGCG* koncentracija.



3.6 pav. Spontaninės insulino agregacijos (esant 100 mM NaCl) laiko priklausomybė nuo EGCG* koncentracijos **A**) Insulino agregacijos esant skirtingoms EGCG* koncentracijoms kreivės **B**) Eksponentinė agregacijos laiko priklausomybė nuo EGCG* koncentracijos. Paklaidos apskaičiuotos iš 6 eksperimentų.

3.1.3. Insulino agregacijos ir slopinimo EGCG* mechanizmo tyrimas

Iš gautų spontaninio insulino fibrilių susidarymo ir agregacijos slopinimo duomenų galima bandyti nustatyti agregacijos slopinimo mechanizmą. Parodyta, kad epigalokatechingalatas jungiasi prie insulino (Wang et al., 2012). Jeigu jungiantis insulinui su EGCG* susiformuoja insulino-EGCG* kompleksas, kuris nedalyvauja fibrilės susidaryme, tuomet slopinimo efektas stebimas dėl to, kad agregacijoje dalyvauja mažesnis kiekis baltymo molekulių (dalis insulino molekulių susijungia su EGCG*). Darant prielaidą, kad EGCG* ir insulino jungimasis labai stiprus, t. y. susijungia visos EGCG* molekulės ($K_d \ll [EGCG^*]$) galima bandyti išsiaiškinti, koks insulino agregacijos modelis atitinka slopinimo mechanizmą.

Jeigu EGCG*, jungiasi prie insulino monomero ir trukdo oligomerų susidarymui, tai reakciją galima aprašyti taip:



kur I – insulinas, E – EGCG*, IE – insulino-EGCG* kompleksas, o F – fibrilė.

Norėdami patikrinti ar toks variantas teisingas, palyginame realius insulino monomero (insulino monomero koncentracija) agregacijos laikus ir menamus insulino monomero (agreguoja tik likusios laisvos, su EGCG* nesusijungusios molekulės) agregacijos laikus (3.7 pav.A). Agregacijos kreivės labai skiriasi, galima daryti išvadą, kad slopinimo mechanizmas ne toks.

Jeigu EGCG* jungiasi prie insulino dimero ir susidaręs kompleksas nedalyvauja tolimesnėje oligomerizacijoje, reakciją galima būtų aprašyti taip:



kur I_2 – insulino dimeras, E – EGCG*, I_2E – insulino dimero-EGCG* kompleksas, o F – fibrilė.

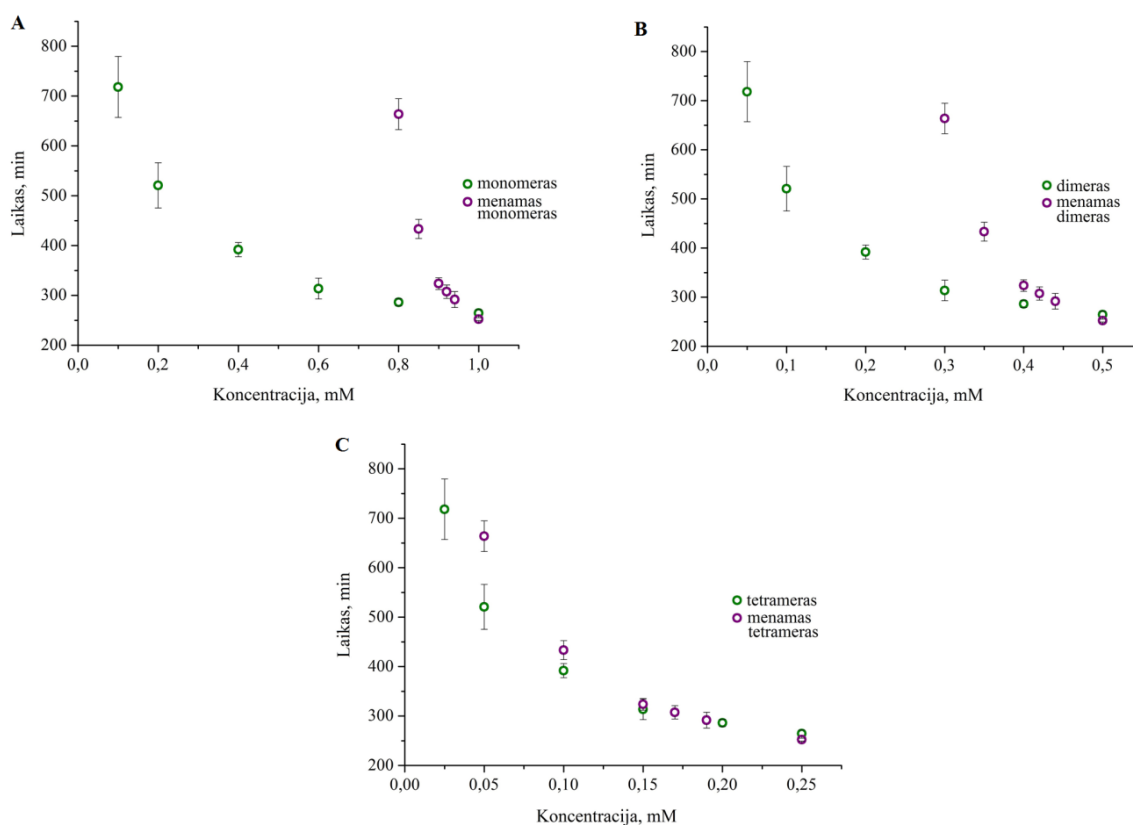
Tada insulino dimero agregacijos laikus (insulino dimero koncentracija) lyginame su menamais insulino dimero agregacijos laikais (agreguoja su EGCG* nesusijungusios baltymo molekulės) (3.7 pav. B). Kreivės yra arčiau viena kitos, nei monomero atveju, tačiau vis dar skiriasi, todėl toks modelis taip pat netinka.

Slopinimas galėtų vykti ir EGCG* jungiantis prie insulino tetramero molekulės:



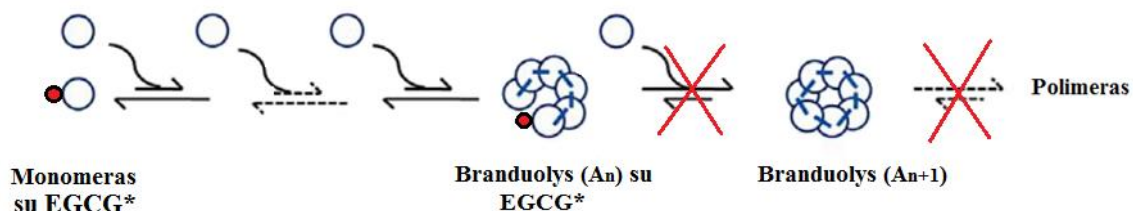
kur I_4 – insulino tetrameras, E – EGCG*, I_4E – insulino tetramero-EGCG* kompleksas, o F – fibrilė.

Insulino tetramero agregacijos laikus (tetramero koncentracija) lyginame su menamais insulino tetramero agregacijos laikais (3.7 pav. C). Menamo tetramero fibrilių susidarymo kreivė yra panašesnė į realią tetramerinėje formoje esančio insulino fibrilių susidarymo kreivę, tačiau matosi, kad visiško sutapimo nėra. Galima teigti, kad slopinimas vyksta EGCG* jungiantis ne prie monomero, dimero ar tetramero, bet susidarant EGCG* ir oligomero, didesnio nei tetrameras, kompleksui, kuris toliau nedalyvauja fibrilės susidaryme.



3.7 pav. Insulino agregacijos greičio palyginimas **A)** Menamo monomero kiekio (monomerinės formos insulino koncentracija atėmus EGCG* koncentraciją) agregacijos greičio palyginimas su realių insulino monomerų (insulino monomero koncentracija) agregacijos greičiu. **B)** Menamo dimero kiekio (insulino, esančio dimerinėje formoje, koncentracija atėmus EGCG* koncentraciją) agregacijos greičio palyginimas su realių insulino dimerų agregacijos greičiu. **C)** Menamo tetramero kiekio (insulino, esančio tetramerinėje formoje, koncentracija atėmus EGCG* koncentraciją) agregacijos greičio palyginimas su realių insulino tetramerų (insulino tetramero koncentracija) agregacijos greičiu.

Jeigu EGCG* nesustabdo monomerų oligomerizacijos, bet pradeda veikti tik kai oligomerai tampa didesni, tai slopinimo mechanizmas negali būti aprašomas linijinio amiloidinių fibrilių susidarymo modeliu. Tuo metu branduolių susidarymo modelis puikiai tinka tokiam slopinimui paaiškinti (3.8 pav.). Pradžioje prie monomero prisijungusi slopiklio molekulė netrukdo oligomerizacijai, tačiau oligomerui pasiekus tam tikrą dydį, tolimesnė agregacija yra sustabdoma.



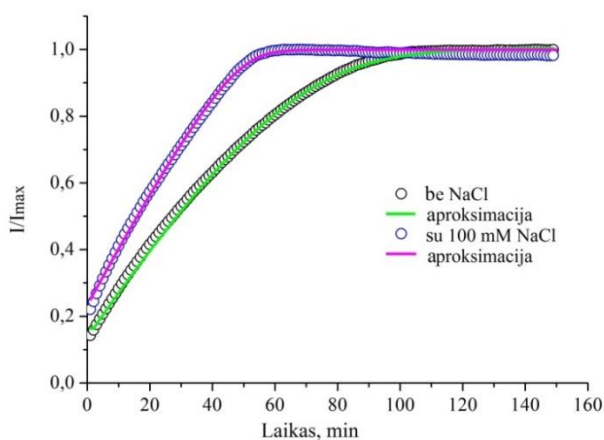
3.8 pav. Fibrilių susidarymo slopinimo modelis. EGCG*, jungdamasis prie insulino monomero ar dimero, neveikia fibrilių susidarymo, bet EGCG* prisijungimas prie besiformuojančio branduolio sustabdo jo susidarymą ir fibrilių ilgėjimas nebevyksta (adaptuota iš Kumar and Udgaonkar, 2010).

Gauti duomenys parodo, kad EGCG* netrukdo tetramerų susidarymui, todėl galima teigti, kad insulino agregacijos branduoliai yra ne mažesni nei pentamerai. Norint tiksliau nustatyti branduolio dydį, reikia žinoti EGCG*-insulino jungimosi konstantą, kurią planuojama nustatyti artimiausiu metu.

3.2. Fibrilių ilgėjimo tyrimai

3.2.1. Insulino fibrilių ilgėjimo kinetika

Manoma, kad amiloidinių fibrilių ilgėjimas yra panašus į fermentinę reakciją, todėl pabandyta šį procesą aprašyti Michaelio-Menten kinetiniu modeliu.



3.9 pav. Insulino fibrilių ilgėjimo kreivė aproksimuota pagal Michaelio-Menten kinetinį modelį.

Šio modelio pritaikomumas buvo tiriamas dviem skirtingomis sąlygomis, kiekvienu atveju turint keturis nepriklausomai paruoštus insulino mėginius. Eksperimentų metu gautos ThT fluorescencijos kreivės gerai aproksimavosi pagal (4) lygtį (3.9 pav.). Gauti insulino fibrilių ilgėjimo kinetiniai parametrai pateikti 3.1 lentelėje. Skirtingų mėginių v_{max} reikšmių išsibarstymas gali būti paaiškinamas nevienodu fibrilių suardymu ir fibrilių ilgėjimo spontaniškumu, o K_m reikšmių kitimas – aproksimacijos paklaidomis. Michaelio-Menten kinetiniu modeliu gauti parametrai mažai skiriasi nuo Lineweaver-Burk koordinatėse apskaičiuotų kinetinių parametru (duomenys nerodomi).

3.1 lentelė. Apskaičiuotos skirtingomis sąlygomis ruošų mėginių fibrilių ilgėjimo kinetinės konstantos: K_m – Michaelio konstanta ir v_{max} – maksimalus fibrilių ilgėjimo greitis.

	<i>Be NaCl</i>		<i>Su 100 mM NaCl</i>	
<i>Mėginys</i>	$K_M, \mu M$	$v_{max}, \mu M/min$	$K_M, \mu M$	$v_{max}, \mu M/min$
1	285,36 ± 5,68 ^a	22,14 ± 0,35	129,1 ± 7,27	25,07 ± 0,99
2	275,71 ± 8,65	17,22 ± 0,25	77,39 ± 6,91	20,18 ± 0,72
3	311,39 ± 4,81	20,04 ± 0,17	97,26 ± 3,67	21,17 ± 0,26
4	272,82 ± 9,43	14,77 ± 0,22	70,29 ± 2,52	16,55 ± 0,14
<i>Vidurkis</i>	286,32 ± 27,92	18,54 ± 5,12	93,51 ± 41,86	20,74 ± 5,56

^a ± paklaidos apskaičiuotos iš 18 pakartojimų.

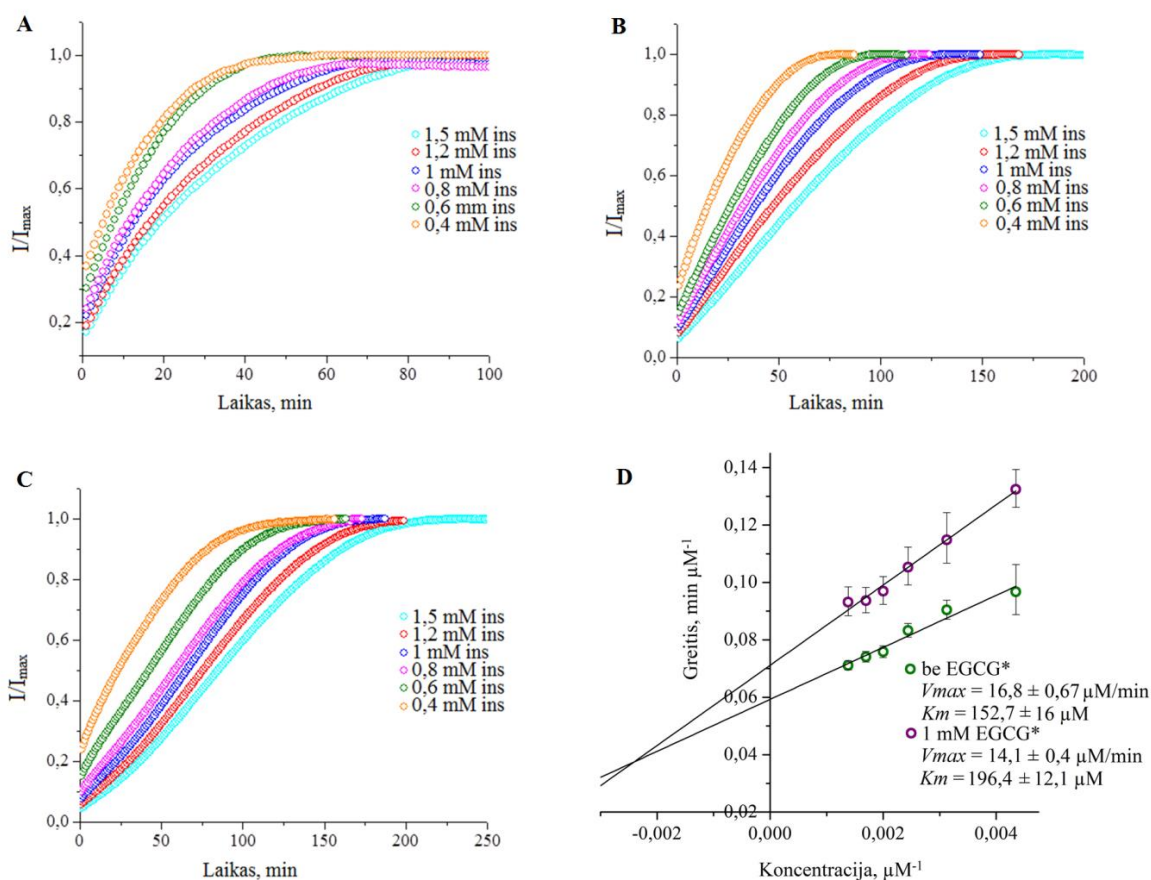
Tyrimų rezultatai patvirtino hipotezę, kad insulino amiloidinių fibrilių ilgėjimo mechanizmas yra panašus į fermentinę reakciją ir gali būti aprašomas Michaelio-Menten kinetiniu modeliu. Pateikti duomenys publikuoti Plos One žurnale (Milton et al., 2013).

3.2.2. Fibrilių ilgėjimo slopinimo mechanizmas

Fibrilių ilgėjimo esant EGCG* tyrimų metu EGCG* slopinimo efektas taip pat buvo stebimas, tik, palyginus su spontaniniu fibrilių susidarymu, EGCG* įtaka fibrilių ilgėjimo procesui daug mažesnė (3.10 pav.).

Kadangi fibrilių ilgėjimą pavyko aprašyti Michaelio-Menten kinetiniu modeliu, bandyta jį pritaikyti ir tyrimams su EGCG*. Norint šį procesą tiesiogiai aproksimuoti fermentiniu modeliu, reikia ypatingai geros kokybės kreivių, kurių eksperimentuose su EGCG* gauti nepavyko. Fibrilių ilgėjimo kreivės esant 2 mM EGCG* visiškai nepanašios į kreives be slopiklio ir esant 1 mM EGCG* (3.10 pav. A, B, C). 2 mM EGCG* kreivių forma labiau panaši į sigmoidinę, o ne eksponentinę, matomas akivaizdus kreivių išlinkimas. Greičiausiai esant didelei EGCG* koncentracijai vyksta ne tik fibrilių ilgėjimas, bet ir kažkoks kitas

procesas (galbūt antrinis branduolių susidarymas), todėl šių eksperimentų metu gautiems duomenims Michaelio-Menten kinetinio modelio pritaikyti nebuvo galima.



3.10 pav. Insulino fibrilių ilgėjimas **A)** Fibrilių ilgėjimas esant skirtingoms insulino koncentracijoms, reakcijos mišinyje yra 10 % sėklos. **B)** Fibrilių ilgėjimas esant skirtingoms insulino koncentracijoms, reakcijos mišinyje yra 10 % sėklos ir 1 mM EGCG. **C)** Fibrilių ilgėjimas esant skirtingoms insulino koncentracijoms, reakcijos mišinyje yra 10 % sėklos ir 2 mM EGCG. **D)** Mišraus slopinimo mechanizmo pavaizdavimas Lineweaver-Burk kordinatėse, apskaičiuotos kinetinės konstantos. Insulino fibrilių ilgėjimo greičių paklaidos apskaičiuotos iš 24 eksperimentų.

Fibrilių ilgėjimo greičiams nesant ir esant 1 mM EGCG* gauti buvo naudojama linijinė aproksimacija, o kinetinėms konstantoms apskaičiuoti – tradicinis Lineweaver-Burk koordinatinių metodas. Palyginus proceso kinetinius parametrus (reakcija be slopiklio ir su 1 mM EGCG*), matome, kad esant slopiklio K_m didėja, o v_{max} mažėja; galima sakyti, kad vyksta mišrus slopinimas (3.10 pav. D). Vis dėlto, kadangi EGCG* gali jungtis ne tik prie fermento (fibrilės galo), bet ir prie monomero, patikimų išvadų apie slopinimo mechanizmą daryti negalima.

IŠVADOS

1. Mažėjant insulino koncentracijai spontaninės agregacijos laikas didėja eksponentiškai.
2. Epigalokatechingalatas neturi įtakos spontaniniam insulino fibrilių susidarymui, tačiau EGCG* veikia kaip slopiklis.
3. Insulino fibrilių ilgėjimo mechanizmas yra panašus į fermentinę reakciją ir gali būti aprašomas Michaelio-Menten kinetiniu modeliu.
4. EGCG* slopina insulino fibrilių ilgėjimą, bet slopinimo įtaka daug mažesnė nei spontaninio fibrilių susidarymo atveju.
5. Fibrilių ilgėjimas, esant EGCG* koncentracijoms 2 mM ir didesnėms, negali būti aprašomas Michaelio-Menten kinetiniu modeliu.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos fakultetas

Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė

Akvilė BOTYRIŪTĖ

Bakalauro darbas

**Epigalokatechingalato įtakos insulino amiloidinių fibrilių susidarymui
tyrimai**

SANTRAUKA

Daugelis plačiai pasaulyje paplitusių degeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio, Parkinsono ligos, siejamos su amiloidine baltymų agregacija. Norint išgydyti šias ligas reikia gerai suprasti agregacijos mechanizmą bei surasti junginių, slopinančių amiloidinių fibrilių susidarymą.

Šio darbo metu kaip potencialus insulino amiloidinės agregacijos slopiklis buvo tiriamas žaliosios arbatos flavonoidas – epigalokatechingalatas (EGCG). Naudojant Tioflavino T fluorescencinės spektrometrijos metodą išsiaiškinta, kad EGCG neturi įtakos insulino agregacijai, o tikrasis agregacijos slopiklis yra savaiminės EGCG oksidacijos metu susidaręs junginys. Nustatyta, kad fibrilių ilgėjimo procesas yra panašus į fermentinę reakciją ir gali būti aprašomas Michaelio-Menten kinetika.

VILNIUS UNIVERSITY
Faculty of Chemistry
Department of Biochemistry and Molecular Biology

IVth year student of Biochemistry BSc
Akvilė BOTYRIŪTĖ

Bachelor thesis

Effect of Epigallocatechin gallate on insulin amyloid-like fibril formation

SUMMARY

Protein amyloidogenic aggregation is responsible for a number of widespread diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's diseases, type-II diabetes. In order to treat these disorders it is relevant to understand aggregation mechanism and to find fibril formation inhibitors.

The aim of this work was to test green tea flavonoid epigallocatechin gallate (EGCG) as a potential insulin aggregation inhibitor. It was found that EGCG does not affect insulin aggregation while actual aggregation inhibitor is compound that was formed by spontaneous EGCG oxidation. The results also showed that fibril elongation mechanism is similar to enzymatic reaction.

Vilnius, 2014

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Mokslinės publikacijos:

Milto K, Botyriūtė A, Smirnovas V. Amyloid-like fibril elongation follows michaelis-menten kinetics. PLoS One 2013 Jul 10; 8 (7): e68684.

Pranešimai konferencijose:

1. 2012 birželis. Botyriūtė A, Smirnovas V. Žodinis pranešimas „Epigallocatechingalato (EGCG) įtaka insulino amiloidogenezei“, *LMT studentų mokslinės praktikos konferencija*, Vilnius, Lietuva.
2. 2013 kovas. Botyriūtė A, Smirnovas V. Žodinis pranešimas „Epigallocatechin-3-gallate as a potential inhibitor of insulin amyloid-like fibril formation“, *Tarptautinė studentų mokslinė konferencija „Open Readings“*, Vilnius, Lietuva.
3. 2013 balandis. Milto K, Botyriūtė A, Smirnovas V. Stendinis pranešimas „Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics“, *Protein misfolding in disease: molecular processes and translational research toward therapy*, Roscoff, Prancūzija.
4. 2013 birželis. Botyriūtė A, Kazlauskas E, Smirnovas V. Stendinis pranešimas „Flavone-mediated insulin fibrillation“, *Molecular mechanisms and physiological consequences of protein aggregation*, Big Sky, JAV.
5. 2013 spalio. Smirnovas V, Botyriūtė A, Milto K, Labanauskaitė F. Stendinis pranešimas „Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics“, *4th Scandinavian meeting on amyloid proteins and disease*, Lund, Švedija.
6. 2014 kovas. Botyriūtė A, Smirnovas V. Stendinis pranešimas „Flavone-mediated insulin fibrillation“, *Tarptautinė studentų mokslinė konferencija „Open Readings“*, Vilnius, Lietuva.
7. 2014 gegužė. Mališauskas R, Botyriūtė A, Dargužis D, Smirnovas V. Stendinis pranešimas „Flavone derivatives as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation“, *Biophysics of amyloids and prions*, Naples, Italija.

Mokslinės komandiruotės:

2013 04 01 – 2013 04 12 komandiruotė į Dortmundos Technikos universitetą, Vokietijoje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Alzheimer's Disease International [internetinė svetainė], [cituota 2014 05 15]. Adresas: <http://www.alz.co.uk>

Andersen CB, Yagi H, Manno M, Martorana V, Ban T, Christiansen G, et al. Branching in amyloid fibril growth. *Biophys J* 2009; 96: 1529–36.

Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 1405–12.

Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H, Neugebauer K, et al. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 7710–5.

Buell AK, Dobson CM, Welland ME. Measuring the kinetics of amyloid fibril elongation using quartz crystal microbalances. *Methods Mol Biol* 2012; 849: 101–19.

Burke MJ, Rougvie MA. Cross- protein structures. I. Insulin fibrils. *Biochemistry* 1972; 11: 2435–9.

Cannon MJ, Williams AD, Wetzel R, Myszka DG. Kinetic analysis of beta-amyloid fibril elongation. *Analytical biochemistry* 2004; 328: 67–75.

Chandrashekar IR, Adda CG, MacRaild C a, Anders RF, Norton RS. Inhibition by flavonoids of amyloid-like fibril formation by *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2. *Biochemistry* 2010; 49: 5899–908.

Chatani E, Ohnishi R, Konuma T, Sakurai K, Naiki H, Goto Y. Pre-steady-state kinetic analysis of the elongation of amyloid fibrils of beta(2)-microglobulin with tryptophan mutagenesis. *J Mol Biol* 2010; 400: 1057–66.

Cobb NJ, Surewicz WK. Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* 2009; 48: 2574–85.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009; 26: 1001–43.

Dische FE, Wernstedt C, Westermark GT, Westermark P, Pepys MB, Rennie JA, et al. Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* 1988; 31: 158–61.

Durairajan SSK, Yuan Q, Xie L, Chan W-S, Kum W-F, Koo I, et al. Salvianolic acid B inhibits Abeta fibril formation and disaggregates preformed fibrils and protects against Abeta-induced cytotoxicity. *Neurochem Int* 2008; 52: 741–50.

Dzwolak W, Pecul M. Chiral bias of amyloid fibrils revealed by the twisted conformation of Thioflavin T: an induced circular dichroism/DFT study. *FEBS letters* 2005; 579: 6601–3.

Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, et al. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 558–66.

- Esler WP, Stimson ER, Ghilardi JR, Vinters HV, Lee JP, Mantyh PW, et al. In vitro growth of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques displays first-order kinetics. *Biochemistry* 1996; 35: 749–57.
- De Felice FG, Houzel JC, Garcia-Abreu J, Louzada P Jr, Afonso RC, Meirelles MN, et al. Inhibition of Alzheimer's disease beta-amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols: implications for Alzheimer's therapy. *FASEB J* 2001; 15: 1297–19.
- Ferreira N, Cardoso I, Domingues MR, Vitorino R, Bastos M, Bai G, et al. Binding of epigallocatechin-3-gallate to transthyretin modulates its amyloidogenicity. *FEBS Lett* 2009; 583: 3569–76.
- Grudzielanek S, Smirnovas V, Winter R. Solvation-assisted pressure tuning of insulin fibrillation: from novel aggregation pathways to biotechnological applications. *Journal of molecular biology* 2006; 356: 497–509.
- Hatano T, Hori M, Miwako K, Ohyabu T, Ito H, Yoshida T. Characterization of the Oxidation Products of (-)-Epigallocatechin Gallate, a Bioactive Tea Polyphenol, on Incubation in Neutral Solution. *Heterocycles* 2004; 63: 1547–54.
- Hatano T, Ohyabu T, Yoshida T. The Structural Variation in the Incubation Products of (-)-Epigallocatechin Gallate in Neutral Solution Suggests Its Breakdown Pathways. *Heterocycles* 2005; 65: 303–10.
- Hatano T, Ohyabu T, Taniguchi S, Ito H. New Oxidation Products from (-)-Epigallocatechin Gallate in Neutral Solution. *Heterocycles* 2010; 82: 1685.
- Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 43: 89–143.
- Hudson SA, Ecroyd H, Dehle FC, Musgrave IF, Carver JA. (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) maintains kappa-casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway. *J Mol Biol* 2009; 392: 689–700.
- Ivanova MI, Sievers SA, Sawaya MR, Wall JS, Eisenberg D. Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 18990–5.
- Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 25–54.
- Jiménez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson CV, Dobson CM, Saibil HR. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9196–201.
- Knowles TPJ, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SIA, Aguzzi A, Vendruscolo M, et al. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* 2009; 326: 1533–7.
- Kumar S, Udgaonkar J. Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Current Science* (00113891) 2010
- Lantus [internetinè svetainè], [atnaujinta 2013 11; cituota 2014 05 20]. Adresas: <http://www.lantus.com/hcp>

- Lee C-C, Nayak A, Sethuraman A, Belfort G, McRae GJ. A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophys J* 2007; 92: 3448–58.
- LeVine H 3rd. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 1993; 2: 404–10.
- Levy-Sakin M, Shreberk M, Daniel Y, Gazit E. Targeting insulin amyloid assembly by small aromatic molecules: toward rational design of aggregation inhibitors. *Islets* 2009; 1: 210–5.
- Librizzi F, Rischel C. The kinetic behavior of insulin fibrillation is determined by heterogeneous nucleation pathways. *Protein Sci* 2005; 14: 3129–34.
- Lin M-S, Chen L-Y, Tsai H-T, Wang SS-S, Chang Y, Higuchi A, et al. Investigation of the mechanism of beta-amyloid fibril formation by kinetic and thermodynamic analyses. *Langmuir* 2008; 24: 5802–8.
- Makin OS, Serpell LC. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J* 2005; 272: 5950–61.
- Marshall KE, Serpell LC. Insights into the Structure of Amyloid Fibrils. *Open Biol J* 2009; 2: 185–92.
- Milto K, Botyriute A, Smirnovas V. Amyloid-like fibril elongation follows michaelis-menten kinetics. *PLoS One* 2013; 8: e68684.
- Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19: 14–22.
- Naiki H, Gejyo F. Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol* 1999; 309: 305–18.
- Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem* 1989; 177: 244–9.
- Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AØ, Riekkel C, Grothe R, et al. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 2005; 435: 773–8.
- Nielsen L, Khurana R, Coats a, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, et al. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* 2001; 40: 6036–46.
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40: 735–46.
- Palhano FL, Lee J, Grimster NP, Kelly JW. Toward the molecular mechanism(s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils. *J Am Chem Soc* 2013; 135: 7503–10.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10962–6.
- Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. Prion protein biology. *Cell* 1998; 93: 337–48.
- Puchtler H, Sweat F. Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem* 1965; 13: 693–4.

Puchtler H, Sweat F. A review of early concepts of amyloid in context with contemporary chemical literature from 1839 to 1859. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 123–34.

Qiagen [internetinè svetainè]. 2014 [cituota 2014 03 02]. Adresas: <http://www.qiagen.com>

Rambold AS, Miesbauer M, Olschewski D, Seidel R, Riemer C, Smale L, et al. Green tea extracts interfere with the stress-protective activity of PrP and the formation of PrP. *Journal of neurochemistry* 2008; 107: 218–29.

Roberts BE, Duennwald ML, Wang H, Chung C, Lopreiato NP, Sweeny EA, et al. A synergistic small-molecule combination directly eradicates diverse prion strain structures. *Nat Chem Biol* 2009; 5: 936–46.

Sabaté R, Lascu I, Saupé SJ. On the binding of Thioflavin-T to HET-s amyloid fibrils assembled at pH 2. *J Struct Biol* 2008; 162: 387–96.

Sang S, Yang I, Buckley B, Ho C-T, Yang CS. Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free radical biology & medicine* 2007; 43: 362–71.

Sang S, Lee M-J, Hou Z, Ho C-T, Yang CS. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 9478–84.

Sipe JD, Cohen a S. Review: history of the amyloid fibril. *Journal of structural biology* 2000; 130: 88–98.

Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2003; 81: 678–99.

Tsai H-HG, Gunasekaran K, Nussinov R. Sequence and structure analysis of parallel beta helices: implication for constructing amyloid structural models. *Structure* 2006; 14: 1059–72.

Vassar PS, Culling CF. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* 1959; 68: 487–98.

Wang S-H, Liu F-F, Dong X-Y, Sun Y. Calorimetric and spectroscopic studies of the interactions between insulin and (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biochemical Engineering Journal* 2012; 62: 70–8.

Xue W-F, Homans SW, Radford SE. Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 8926–31.

PRIEDAS

Priede pateikiama bakalauro darbo metu išleista mokslinė publikacija.

Amyloid-Like Fibril Elongation Follows Michaelis-Menten Kinetics

Katazyna Milto, Akvile Botyriute, Vytautas Smirnovas*

Department of Biothermodynamics and Drug Design, Vilnius University Institute of Biotechnology, Vilnius, Lithuania

Abstract

A number of proteins can aggregate into amyloid-like fibrils. It was noted that fibril elongation has similarities to an enzymatic reaction, where monomers or oligomers would play a role of substrate and nuclei/fibrils would play a role of enzyme. The question is how similar these processes really are. We obtained experimental data on insulin amyloid-like fibril elongation at the conditions where other processes which may impact kinetics of fibril formation are minor and fitted it using Michaelis-Menten equation. The correlation of the fit is very good and repeatable. It speaks in favour of enzyme-like model of fibril elongation. In addition, obtained K_M and v_{max} values at different conditions may help in better understanding influence of environmental factors on the process of fibril elongation.

Citation: Milto K, Botyriute A, Smirnovas V (2013) Amyloid-Like Fibril Elongation Follows Michaelis-Menten Kinetics. PLoS ONE 8(7): e68684. doi:10.1371/journal.pone.0068684

Editor: Ilia V. Baskakov, University of Maryland School of Medicine, United States of America

Received: March 13, 2013; **Accepted:** June 3, 2013; **Published:** July 10, 2013

Copyright: © 2013 Milto et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was funded by Marie Curie Career Integration Grant 293476. KM and AB acknowledge support by project "Promotion of Student Scientific Activities" from the Research Council of Lithuania. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vytautas.smirnovas@bti.vu.lt

Introduction

First amyloid-like deposits were found more than a hundred years ago. Nowadays we know tens of different diseases which are related to protein amyloid-like fibril formation. Numbers of other, disease-unrelated proteins can aggregate into amyloid-like fibrils under certain conditions. One of the hypotheses proposes fibrillar structure to be generic for all proteins [1]. It is suggested that fibrils are formed via nucleated growth (also known as "nucleation-elongation") mechanism. Nucleation is rather a stochastic process - even at identical conditions, lag times of the fibrillation may differ [2,3]. Once the first nucleus is formed, elongation process starts. While just several molecules may be enough to form nucleus, it can recruit thousands of molecules upon fibril elongation. Elongation is usually faster process than nucleation. Moreover, fibrils can elongate under conditions, not favorable for nucleation. Taken together, it suggests that the main driving force of amyloid formation lays in elongation.

Several different approaches were used to describe the process of protein amyloid-like fibril formation as a mathematical function. From simple logistic equation to describe nucleated growth [4,5] and first-order kinetics to describe elongation [4,6,7], to more complicated three-step polymerization model [8] and even comprehensive models taking into account a sum of possible events such as primary nucleation, elongation and secondary nucleation (as breaking or branching of fibrils) [9–11]. However, these models still have some issues. Most common is an imperfect fit when applied to an experimental data. It may be a problem of both, the model, which may miss some of the processes involved in the fibrillation, and the data, which may be affected by fibrillation-unrelated processes. Thus to get a perfect fit by any model, the process of aggregation must be strictly controlled to make sure the data would not involve any processes, not described by the model.

Our idea was to design the most simple amyloid-like fibril formation experiment which would involve the least number of different processes and thus could be fitted by a simple model. The only aggregation process, which can be separated from others, is fibril elongation. It can be initiated by adding fibrils to a protein solution. Concentration of fibrils and conditions of the reaction can be optimized to avoid primary nucleation. Secondary nucleation can be minimized by avoiding any kind of agitation.

It was noticed that elongation of fibrils is very similar to an enzymatic reaction [12] and even analyzed using Michaelis-Menten equation [13]. Growing ends of the fibril play role of the enzyme active site while monomers or oligomers play role of the substrate. Increase in mass of fibril mimics the product of enzymatic reaction. We applied the best-known model of enzyme kinetics, Michaelis-Menten equation, to describe the process of amyloid-like fibril elongation. Typical enzymatic reaction involves substrate binding and catalysis steps and can be summarized as:



where E is enzyme, S - substrate, ES - enzyme-substrate complex, and P - product. Elongation of fibrils can be described similar way:



where F is fibril, M - monomer (in fact, we can't rule out the possibility of fibril elongation through attaching oligomers, but to keep the model as simple as possible we use M), and FM is a short-living complex, which exists from the moment when monomer attaches to the fibril until it's completely incorporated. The rate of fibril elongation can be described by Michaelis-Menten equation:

$$v = \frac{v_{max}M}{K_M + M} \quad (3)$$

where M is concentration of monomer, v_{max} is the maximum rate ($v_{max} = k_2 F_e$, k_2 - rate constant of the FM complex maturation into longer fibrils, and F_e is concentration of fibril ends), and K_M is Michaelis constant ($K_M = (k_2 + k_{-1})/k_1$, k_1 and k_{-1} are rate constants of monomer binding to the fibril and FM complex dissociation, respectively).

Results and Discussion

Ultrasonic treatment is often used for preparation of fibril seeds in studies of amyloid-like aggregation. It breaks fibrils into shorter pieces [14,15] increasing number of fibril ends and accelerating elongation rate without a change of total protein concentration. In addition it also leads to more homogenous suspension [15], which is very important for reproducibility of results when working with high concentration of proteins. Scientists around the world use a number of different devices, such as different ultrasonic baths [15,16] or homogenizers with microprobes [14,17]. In each case there are a number of different factors which can influence efficiency of sonication. Due to this fact we checked the efficiency of our sonication setup before proceeding to further experiments. Sonication in a bath is much less efficient and highly dependent on properties of sample tubes. We observed difference in efficiency of sonication when using thin-walled tubes versus usual tubes (data not shown). Microprobes can be inserted into the sample, thus sonication efficiency is much less dependent on properties of tubes. Figure 1 shows a comparison of fibril elongation kinetics using seeds prepared by different sonication times. There is >10 times difference in rates of elongation while using unsonicated vs. sonicated fibrils as seeds. The time of sonication is also important, though every additional pulse of 30 seconds is less efficient, probably because shorter fibrils are mechanically more stable. For all further experiments we used ten 30 s cycles of sonication.

As seen in Figure 2, elongation curve, observed using 10% of sonicated seeds, shows a very good fit with Michaelis-Menten equation ($r^2_{adj} > 0.999$). To ensure reliability of the fit, we tested errors of fitted v_{max} and K_M values for a number of samples within the same batch preparation, and for several different batches. In

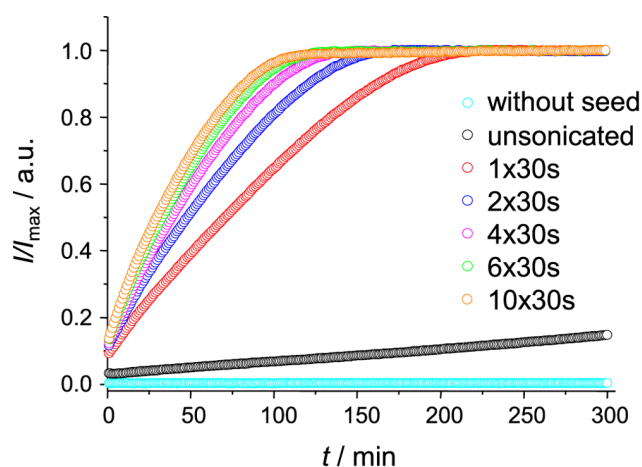


Figure 1. Influence of sonication. Different number of 30 s pulses were applied to fibrils before using them as seeds. Kinetics of elongation followed by Thioflavin T (ThT) fluorescence assay. doi:10.1371/journal.pone.0068684.g001

all repeats fitting errors were lower than 5%. Distribution of v_{max} and K_M values within repeated experiments of the same batch preparation was very even, not exceeding fitting errors. The data looks much more scattered when different batches are compared (Table 1). Fluctuations of v_{max} should be attributed to uneven number of fibril ends within each batch. It happens mostly due to the stochastic nature of spontaneous fibril formation. Although sonication helps to homogenize the sample, fibril lengths still may slightly differ from sample to sample. After sonication short pieces of fibrils tend to get together spontaneously (Figure 3), which is an additional factor for the differences between batches. It is clear that random events in preparation of seeds are way more important for the repeatability of v_{max} values than possible events during measurement of elongation kinetics and fitting errors. It is more problematic to explain differences in K_M values. There is no direct correlation in fluctuations of K_M and v_{max} values between batches, which means no major differences in FM complex maturation rate. Thus the only valid guess would be shift of the equilibrium of FM complex formation. But such event also hardly explainable. It means the main responsibility for uncertain K_M values goes to the measurement of kinetics and to the fitting. As theoretically Michaelis constant should be independent on batch preparation, we tried to increase precision of obtained K_M values by doing a global fit of all measurements with shared K_M . Correlation of the global fit was similar to independent fits ($r^2_{adj} > 0.999$). Obtained K_M and v_{max} values fits average K_M and v_{max} values obtained through independent fits (Table 1). It seems global fit does not significantly change the meaning of the data, but give more fine tuning of fitted values leading to better precision.

For an additional test, we added the same amount of seeds to different concentrations of insulin solution and used Lineweaver-Burk plot as a traditional approach to determine K_M and v_{max} . As seen in figure 4, $1/v$ dependence on $1/S$ is linear and determined K_M and v_{max} are comparable to the values, obtained by curve fitting.

Table 1. Fitted K_M and v_{max} values.

batch ^a	without NaCl		with 100 mM NaCl	
	K_M [μ m]	v_{max} [μ m/min]	K_M [μ m]	v_{max} [μ m/min]
1	331.84 \pm 4.87 ^c	22.30 \pm 0.23	98.45 \pm 4.68	20.23 \pm 0.35
2	260.29 \pm 13.47	11.70 \pm 0.22	59.26 \pm 1.65	13.17 \pm 0.19
3	249.77 \pm 7.31	15.94 \pm 0.24	58.86 \pm 4.47	14.90 \pm 0.14
4	438.26 \pm 22.12	20.79 \pm 0.66	185.95 \pm 8.73	20.60 \pm 0.48
5	246.22 \pm 6.09	15.60 \pm 0.18	72.55 \pm 2.17	16.33 \pm 0.30
6	289.68 \pm 5.77	22.48 \pm 0.36	131.01 \pm 7.38	25.45 \pm 1.01
7	279.88 \pm 8.79	17.49 \pm 0.26	78.56 \pm 7.01	20.49 \pm 0.74
8	316.10 \pm 4.88	20.35 \pm 0.18	98.74 \pm 3.73	21.49 \pm 0.27
9	276.95 \pm 9.58	15.00 \pm 0.23	71.36 \pm 2.56	16.81 \pm 0.15
average	298.80 \pm 45.80	17.96 \pm 2.86	94.97 \pm 31.59	18.83 \pm 2.93
^b global fit	268.28 \pm 4.50	17.26 \pm 2.06	79.77 \pm 3.05	17.074 \pm 1.77

^aPreparation and measurement of batches 1–5 and 6–9 were done by different persons.

^bfit with shared K_M .

^cstandard errors for all data were calculated using Student's t-distribution at $P = 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0068684.t001

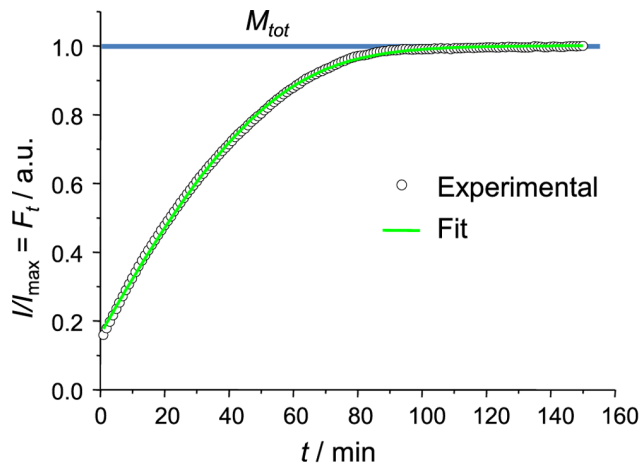


Figure 2. Insulin fibril elongation kinetics - experimental data and fitted curve. The curve reaches the plateau when all insulin is converted to fibrils ($F_t = M_{tot}$).
doi:10.1371/journal.pone.0068684.g002

As it is well known, the presence of NaCl may affect kinetics [5] and even mechanism [18] of insulin amyloid-like fibril formation. To get data for an additional test of enzyme-like elongation model we did parallel seeding experiments in the presence of 100 mM NaCl using the same batch seed preparations. Data curves were a bit worse quality when compared to the ones without salt due to a slow drift of data points after reaching plateau (Figure 5). Nevertheless it had only minor effect on the quality of the fit ($r_{adj}^2 > 0.996$). Fitting data revealed no major differences in v_{max} values between samples with and without NaCl. It means rate of FM complex maturation into longer fibril is not affected by ionic strength. K_M values in the presence of NaCl is ~ 3 times lower than in the absence of salt. It means shift of the equilibrium towards FM complex formation. It is an expectable event: at low pH insulin molecules are positively charged so fibril-monomer electrostatic interactions are not favourable, while increase of ionic strength of the environment lowers impact of charge and increase the rate of fibril-monomer association.

We demonstrated that Michaelis-Menten enzyme-like kinetics can be a very good model to describe fibril elongation when experimental conditions minimize events of primary and secondary nucleation. By comparing a number of batches we showed possible errors when relying on the single experiment and an increase of precision when all repeats are used together. Finally, analysis of experimental fibril elongation data using Michaelis-Menten equation can better explain impact of environmental conditions. The advantage of such approach is ability to study elongation almost independently from other events, such as nucleation, termination or fragmentation. Any of these events affects the number of fibril ends, which leads to substrate-concentration-independent changes of elongation rate. In such case v_{max} becomes variable, which means that a good fit using Michaelis-Menten equation is very unlikely. From the other side, the same reason makes the application of this approach rather narrow. Nevertheless, in light of possible generic nature of amyloid-like fibrils [1] and an emerging idea of prion-like nature of amyloid fibrils [19–23] a simple model with clearly defined variables has a chance to evolve into a tool for classification of amyloid-like fibrils by their elongation potential at different conditions (which at some point may evolve to “infectivity potential”).

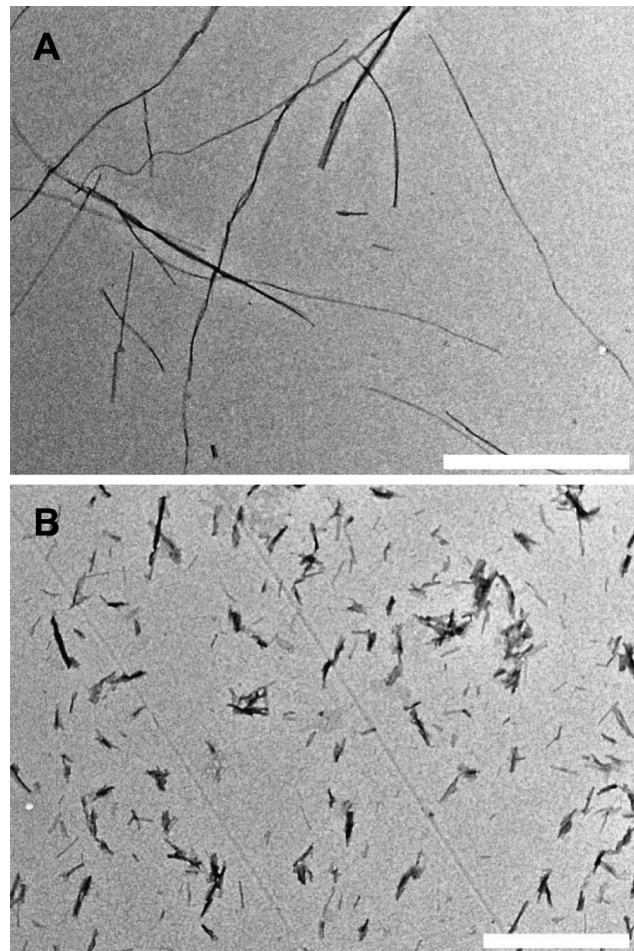


Figure 3. Transmission electron microscopy images. Spontaneously formed insulin amyloid-like fibrils before (A) and after (B) ten 30 s pulses of sonication (bar 1 μm).
doi:10.1371/journal.pone.0068684.g003

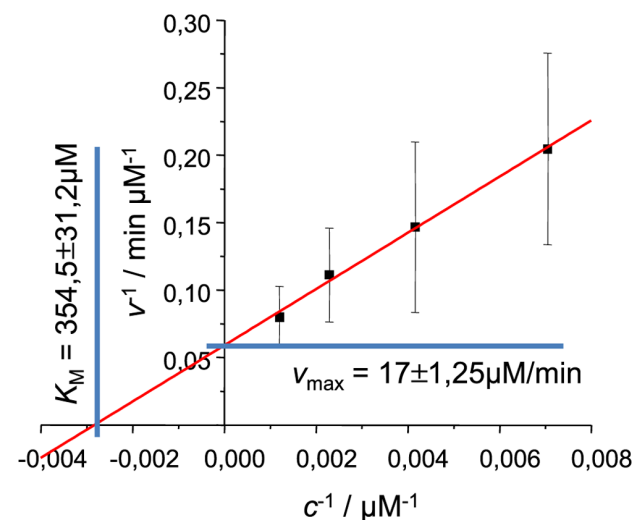


Figure 4. Lineweaver-Burk plot for fibril elongation. Rates of elongation were measured at the point $F_t = M_{tot}/2$, errors of elongation rates were estimated using the data from 5 different batches of seeds.
doi:10.1371/journal.pone.0068684.g004

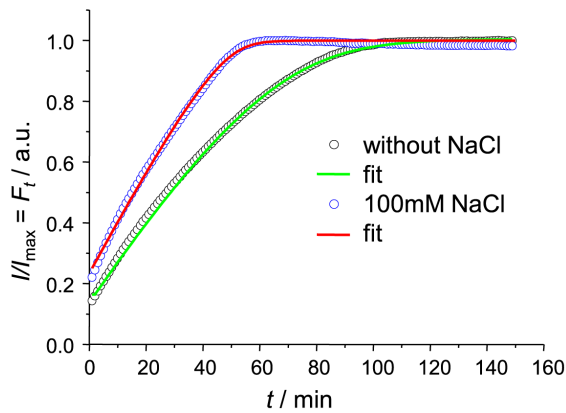


Figure 5. Comparison of insulin fibril elongation kinetics in absence and presence of 100 mM NaCl.
doi:10.1371/journal.pone.0068684.g005

Materials and Methods

Recombinant human insulin was purchased from Sigma Aldrich (91077C). Insulin amyloid-like fibrils were prepared by incubation of fresh 5 mg/ml insulin solution (in 100 mM phosphate buffer (PB), pH2; prepared in secure lock tubes, Fisher Scientific UK, (FB74071)) at 60°C for 24 hours with 300 rpm agitation (using MHR 23 thermomixer, Dtabis, Germany). To homogenize aggregated material and maximize concentration of fibril ends, fibrils were subjected to ultrasonic treatment. 1 ml of fibrils were put into 2 ml tube and homogenized for 10 minutes using Bandelin Sonopuls 3100 ultrasonic homogenizer equipped with MS73 tip (using 50% of power, cycles of 30 s/30 s sonication/rest, total energy applied to the sample per cycle ~ 0.56 kJ). The sample was kept on ice during the sonication. Right after the treatment, 1 part of the fibrils were mixed with 9 parts of the fresh 5 mg/ml (to obtain Lineweaver-Burk plot 10, 2.5, and 1.25 mg/ml were also used) insulin solution (100 mM PB, pH2, with or without 100 mM NaCl), containing 50 mM Thioflavin T

References

- Chiti F, Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75: 333–66.
- Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomenighi G, Fändrich M (2005) The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein Sci* 14: 1753–9.
- Foderà V, Librizzi F, Groenning M, van de Weert M, Leone M (2008) Secondary nucleation and accessible surface in insulin amyloid fibril formation. *J Phys Chem B* 112: 3853–8.
- Naiki H, Gejyo F (1999) Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Method Enzymol* 309: 305–18.
- Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, et al. (2001) Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* 40: 6036–46.
- Esler WP, Stimson ER, Ghilardi JR, Vinters HV, Lec JP, et al. (1996) In vitro growth of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques displays first-order kinetics. *Biochemistry* 35: 749–57.
- Naiki H, Hashimoto N, Suzuki S, Kimura H (1997) Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* 232: 223–232.
- Cannon MJ, Williams AD, Wetzel R, Myszka DG (2004) Kinetic analysis of beta-amyloid fibril elongation. *Anal Biochem* 328: 67–75.
- Xue WF, Homans SW, Radford SE (2008) Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *P Natl Acad Sci USA* 105: 8926–31.
- Knowles TPJ, Waudby Ca, Devlin GL, Cohen SIA, Aguzzi A, et al. (2009) An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* 326: 1533–7.
- Cohen SIA, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TPJ (2011) Nucleated polymerisation in the presence of pre-formed seed filaments. *Int J Mol Sci* 12: 5844–52.
- Chatani E, Ohnishi R, Konuma T, Sakurai K, Naiki H, et al. (2010) Pre-steady-state kinetic analysis of the elongation of amyloid fibrils of beta(2)-microglobulin with tryptophan mutagenesis. *J Mol Biol* 400: 1057–66.
- Scheibel T, Bloom J, Lindquist SL (2004) The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion. *P Natl Acad Sci USA* 101: 2287–92.
- Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, et al. (2000) Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289: 1317–21.
- Chatani E, Lec YH, Yagi H, Yoshimura Y, Naiki H, et al. (2009) Ultrasonication-dependent production and breakdown lead to minimum-sized amyloid fibrils. *P Natl Acad Sci USA* 106: 11119–24.
- Dzwolak W, Smirnovas V, Jansen R, Winter R (2004) Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner: an FT-IR spectroscopic study. *Protein Sci* 13: 1927–32.
- Saborio GP, Permanne B, Spagnolo S (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810–3.
- Smirnovas V, Winter R (2008) Revealing different aggregation pathways of amyloidogenic proteins by ultrasound velocimetry. *Biophys J* 94: 3241–6.
- Westermarck GT, Westermarck P (2010) Prion-like aggregates: infectious agents in human disease. *Trends Mol Med* 16: 501–7.
- Brundin P, Melki R, Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Bio* 11: 301–7.
- Eisele YS, Obermüller U, Heilbronner G, Baumann F, Kaeser Sa, et al. (2010) Peripherally Applied A{beta}-Containing Inoculates Induce Cerebral {beta}-Amyloidosis. *Science* 980: 10–13.
- Frost B, Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 11: 155–9.
- Lee SJ, Desplats P, Sigurdson C, Tsigelny I, Masliah E (2010) Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. *Nat Rev Neurol* 6: 702–706.

(ThT). Each batch was divided into 20 ml aliquots (in 200 ml thin-wall PCR tubes). Elongation kinetics was measured at constant 37°C temperature using Corbett Rotor-Gene 6000 real-time analyzer. Increase of ThT fluorescence intensity upon fibril formation was observed using green channel (excitation 470 nm; emission 510 nm). Data was collected for up to 900 minutes, taking reads every minute.

ThT fluorescence curves were normalized by dividing each point by the maximum intensity of the curve. Assuming ThT fluorescence curves represent change of fibril mass in time, the fitting equation looks like:

$$F_{t+i} = F_t + \frac{v_{max}(M_{tot} - F_t)}{K_M + (M_{tot} - F_t)} i \quad (4)$$

where F_t is fibrillated protein concentration at time t , F_{t+i} - fibrillated protein concentration at time $t+i$, i - iteration time interval, and M_{tot} is the total protein concentration. There are 4 constants (v_{max} , K_M , F_0 , and M_{tot}), which can be fitted using least square method. Figure 2 shows a fit of our experimental data using 1 minute iteration interval (same as our data spacing). Direct curve fit gives values of the constants in arbitrary units. As M_{tot} used in our experiments is known (5 mg/ml), other constants can be converted from arbitrary units to real units using the same proportion. Fitting was performed using Origin 8 software.

For electron microscopy 3 μ l of 20 times diluted (with water) samples were applied on formvar/carbon coated 300 mesh copper grids (Agar scientific) for 1 minute. Staining was performed by applying 3 μ l of 2% uranyl acetate aqueous solution for 30 seconds. Images were acquired using FEI Morgagni 268 microscope.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VS. Performed the experiments: KM AB. Analyzed the data: VS. Contributed reagents/materials/analysis tools: VS. Wrote the paper: VS.