



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Fausta Labanauskaitė

**INSULINO AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ SUSIDARYMO
TERMODINAMIKOS TYRIMAS**

**THERMODYNAMICS OF INSULIN AMYLOID-LIKE FIBRIL
FORMATION**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

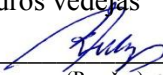
Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijų studijų kryptis

Vilnius, 2014

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas



(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

Fausta Labanauskaitė

**INSULINO AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ SUSIDARYMO
TERMODINAMIKOS TYRIMAS**

**THERMODYNAMICS OF INSULIN AMYLOID-LIKE FIBRIL
FORMATION**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijų studijų kryptis

Vadovas dr. Vytautas Smirnovas

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)



(Parašas)

2014 05 22

(Data)

Konsultantas lekt. Ričardas Mališauskas

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)



(Parašas)

2014 05 22

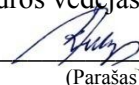
(Data)

Vilnius, 2014

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijų studijų kryptis
Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

TVIRTINU
Katedros vedėjas



(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO (PROJEKTO)
UŽDUOTIS**

.....Nr.
Vilnius

Studentei: **Faustai Labanauskaitei**

Baigiamojo darbo (projekto) tema: **Insulino amiloidinių fibrilių susidarymo termodinamikos tyrimas**

patvirtinta 2013 m. spalio mėn. 24 d. dekanų potvarkiu Nr. 363fm

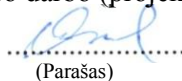
Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2014 m. birželio 2 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

Ištirti spontaninės agregacijos ir fibrilių ilgėjimo termodinamiką, esant skirtingoms sąlygoms.

Baigiamojo bakalauro darbo (projekto) konsultantas: lekt. Ričardas Mališauskas

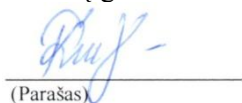
Vadovas



(Parašas)

dr. Vytautas Smirnovas

Užduotį gavau



(Parašas)

Fausta Labanauskaitė

.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-....-....

Pirmosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas 3

Pavadinimas **Insulino amiloidinių fibrilių susidarymo termodinamikos tyrimas**

Autorius **Fausta Labanauskaitė**

Vadovas **dr. Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Įvairios neurodegeneracinės ir prioninės ligos yra susijusios su amiloidinių fibrilių formavimusi. Amiloidiniai agregatai gali būti aptinkami labai įvairiuose audiniuose. Jie gali būti dideli ir apimti visą organą arba smulkūs ir dažnai pasikartojantys, kaip Alzheimerio ligos atveju. Amiloidinių fibrilių formavimasis yra fizinis procesas, kurio metu nenatyvios formos baltymo molekulės sąveikauja tarpusavyje ir sudaro linijinius, biologiškai neaktyvius agregatus. Procesą charakterizuoja termodinaminiai parametrai, tokie kaip laisvosios energijos barjeras, kurį baltymas turi įveikti, jog iš tirpios būsenos pavirstų į netirpią fibrilinę bei entalpinis ir entropinis indėliai į šią energiją.

Šiame darbe buvo tiriama insulino amiloidinių fibrilių susidarymo termodinamika skirtingomis sąlygomis. Nors insulinas yra genetiškai toli nuo baltymų, susijusių su patalogine agregacija *in vivo*, tačiau yra gerai išstudijuotas fibriles formuojantis baltymas. Jo agregacija buvo stebima ThT fluorescencinės spektroskopijos metodu.

Buvo atlikti spontantinės agregacijos tyrimai, patikrintas įvairių fibrilių stabilumas, užrašyti jų infraraudonieji spektrai, atlikti fibrilių ilgėjimo tyrimai skirtingose sąlygose, apskaičiuotos aktyvacijos energijos.

Nustatyta, kad stabiliausias fibrilės susidaro 20 % acto rūgšties tirpale, 20 % acto rūgšties ir 100 mM NaCl tirpale bei 20 % etanolio ir 100 mM NaCl tirpale. Spontantinės agregacijos duomenys parodė, kad didžiausias energijos kiekis fibrilizacijai pradėti reikalingas insulino tirpalui su 100 mM NaCl. Sėjimo eksperimentai parodė, jog nepriklausomai nuo baltymo koncentracijos, reakcija yra limituojama vienodo energetinio barjero, o įvairūs priedai aktyvacijos energiją sumažina.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis 37 p. teksto be priedų, 16 paveikslų, 7 lentelės, 21 bibliografinis šaltinis.

Prasminiai žodžiai: Agregacija, aktyvacijos energija, amiloidas, insulinas, termodinamika, tioflavinas T.

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-....-....

Bachelor Degree Studies **Bioengineering** study program Final Thesis 3

Title **Thermodynamics of Insulin Amyloid-Like Fibril Formation**

Author **Fausta Labanauskaitė**

Academic supervisor **dr. Vytautas Smirnovas**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Deposition of amyloid fibrils is associated with a variety of neurodegenerative diseases, and prion diseases. The deposits can be found in a variety of tissue. They can be large and transform a whole organ, or small but multiple as in the case of Alzheimer's disease. Formation of fibrils is a physical process in which non-native protein molecules interact with each other to form linear, biologically inactive aggregates. Fibril elongation is characterized by thermodynamic parameters, such as the free energy barrier which a protein has to overcome to transform from its solvated structure into the fibrillar state and the corresponding enthalpic and entropic contributions to this energy.

In this work was investigated thermodynamics of insulin amyloid-like fibril formation in different conditions. Insulin is genetically distant from proteins associated with aggregation in vivo, but it is a well-studied fibril-forming protein in vitro. Aggregation of insulin was observed using the fluorescence spectroscopy method.

In this work experiments of spontaneous aggregation and fibril elongation in different conditions were carried out, the stability of different fibrils was checked, infrared spectra were measured, activation energies were calculated.

It was observed, that the most stable fibrils are in 20 % of acetic acid, in mixture of 20 % of acetic acid and 100 mM NaCl, and in mixture of 20 % of ethanol and 100 mM NaCl. Data of spontaneous aggregation showed, that the maximum amount of energy is needed for insulin solution with 100 mM NaCl. Seeding experiments have shown, that, independent of protein concentration, the aggregation reaction is limited by the same energy barrier. Various supplements decrease the activation energy.

Structure: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions and references.

Thesis consists of: 37 p. of text without appendixes, 16 pictures, 7 tables, and 21 bibliographical entries.

Keywords: Activation energy, aggregation, amyloid, insulin, thermodynamic, thioflavin T.

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Fausta Labanauskaitė, 20102198

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, Bif-10

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2014 m. gegužės 14 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Insulino amiloidinių fibrilių susidarymo termodinamikos tyrimas“ patvirtintas 2013 m. spalio 24 d. dekanu potvarkiu Nr. 363fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: Ričardas Mališauskas. Mano darbo vadovas Vytautas Smirnovas.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjusi.



(Parašas)

Fausta Labanauskaitė
(Vardas ir pavardė)

Turinys

ĮVADAS.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	9
1.1. Kas yra amiloidai?	9
1.2. Galimas pernašos mechanizmas – fibrilių ilgėjimas (elongacija).....	10
1.3. Amiloidinių fibrilių ilgėjimo termodinamika	12
1.4. Insulinas, kaip amiloidinių fibrilių tyrimų modelis	15
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	16
2.1. Naudoti reagentai	16
2.2. Naudota laboratorinė įranga.....	16
2.3. Metodai	16
2.3.1. Fluorescencijos matavimas.....	16
2.3.2. Amiloidinių fibrilių ruošimas	17
2.3.3. Elektroninės mikroskopijos mėginiai	18
2.3.4. Fibrilių stabilumo tyrimas	18
2.3.5. Mėginių ruošimas FT-IR spektroskopijai.....	19
2.3.6. Reakcijos mišinių ruošimas.....	20
2.3.7. Duomenų analizė.....	22
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	25
3.1. Spontantinės agregacijos tyrimas.....	25
3.2. Amiloidinių fibrilių stabilumo tyrimas	27
3.3. FT-IR spektroskopijos tyrimas	29
3.4. Fibrilių ilgėjimo tyrimai.....	30
3.4.1. Aktyvacijos energijos priklausomybės nuo baltymo koncentracijos tyrimas	30
3.4.2. Fibrilių ilgėjimo skirtingomis sąlygomis tyrimas	31
IŠVADOS	35
LITERATŪRA.....	36

IVADAS

Neurodegeneracinės ligos, kaip Alzheimerio ar Parkinsono, bei prioninės ligos yra siejamos su amiloidinių fibrilių formavimusi. Nepaisant ligų skirtumų, visi amiloidiniai agregatai pasižymi panašia morfologija – sudaryti iš pasikartojančių β -klosčių, išsidėsčiusių statmenai fibrilės ašiai, yra ne šakotos struktūros, maždaug 10 nm pločio ir 0,1–10 μm ilgio (Zhang *et al.* 2009). Manoma, kad beveik visi baltymai ir peptidai gali agreguoti į fibrilinius agregatus, nuo netvarkingų amorfinių agregatų iki labai tvarkingų β -klostytų struktūrų (Chiti *et al.* 2006).

Kaip ir kiekvieną reakciją, amiloidinių fibrilių susidarymą charakterizuoja kinetiniai ir termodinaminiai parametrai. Tačiau iki šiol nėra tiksliai žinoma, kodėl susidaro amiloidinės fibrilės, kokios sąlygos tai lemia. Ne viename straipsnyje galime rasti diskusijų šia tema, tačiau tikslios informacijos mažai. Tad šio darbo metu bus bandoma pasiaiškinti, kokie termodinaminiai parametrai veikia baltymo amiloidinių fibrilių susidarymą skirtingomis sąlygomis.

Darbo metu buvo naudotas rekombinantinis žmogaus insulinas. Nors šis baltymas nėra susijęs su agregacija *in vivo*, tačiau jis yra puikus modelinis baltymas. Insulinas lengvai formuoja amiloidines fibriles *in vitro*, yra gerai ištirtas baltymas, taip pat yra plačiai naudojamas mūsų laboratorijoje.

Darbo tikslas – ištirti insulino amiloidinių fibrilių susidarymo termodinamiką.

Darbui keliami uždaviniai:

1. Atlikti spontantinės agregacijos bandymus įvairiomis sąlygomis.
2. Naudojant denatūracijos ir infraraudonosios spektroskopijos metodus, nustatyti skirtingomis sąlygomis spontaniškai susidariusių fibrilių stabilumą.
3. Atlikti fibrilių ilgėjimo bandymus įvairiomis sąlygomis.
4. Apdoroti duomenis ir aprašyti termodinامينius parametrus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kas yra amiloidai?

Terminas „amiloidas“ pirmą kartą buvo pavartotas 1854 metais vokiečių mokslininko Rudolfo Virchovo (*angl.* Rudolph Virchow). Naudodamasis tų metų geriausia mokslinė metodologija ir medicinos žiniomis, Virchovas jodu dažė keistos išvaizdos iš smegenų išskirtus mėginius. Pastebėjęs, kad mėginius paveikus jodu, jie nusidažo mėlyna spalva, o sieros rūgštimi – violetine, Virchovas nusprendė, jog tai celiuliozė ir davė jiems amiloido pavadinimą. Šis terminas kilęs iš lotynų kalbos žodžio *amylum* ir graikų kalbos žodžio *amylon*, kurie reiškia krakmolą. 1859 metais Fridrichas (*angl.* Friedreich) ir Kekulė (*angl.* Kekule) remiantis didele azoto koncentracija amiloiduose, padarė išvadą, jog ši masė yra baltymai, o angliavandenių nėra, kaip galvota iki šiol. Tuomet į amiloidus buvo pradėta žiūrėti kaip į baltymus, o vėliau kaip į baltymų klasę, kuri turi polinkį kisti ir formuoti fibriles (Sipe *et al.* 2000).

Laikui bėgant supratimas apie amiloidų struktūrą kito, priklausomai nuo technologijų. Mokslininkai pradėjo naudoti šviesinį mikroskopą ir histologinius dažus, tokius kaip tioflavinas T ar Kongo raudonasis. Iš pradžių manyta, kad amiloidai nepasižymi bendromis struktūrinėmis savybėmis, tačiau vėlesni tyrimai poliarizuotos šviesos mikroskopu parodė, kad nedažytų ir dažytų amiloidų sankaupos skirtingose audiniuose lemia dvejopą šviesos lūžį. Taigi, dažymas Kongo raudonuoją perteikia anizotropiją, būdingą dvejopam šviesos lūžiui, kuris parodo amiloidines fibriles *in situ*. Taip pirmuoju amiloidų požymiu tapo obuolio žalumo dvejopas šviesos lūžis – kongofilija (*angl.* congophilia). Remiantis šiuo principu ir naudojant elektroninį mikroskopą, Kohenas (*angl.* Cohen) su kolegomis 1959 metais pademonstravo, kad visi jų tirti amiloidai turi panašią ultrastruktūrą. O 1982 metais Kohenas su kolegomis patvirtino, kad skirtingos kilmės amiloidiniai dariniai turi panašią submikroskopinę struktūrą: tiesių ir standžių fibrilių pluoštų plotis svyruoja nuo 60 iki 130 Å (vidutiniškai 75–100 Å), o ilgis nuo 1000 iki 16000 Å. Šis požymis buvo priimtas kaip amiloidinių fibrilių apibūdinimo kriterijus. (Sipe *et al.* 2000).

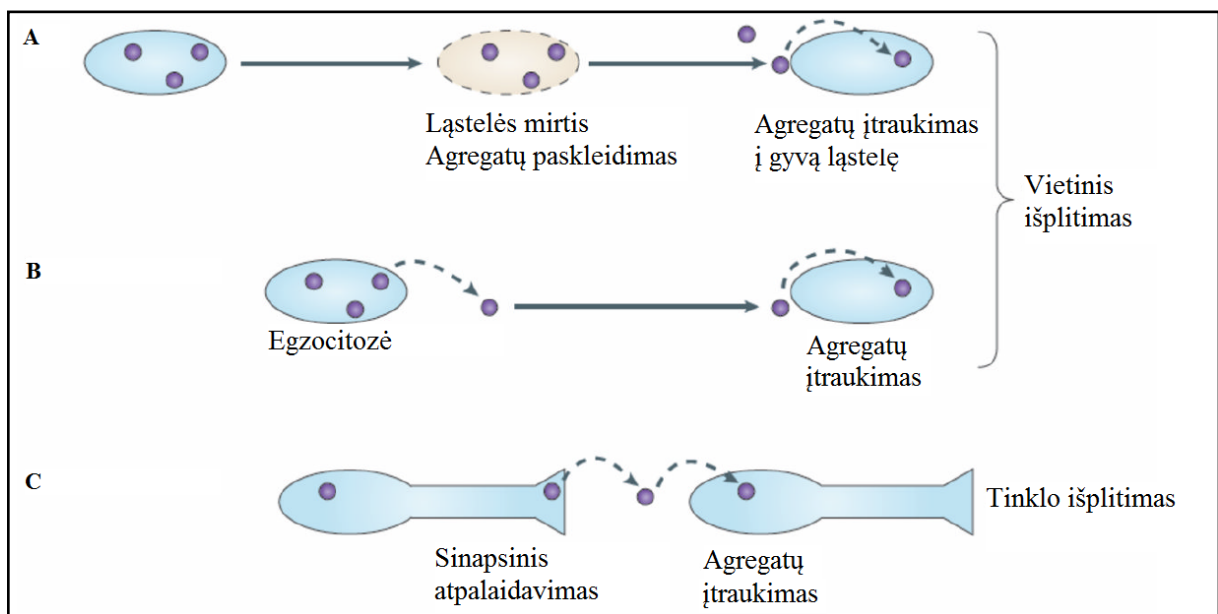
Pastarasis kriterijus laikui bėgant kito, nes daugėjo žinių, įgūdžių. Pradžioje Kohenas su kolegomis teigė, kad žmonių ir gyvūnų amiloidai turi „suvertą“ struktūrą. Gueftas (*angl.* Gueft) ir Gidonis (*angl.* Ghidoni) (1963 m.) pasiūlė, kad amiloidinės fibrilės yra dvigubos su tarpfibriline ertme (25 Å). Teris (*angl.* Terry) su kolegomis 1964 m. pareiškė, kad fibrilės yra 70–90 Å pločio ir turi trigubą tankumą su tuščiaviduriu centru. Galiausiai, Širahama (*angl.* Shirahama) ir Kohenas 1967 m. atliko išsamius didelės skiriamosios gebos amiloidinių fibrilių tyrimus audiniuose, ir, remiantis gautais duomenimis anksčiau ir dabar, buvo aprašyta amiloidinių fibrilių struktūra, kurią

sudarė du požymiai. Pirma, subvienetai yra sudaryti iš 25–35 Å skersmens ir 75–100 Å ilgio amiloidinių fibrilių. Antra, du ar daugiau tokių subvienetų, kurie kartkartėmis vienas kitą apsideja, sudaro amiloidines fibriles *in situ* (Sipe *et al.* 2000).

1.2. Galimas pernašos mechanizmas – fibrilių ilgėjimas (elongacija)

Amiloidiniai agregatai yra aptinkami labai įvairiuose audiniuose. Jie gali būti dideli ir apimti visą organą, ar smulkūs ir dažnai pasikartojantys, kaip Alzheimerio ligos atveju. Taip pat yra žinoma, kad keletas neurodegeneracinių ligų, pavyzdžiui, Creutzfeldt-Jakob liga, yra sukeltos dėl netaisyklingai susilanksčiusių ar suagregavusių prioninių baltymų (Westermarck *et al.* 2010). Prionai yra baltymai, kurie egzistuoja keliose funkciškai skirtingose konformacijose, iš kurių bent viena savarankiškai dauginasi. Dažniausiai savarankiškai besidauginanti forma yra β -klostytos struktūros amiloidai, kuriuose beta klostės išsidėsčiusios statmenai fibrilės ašiai (Aguzzi *et al.* 2009, Cushman *et al.* 2010). Įdomi prioninių agregatų savybė yra kurti sutrikimus su skirtingais fenotipais (įtraukiant tiek centrinę, tiek periferinę nervų sistemą, skirtingą ligos eigą bei prioninio baltymo geno mutacijas). Tai siejama su nedideliais skirtumais, atsirandančiais fibrilinių agregatų susidarymo metu. Šie skirtumų turintys agregatai yra vienodai užkrečiami ir žinomi kaip kamienai, kurie gali būti perduodami nuo vieno organizmo kitam, tad prioninės ligos yra užkrečiamos (Frost *et al.* 2010, Westermarck *et al.* 2010). Dėl didelio beta klostytos priono formos stabilumo, fibriliniai agregatai yra atsparūs detergentams, proteazėms, denatūruojančiam karščiui, gali būti aptinkami organizmo skysčiuose ar kraujyje bei išgyvena virškinamajame trakte (Cushman *et al.* 2010).

Yra manoma, kad ne tik prioninės, bet ir kitos ligos, susijusios su amiloidiniais agregatais, gali būti užkrečiamos-pernešamo iš vienos ląstelės į kitą (Westermarck *et al.* 2010). Vis daugiau eksperimentinių įrodymų siūlo, kad tarpląstelinio priono dauginimosi mechanizmas gali būti taikomas įvairių baltymų patologijai. Tokiame modelyje (1 pav.) fibriliniai baltymai – sėkla – iš gretimų arba sinapsėmis sujungtų ląstelių gali būti įsiurbiami ir sukelti natyvių baltymų agregaciją ląstelėje. Šis modelis gali paaiškinti tiek pastebėtą fenotipų įvairovę pavienėse neurodegeneracinėse ligose, tiek nesustabdomą ligos plitimą, kurio metu agregatai sugeba judėti tarp ląstelių ir sukelti aplinkinių baltymų agregaciją. Jis taip pat gali paaiškinti neuronų tinklų dalyvavimą neurodegeneracijoje. Tad dabartiniai tyrimai plačiai paplitusioms ir neužkrečiamoms neurodegeneracinėms ligoms, tokioms kaip Alzheimerio ar Parkinsono, vis labiau taiko „prione-like“ dauginimosi mechanizmą (Aguzzi *et al.* 2009, Frost *et al.* 2010).



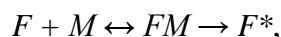
1 pav. Amiloidų tarpląstelinio plitimo mechanizmas. (A) Ląstelių baltymų agregacija lemia ląstelės žūtį. Tuomet agregatai pasklinda tarpląstelinėje erdvėje, o vėliau įtraukiami į gyvybingą ląstelę. (B) Kaip gyvos ląstelės dalis, fibriliniai agregatai gali būti atpalaiduojami per egzosomas ar egzocitozės būdą. Taip tarpląstelinėje erdvėje pasklinda amiloidai, kurie vėliau gali būti įtraukiami gretimų ląstelių. Šie du būdai gali būti vietinio amiloidų išplitimo priežastis. (C) Agregatai gali pažeisti sinapsę. Atpalaidavimas gali įvykti dėl sinapsės vietinės degeneracijos, normalios sinapsinės fiziologijos ar egzocitozės būdu kaip (B) variante. Šis variantas gali paaiškinti tinklo degeneraciją neurodegeneracinėse ligose (pritaikyta iš Frost *et al.* 2010).

Kaip jau minėta, amiloidai gali ne tik plisti tarpląstelinio keliu, jie gali būti užkrečiami, t. y., į sveiką ląstelę patekę amiloidiniai agregatai gali inicijuoti natyvių baltymų agregaciją. Amiloidinių fibrilių formavimas yra fizinis procesas, kurio metu nenatvyvios formos baltymo molekulės sąveikauja tarpusavyje ir sudaro linijinius, biologiškai neaktyvius agregatus (Nielsen *et al.* 2001). Procesas siejamas su baltymų oligomerų susidarymu, branduolių susidarymu, linijinių agregatų ilgėjimu bei linijinių agregatų sulipimu į didesnes sancaupas, tačiau skiriami trys pagrindiniai agregacijos žingsniai: branduolių formavimas, fibrilių ilgėjimas (elongacija), stambesnių agregatų susidarymas (Mauro *et al.* 2006, Nielsen *et al.* 2001).

Tipinis amiloidogenezės procesas prasideda *lag* faze, kurios metu formuojasi branduoliai, o amiloidų virtimas fibrilėmis nėra pakankamai žymus, kad būtų aptinkamas (Lee *et al.* 2007). Šioje fazėje branduolių susidarymu yra laikomas kelių monomerų susijungimas į organizuotą struktūrą – fibrilių pirmtaką. Po to monomerams besijungiant prie branduolių, procesas perauga į elongaciją, kurioje greitai didėja fibrilių koncentracija (Lee *et al.* 2007, Nielsen *et al.* 2001). Elongacijos fazėje bet kokie agregatai, didesni už branduolį, virsta fibrile. Jai besiformuojant, galai atlieka branduolių vaidmenį ir reakcija vyksta tol, kol tirpale nebelieka branduolių, o visas baltymas

pavirsta į fibrilinius agregatus. *Lag* fazės ilgis ir fibrilių augimo greitis priklauso nuo tokių veiksnių kaip pradinė koncentracija ar pH (Lee *et al.* 2007).

Į tirpalą pridėjus sėklos, sutrumpinama fibrilizacijos *lag* fazė, o pati sėkla atlieka katalitinį vaidmenį – indukuoja baltymų konformacinius pokyčius ir pagreitina pačia reakciją (Lee *et al.* 2007). Buvo pastebėta, jog esant tokioms sąlygoms, fibrilių ilgėjimas yra labai panašus į fermentinę reakciją, net kai analizei naudojama *Michaelis-Menten* lygtis. Tokiu atveju, fibrilių augantys galai atlieka fermento aktyviojo centro vaidmenį, o monomerai – substrato vaidmenį. Tad naudojant *Michaelis-Menten* lygtį, kaip geriausiai žinomą fermentinės kinetikos modelį, fibrilių ilgėjimas gali būti užrašomas taip:



kur *F* – fibrilė, *M* – monomeras, *F** – ilgesnė fibrilė, o *FM* – trumpą laiką egzistuojantis kompleksas, kuris gali būti aptinkamas nuo prisijungimo prie fibrilės momento iki pilno įsitraukimo į fibrilę (Milton *et al.* 2013).

1.3. Amiloidinių fibrilių ilgėjimo termodinamika

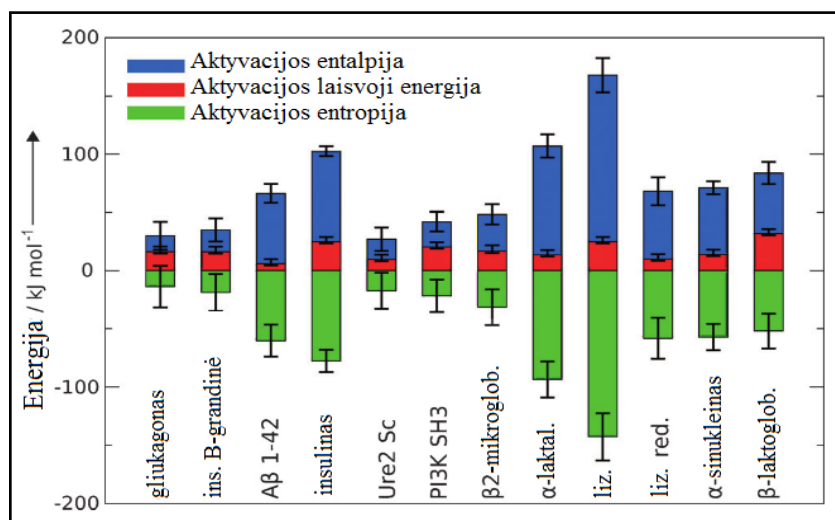
Fibrilių elongaciją charakterizuoja termodinaminiai parametrai, tokie kaip laisvosios energijos barjeras, kurį baltymas turi įveikti, jog iš tirpios būsenos pavirstų į netirpią fibrilinę bei entalpinis ir entropinis indėliai į šią energiją. Toks procesas yra entropiškai palankus, bet entalpiškai nepalankus. Naudojant skirtingus peptidus buvo gauti panašūs duomenys, o tai galėtų būti bendras baltymų agregacijos bruožas (Knowles *et al.* 2007).

Amiloidogenezės termodinamika nėra pilnai ištyrinėta sritis, o informacijos daugiausiai buvo galima rasti viename šaltinyje (Buell *at al.* 2012). Mokslininkai savo darbe aprašė daugiau kaip dešimties skirtingų baltymų termodinaminius parametrus (1 lentelė, 2 pav.). Jų gauti duomenys rodo, kad aktyvacijos entalpijos visais atvejais yra nepalankios, o aktyvacijos entropijos palankios. Todėl daugelio tirpale esančių reakcijų charakteristikai tinka entalpijos–entropijos kompensacijos reiškinys (Buell *at al.* 2012).

1 lentelė. Termodinaminių parametų suvestinė. Duomenys nustatyti eksperimentų metu, kartu su papildomais duomenimis, imtais iš literatūros (pritaikyta iš Buell *et al.* 2012).

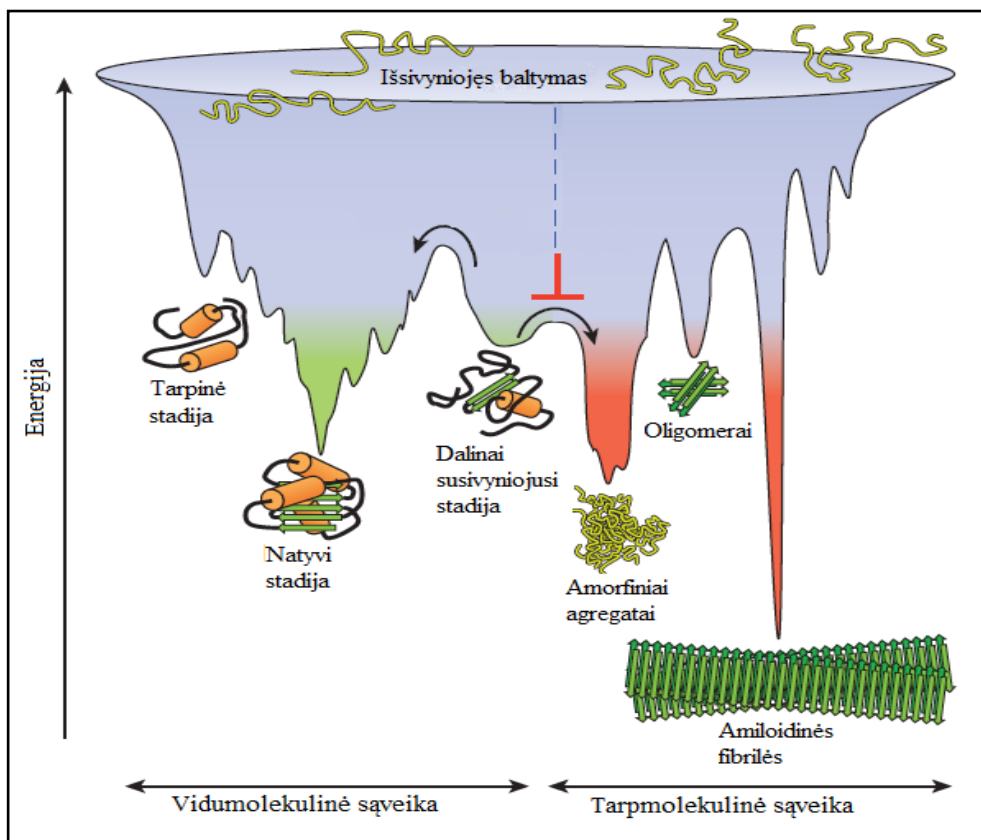
Baltymas	ΔG^* [kJmol ⁻¹]	ΔH^* [kJmol ⁻¹]	T ΔS^* [kJmol ⁻¹] (esant 298 K)
Žmogaus gliukagonas	16,2 + 4,5 - 1,5	30,0 ± 12,0	13,8 ± 18,0
Jaučio insulino B – grandinė	16,2 + 4,4 - 1,5	35,0 ± 10,1	18,8 ± 16,0
Žmogaus A β (1-42)	5,9 + 4,0 - 1,4	66,1 ± 8,1	60,2 ± 13,5
Jaučio insulinas	25,0 + 4,0 - 1,5	102,5 ± 10,0	77,5 ± 9,6
Mielių Ure2p	9,6 + 4,0 - 1,5	27,0 ± 10,0	17,4 ± 15,5
Jaučio PI3K-SH3	20,4 + 3,9 - 1,5	42,1 ± 8,5	21,8 ± 13,9
Žmogaus β 2-mikroglobulinas	16,7 + 5,2 - 1,5	48,3 ± 8,6	31,6 ± 15,3
Jaučio α -laktalbuminas	13,5 + 4,1 - 1,4	107,0 ± 10,0	93,5 ± 15,6
Žmogaus lizocimas (natyvūs)	25,0 + 4,0 - 1,5	167,7 ± 14,7	142,7 ± 20,1
Žmogaus lizocimas (redukuotas)	9,9 + 4,1 - 1,4	68,0 ± 12,0	58,1 ± 17,5
Žmogaus α -sinukleinas	13,9 + 4,1 - 1,5	71,0 ± 5,6	57,1 ± 11,2
Jaučio β -laktoglobulinas	31,8 + 3,9 - 1,4	83,7 ± 9,6	53,9 ± 14,9

Baltymas gali turėti daugybę konformacinių stadijų, o susilankstymo reakcijos yra sudėtingos ir nevienalytės, naudojančios daug silpnų nekovalentinių sąveikų bei didelius kiekius laisvosios energijos. Tik neseniai buvo pradėta suprasti šiuos procesus. Buvo sukurtas piltuvo formos (*angl.* funnel-shaped) modelis, pagal kurį polipeptidas gali įgauti skirtingas konformacines stadijas, įveikęs skirtingą energetinį barjerą (3 pav.). Norint baltymui įgyti savo natyvią formą, molekulė turi kirsti didelius kinetinius barjerus, o tam reikia nemažų kiekių laisvosios energijos (Jahn *et al.* 2007, Hartl *et al.* 2009, Hartl *et al.* 2011).



2 pav. Išmatuotų ir apskaičiuotų verčių apžvalga. Visos aktyvacijos entalpijos ΔH^* reikšmės yra nepalankios, o entropijos T ΔS^* – palankios. Paveiksle puikiai matosi entalpijos-entropijos kompensacija (pritaikyta iš Buell *et al.* 2012).

Apie 90 % visų ląstelės baltymų susivyniojimo metu įgauna tarpines formas. Ne visada baltymo susilankstymas gali būti teisingas. Trūkstant tam tikrų ryšių ar esant didelei konfigūracijos entropijai gali susidaryti netaisyklingai susilanksčiusios formos, ar tarpinės formos, stabilizuotos nenatyvių sąveikų. Tad piltuvo formos „*funnel-shaped*“ baltymo susilankstymo žemėlapis yra taikomas aiškinti ne tik natyvios formos susidarymui, bet ir nenatyvios baltymo formos susidarymui (Hartl *et al.* 2009, Hartl *et al.* 2011).



3 pav. Piltuvo formos laisvosios energijos paviršiaus schema, vaizduojanti baltymų vidumolekulinės sąveikos energetinius barjerus natyviai formai pasiekti (žalia spalva). Piltuvo nelygumai rodo kokius energetinius barjerus turi įveikti viena ar kita konformacinė baltymo stadija, kad pasiektų termodinamiškai stabiliausią formą. Kai baltymo susivyniojimo metu atsiranda tarpmolekulinė sąveika (procese dalyvauja kelios molekulės), procesas gali peraugti į agregaciją. Tuomet susidaro amorfiniai agregatai, toksiniai oligomerai ar tvarkingos struktūros amiloidinės fibrilės (raudona spalva) (pritaikyta iš Hartl *et al.* 2011).

Laikui bėgant buvo pastebėta, kad fiziologinėmis sąlygomis, baltymų agregatai yra daug stabilesni nei natyvi baltymo struktūra. (Buell *at al.* 2012). Galima teigti, jog amiloidinės fibrilės yra stabiliausia baltymo konformacinė stadija.

1.4. Insulinas, kaip amiloidinių fibrilių tyrimų modelis

Insulinas yra genetiškai toli nuo baltymų, susijusių su patalogine agregacija *in vivo*, tačiau jis lengvai sudaro amiloidus *in vitro* (Dzwolak *et al.* 2004, Dzwolak *et al.* 2005). Be to, tai pirmasis baltymas, kurio savaiminė agregacija pradėta stebėti *in vitro* (Buell *et al.* 2010).

Natyvus insulinas egzistuoja heksamero formoje. Heksameras yra sudarytas iš trijų dimerų ir stabilizuojamas 3–5 cinko jonų (Lee *et al.* 2007). Esant žemoms baltymo koncentracijoms, insulinas gali būti dimero formoje, jei pH yra tarp 2 ir 8. Tam, kad susidarytų tetramerai, insulino koncentracija turi būti didesnė nei 1,5 mg/mL. Esant rūgštinėms sąlygoms ir kambario temperatūrai, jis yra konformaciškai stabilus, o esant tirpale 20 % acto rūgšties ar etanolio, baltymas yra monomero formoje (Dzwolak *et al.* 2005, Nielsen *et al.* 2001). Tačiau insulinas gali būti priverstas tirpale formuoti amiloidines fibriles, pakeliant temperatūrą ir sumažinant pH iki maždaug 1,6 (Nielsen *et al.* 2001).

Galimas kinetinis fibrilių susidarymo mechanizmas susideda iš kelių stadijų: heksamerų iširimas, branduolių susidarymas ir fibrilizacijos procesas (elongacija). Visų pirma, cinko jonų stabilizuoti heksamerai negrįžtamai disocijuoja. Kai tik disocijavusi forma pavirsta į reakingą branduolį toliau reakcija vyksta labai greitai. Tokiu būdu susiformavę branduoliai reaguoja vienas su kitu ar su skirtingo dydžio oligomerais, formuodami fibriles (Lee *et al.* 2007).

Taigi, bandymams, kaip modelinis baltymas, naudojamas insulinas, nes:

- 1) yra gerai išstudijuotas fibriles formuojantis baltymas;
- 2) galima išgauti labai gryną natyvų baltymą;
- 3) suformuoti fibriliniai agregatai yra struktūriškai panašūs į kitų baltymų formuojamas fibriles;
- 4) pigus baltymas (Lee *et al.* 2007).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudoti reagentai

- *Agar Scientific*: anglimi dengti vario tinkleliai (Formvar/Carbon 300 Mesh Cu).
- *Carl Roth*: sunkus vanduo (99,8 % D).
- *Fisher Scientific*: acto rūgštis (99,5 %), fosforo rūgštis, guanidino tiocianatas (GuSCN), natrio chloridas, natrio dihidro fosfatas, uranilacetatas.
- *Sigma Aldrich*: etanolis (99,8 %) (EtOH), rekombinantinis žmogaus insulinas, tioflavinas T.

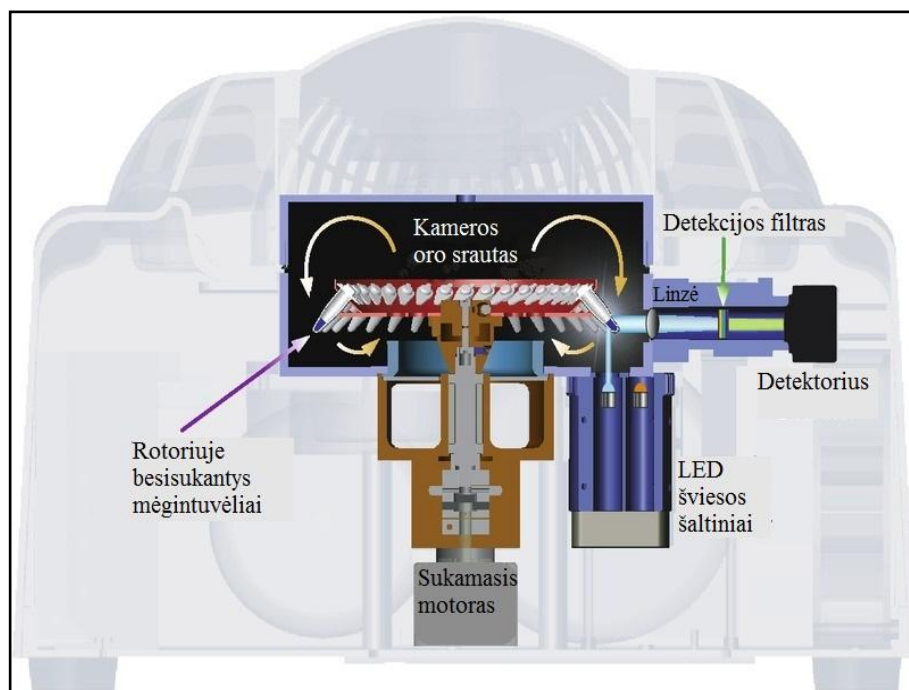
2.2. Naudota laboratorinė įranga

- Centrifuga „Technico Maxi“.
- Elektroninis mikroskopas „FEI Morgagni 268“
- Fluorescencinis spektroskopas „CARY Eclipse“
- FT-IR spektrometras „Bruker Optics ALPHA FT-IR“.
- Kvarcinė fluorescencinė kiuvetė ($l = 10$ mm)
- pH metras „Orion DUAL STAR Meter“.
- Realaus laiko PGR aparatas „Qiagen Rotor-Gene Q“.
- Sūkurinė maišyklė „VELP SCIENTIFICA VORTEX MIXER“.
- Svarstyklės: „KERN PCB 400–2“, „Denver Instrument TP-214“.
- Šildomoji magnetinė maišyklė „VELP Scientifica ARE“.
- Termomikseris „DITABIS MHR 23“.
- Ultragarsinis homogenizatorius „Bandelin Sonoplus“.

2.3. Metodai

2.3.1. Fluorescencijos matavimas

Insulino fibrilių formavimasis stebimas pridėjus tioflavino T (ThT), specifiskai prie fibrilių besijungiančio dažo, ir matuojant jo fluorescenciją, sužadinimui vykstant prie 470 nm bangos ilgio, o emisijai – prie 510 nm bangos ilgio. ThT prisijungus prie fibrilių, fluorescencija žymiai padidėja, nei tuomet, kai stebima jo vieno fluorescencija (Hudson *et al.* 2009). Eksperimentai atliekami su realaus laiko PGR aparatu „Qiagen Rotor-gene Q“ (4 pav.), kuris yra naudojamas ne pagal paskirtį, bet puikiai tinka agregacijos tyrimams.



4 pav. „Quaiagen Rotor-gene Q“ skersinis pjūvis. Visi 36 mėgintuvėliai prasisuka pro detektavimo įrenginį per 150 ms. Prietaisas turi LED šviesos šaltinius, 6 skirtingus šviesos detektavimo filtrus ir labai jautrų detektorių (Qiagen žiūrėta 2014-04-22).

Prietaisas talpina 36 mėgintuvėlius (200 μ L tūrio), kurie statomi į rotorių. Šis eksperimento metu sukasi 400 apsisukimų per minutę greičiu, reakcijos mišinį palaiko mėgintuvėlio apatinėje dalyje, kur matuojama fluorescencija. Mišinys iš LED šviesos šaltinio yra apšviečiamas 470 ± 10 nm bangos ilgio šviesa ir detektorius matuoja 510 ± 5 nm bangos ilgio šviesą (Qiagen žiūrėta 2014-04-22). Viso proceso metu palaikoma pastovi temperatūra.

2.3.2. Amiloidinių fibrilių ruošimas

2.3.2.1 Aktyvacijos energijos priklausomybės nuo baltymo koncentracijos tyrimams

Insulino amiloidinės fibrilės paruošiamos inkubuojant 5 mg/mL insulino tirpalą, pagamintą 100 mM (pH 2) fosfatiniame buferyje (PB). Inkubacija vykdoma 24 valandas, esant 60 °C temperatūrai. Norint homogenizuoti suagregavusį insuliną ir padidinti fibrilių galų skaičių, tirpalas apdorojamas ultragarsu. Tam fibrilės skiedžiamos 25 kartus, perkeliamos į 2 mL mėgintuvėlį ir homogenizuojamos 10 minučių (30s/30s ultragarsinimo/poilsio ciklai ir 50 % amplitudė), naudojant ultragarso homogenizatorių su MS73 antgaliu. Visą laiką mėginiai laikomi lede. Taip paruoštos fibrilės toliau naudojamos kaip sėkla.

2.3.2.2 Sėjimo skirtingomis sąlygomis tyrimams

Skirtingos fibrilės paruošiamos inkubuojant insulino tirpalą (2 lentelė). Inkubacija vykdoma 24 val., esant 60 °C temperatūrai. Tuomet fibrilės homogenizuojamos, kaip 2.3.2.1 skyriuje.

2 lentelė. Monomero tirpalai heterogeninio sėjimo eksperimentų sėklai ruošti.

Insulinas, mg	PB, µL	EtOH, µL	Acto r., µL	Gaunamas tirpalas
5,0	1000,0	-	-	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2)
	800,0	200,0	-	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % EtOH
	800,0	-	200,0	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % acto r.

Tokiu būdu paruoštos fibrilės toliau naudojamos kaip sėkla.

2.3.2.3 Stabilumo ir infraraudonosios spektroskopijos (FT-IR) tyrimams

Paruošiamos skirtingos amiloidinės fibrilės. Tam insulino monomero tirpalai (3 lentelė) inkubuojami 24 valandas 60 °C temperatūroje.

3 lentelė. Monomero tirpalai stabilumo ir FT-IR tyrimų fibrilėms ruošti.

Insulinas, mg	PB, µL	1 M NaCl, µL	EtOH, µL	Acto r., µL	Gaunamas tirpalas
5,0	1000,0	-	-	-	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2)
	900,0	100,0	-	-	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 100 mM NaCl
	800,0	-	200,0	-	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % EtOH
	700,0	100,0	200,0	-	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % EtOH, 100 mM NaCl
	800,0	-	-	200,0	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % acto r.
	700,0	100,0	-	200,0	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % acto r., 100 mM NaCl

Tuomet fibrilės toliau ruošiamos, priklausomai nuo atliekamo tyrimo.

2.3.3. Elektroninės mikroskopijos mėginiai

Norint įrodyti, jog tikrai susidaro amiloidiniai agregatai, fibrilės yra skiedžiamos 50 kartų, 3,5 µL tirpalo užnešama ant anglimi dengtų vario tinklelių ir po minutės nusausinama. Po to užnešama 3,5 µL dažo (uranilacetato) ir po 45 sekundžių nusausinama. Paruoštas mėginys dedamas į elektroninį mikroskopą.

2.3.4. Fibrilių stabilumo tyrimas

Norint iširti fibrilių stabilumą, atliktas denatūracijos tyrimas. Tuo tikslu paruoštos skirtingos fibrilės (2.3.2.3. skyrius) nucentrifuguojamos (20 min., 14000 aps./min), nusiurbus supernatantą

resuspenduojamos 200 μL 0,5 M GuSCN ir vėl nucentrifuguojamos. Procesas kartojamas 3 kartus. Tuomet nusiurbus supernatantą fibrilės resuspenduojamos 1 mL 0,5 M GuSCN ir homogenizuojamos, kaip nurodyta 2.3.2.1. skyriuje. Paruoštos fibrilės dedamos į skirtingų koncentracijų denatūrantų tirpalą, kaip nurodyta 4 lentelėje, ir laikoma kambario temperatūroje per naktį.

4 lentelė. Stabilumo tyrimo mėginių ruošimas.

6 M GuSCN, μL	H ₂ O, μL	Sėkla, μL	Gaunama denatūrantų koncentracija tirpale, M
100,0	340,0	40,0	1,25
120,0	320,0		1,5
140,0	300,0		1,75
160,0	280,0		2
180,0	260,0		2,25
200,0	240,0		2,5
220,0	220,0		2,75
240,0	200,0		3
260,0	180,0		3,25
280,0	160,0		3,5
300,0	140,0		3,75
320,0	120,0		4
340,0	100,0		4,25
360,0	80,0		4,5
380,0	60,0		4,75
400,0	40,0		5
420,0	20,0		5,25
440,0	-		5,5

Kitą dieną kvarcinėje kiuvetėje sumaišoma 2 mL 50 μM ThT tirpalo su 100 μL kiekvieno iš mėginių ir naudojantis fluorimetru matuojama mėginių fluorescencija, sužadimui esant prie 450 nm, o emisija – nuo 480 nm iki 520 nm.

2.3.5. Mėginių ruošimas FT-IR spektroskopijai

Paruoštos skirtingos fibrilės (2.3.2.3. skyrius), nucentrifuguojamos (20 min., 14000 aps./min), nusiurbus supernatantą resuspenduojamos 500 μL sunkiojo vandens (D₂O) ir vėl nucentrifuguojamos. Tai kartojama 3 kartus. Tuomet nusiurbus supernatantą fibrilės resuspenduojamos 50 μL D₂O. Matavimams naudojamas CaF₂ transmisijos langelis, su 0,05 mm

teflono tarpine, į kuri užnešama 20 µL mėginio. Kiekvienas spektras gaunamas kaip 256 interferogramų vidurkis, esant 2 cm⁻² rezoliucijai. Prieš mėginių spektrus, pamatuojami tuščios celės (oro) ir gryno sunkiojo vandens spektrai.

2.3.6. Reakcijos mišinių ruošimas

2.3.6.1 Spontaninės agregacijos tyrimams

Spontaninės agregacijos tyrimams paruošiami 6 skirtingi insulino monomero tirpalai, kaip nurodyta 5 lentelėje.

5 lentelė. Reakcijos mišinių ruošimas spontaninės agregacijos tyrimams.

Insulinas, mg	PB, µL	1 M NaCl, µL	EtOH, µL	Acto r., µL	5 mM ThT, µL	Gaunamas reakcijos mišinys
1,0	198,0	-	-	-	2,0	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 50 µM ThT
	178,0	20,0	-	-		5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 100 mM NaCl, 50 µM ThT
	158,0	-	40,0	-		5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % EtOH, 50 µM ThT
	138,0	20,0	40,0	-		5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 100 mM NaCl, 20 % EtOH, 50 µM ThT
	158,0	-	-	40,0		5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % acto r., 50 µM ThT
	138,0	20,0	-	40,0		5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 100 mM NaCl, 20 % acto r., 50 µM ThT

Mėginiai išpilstomi į mėgintuvėlius po 20 µL, reakcija atliekama 4 skirtingose temperatūrose: 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C.

2.3.6.2 Aktyvacijos energijos priklausomybės nuo baltymo koncentracijos tyrimams

Norint nustatyti energetinio barjero priklausomybę nuo baltymo koncentracijos, paruošiami 5 skirtingi reakcijos mišiniai. 5 mg insulino ištirpinama 500 µL 100 mM PB (pH2). Gautas 10 mg/mL baltymo tirpalas skiedžiamas iki reikiamos koncentracijos, pridedama ThT ir homogenizuotos sėklos, kaip nurodyta 6 lentelėje.

6 lentelė. Reakcijos mišinių ruošimas energetinio barjero priklausomybės nuo baltymo koncentracijos tyrimams.

10 mg/mL, μL	PB, μL	5 mM ThT, μL	Sėkla, μL	Gaunamas reakcijos mišinys
98,0	-	2,0	100,0	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos
80,0	18,0			4 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos
60,0	38,0			3 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos
50,0	48,0			2,5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos
40,0	58,0			2 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos

Taip paruošti mėginiai išpilstomi į mėgintuvėlius po 20 μL, reakcija atliekama 5 skirtingose temperatūrose: 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C.

2.3.6.3 Sėjimo skirtingomis sąlygomis tyrimams

Agregacijos priklausomybės nuo sąlygų tyrimams paruošiami 9 skirtingi reakcijos mišiniai. Tam pagaminta sėkla (2.3.2.2. skyrius) maišoma su monomero tirpalu, kaip nurodyta 7 lentelėje.

7 lentelė. Reakcijos mišinių ruošimas agregacijos priklausomybės nuo sąlygų tyrimams.

Insulinas, mg	PB, μL	1 M NaCl, μL	EtOH, μL	Acto r., μL	5 mM ThT, μL	Sėkla, μL	Gaunamas reakcijos mišinys
1,0	98,0	-	-	-	2,0	100,0	5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 50 μM ThT ir 0,1mg/mL sėklos
	78,0	20,0	-	-			5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 100 mM NaCl, 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos
	58,0	-	40,0	-			5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % EtOH, 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos
	38,0	20,0	40,0	-			5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 100 mM NaCl, 20 % EtOH, 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos
	58,0	-	-	40,0			5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 20 % acto r., 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos
	38,0	20,0	-	40,0			5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2), 100 mM NaCl, 20 % acto r., 50 μM ThT, 0,1mg/mL sėklos

Paruošti mėginiai išpilstomi į mėgintuvėlius po 20 μL, reakcija atliekama 5 skirtingose temperatūrose: 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C.

2.3.7. Duomenų analizė

2.3.7.1 Spontaninė agregacija

Amiloidinių fibrilių spontaninė formavimosi kinetika gali būti apibūdinta kaip sigmoidinė kreivė, kuri susideda iš *lag* fazės, vėliau augimo fazės ir pusiausvyros nusistovėjimo fazės (5 pav.) (Nielsen *et al.* 2001). Dėl paprastumo lyginant įvairių inkubavimo sąlygų poveikį fibrilių susidarymui, ThT fluorescencija užrašoma kaip laiko funkcija, o spontaninės agregacijos eksperimentų duomenys yra normalizuojami. Normalizavimui, kiekvienas kreivės taškas perskaičiuojamas pagal lygtį:

$$I_{norm} = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}}, \quad (1)$$

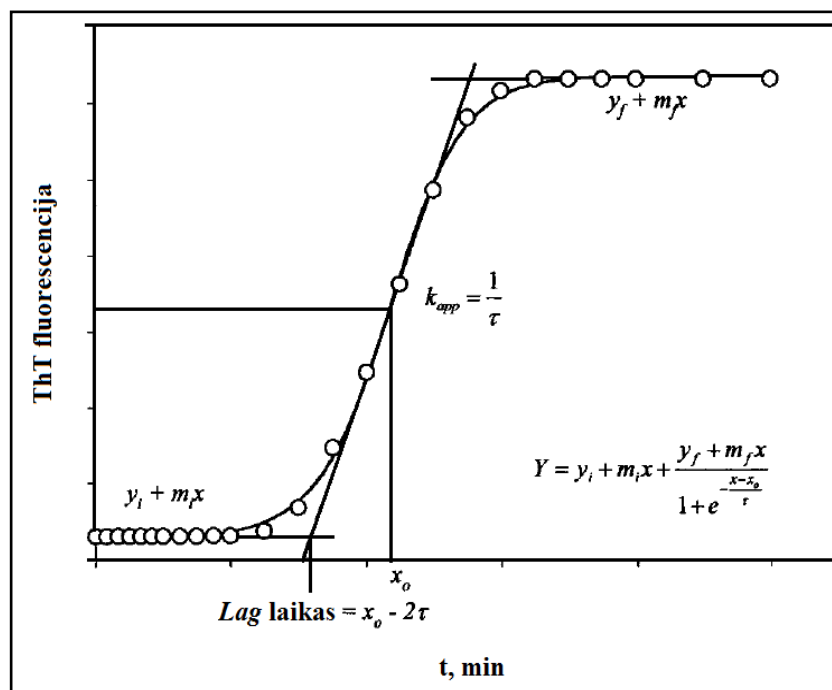
kur I_{norm} yra ThT fluorescencijos normalizuota reikšmė, I – ThT fluorescencija, I_{min} – mažiausia ThT fluorescencijos reikšmė kreivėje, I_{max} – didžiausia ThT fluorescencijos reikšmė kreivėje.

Tuomet duomenys gluodinami sigmoidine kreive, kurią aprašo lygtis:

$$Y = y_i + m_i x + \frac{y_f + m_f x}{1 + e^{-\left[\frac{x - x_0}{\tau}\right]}}, \quad (2)$$

kur Y yra fluorescencijos intensyvumas, x – laikas ir x_0 yra laikas, kai pasiekama 50 % maksimalaus fluorescencijos intensyvumo.

Fibrilių augimo greičio konstanta apskaičiuojama kaip $1/\tau$ (Nielsen *et al.* 2001).



5 pav. Schematinė ThT fluorescencijos augimo kreivė, atspindinti insulino amiloidinių fibrilių spontaniinį susidarymą (pritaikyta iš Nielsen et al. 2001).

2.3.7.2 Fibrilių stabilumas

Nustatinėjant fibrilių stabilumo priklausomybę nuo denatūrantų kiekio, gaunami fluorescencijos intensyvumo spektrai nuo 480 nm iki 520 nm. Nubraižoma fluorescencijos intensyvumo ties 482 nm priklausomybė nuo denatūrantų koncentracijos, kreivės normalizuojamos. Kiekvienas kreivės taškas perskaičiuojamas pagal (1) lygtį.

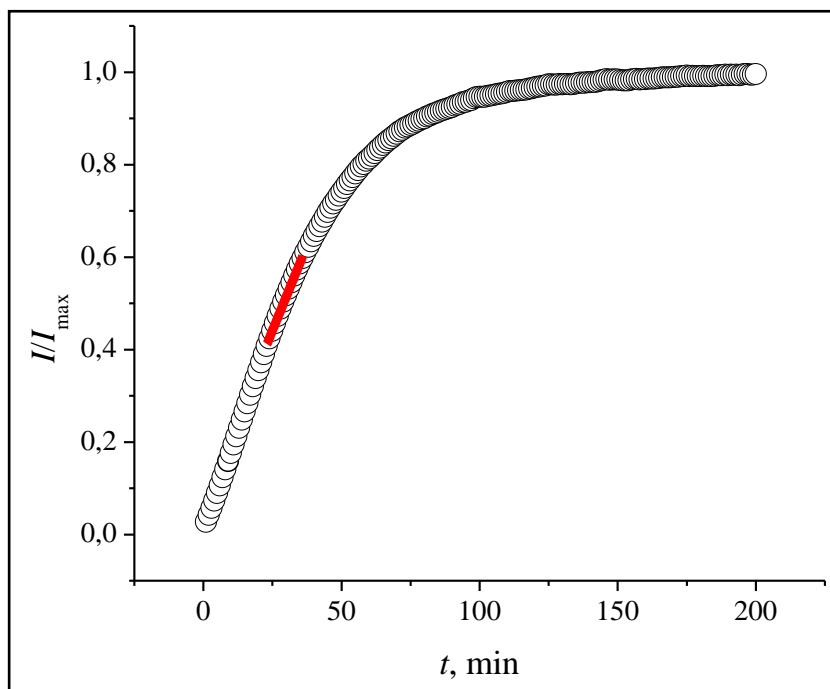
2.3.7.3 FT-IR spektrai

Iš gautų fibrilių FT-IR spektrų atimami oro ir D₂O spektrai, tuomet apskaičiuojama antra išvestinė su 17 gluodinimo taškų.

2.3.7.4 Fibrilių ilgėjimas

Eksperimentų fluorescencijos kreivės normalizuojamos ir gluodinamos. Kreivių normalizavimui, kiekvienas kreivės taškas padalinamas iš didžiausios reikšmės kreivėje (šiuo atveju didžiausio ThT fluorescencijos intensyvumo). Darant prielaidą, kad reakcija vyksta iki galo, o fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas susidariusių fibrilių kiekiui, naudojant linijinį gluodinimą apskaičiuojamas greitis esant pusei pradinės monomero koncentracijos (6 pav.). Tokiu atveju gluodinimo būdu gautos kreivės nuolinkio koeficiento ir baltymo suminės

koncentracijos sandauga yra lygi reakcijos greičiui. Molinės greičio išraiškos gaunamos greitį padauginus iš molinės baltymo koncentracijos, o 5 mg/mL insulino atitinka 861 μM .



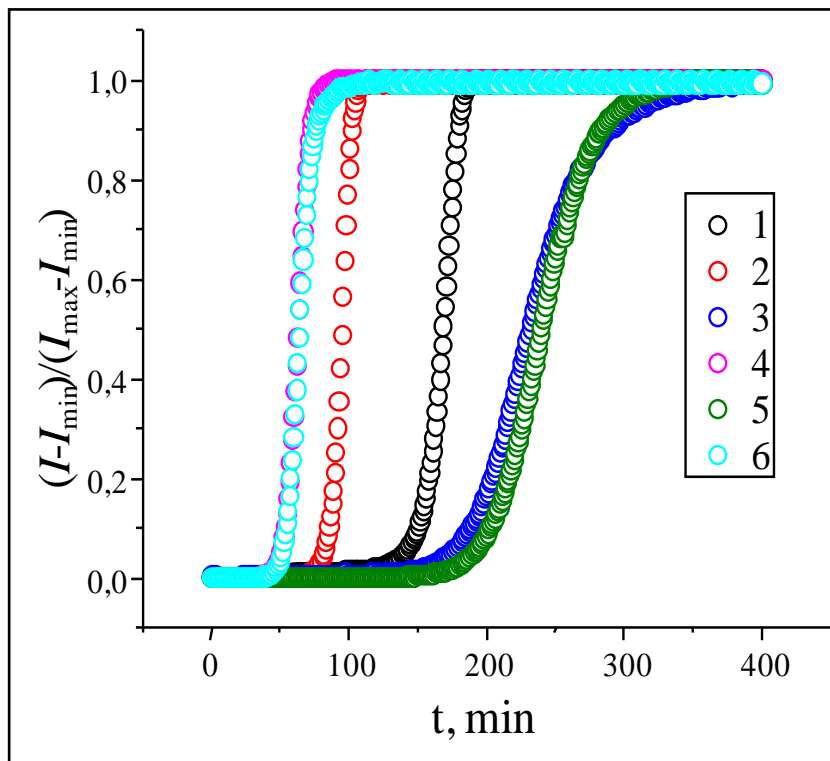
6 pav. Gluodinimo pavyzdys.

Ne visi termodinaminiai parametrai skaičiuojami, deja darbo metu nėra sąlygų fibrilių galų koncentracijai nustatyti. Tad naudojantis temperatūros priklausomybe nuo fibrinių elongacijos greičio, apskaičiuojamos procesų aktyvacijos energijos.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

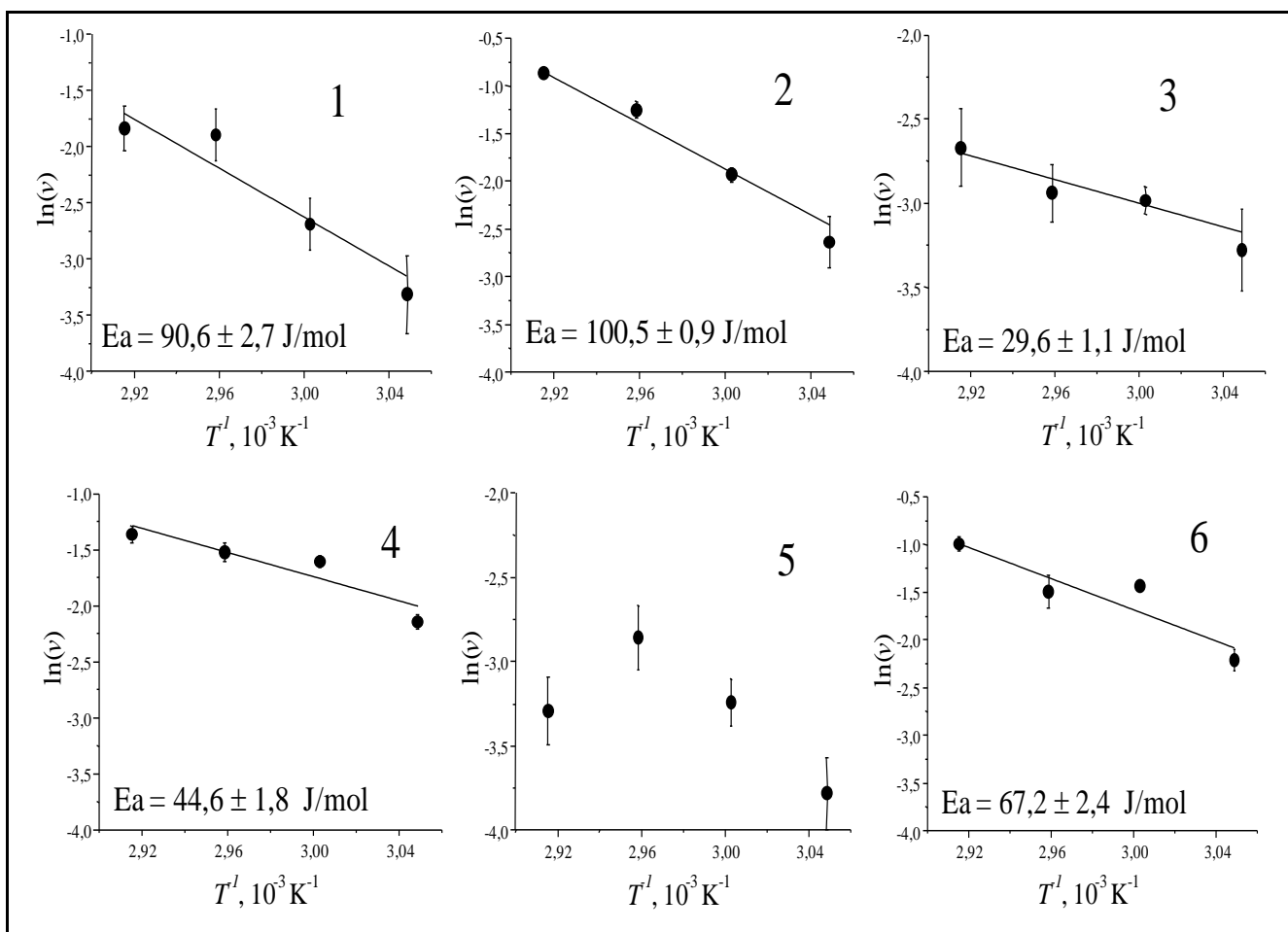
3.1. Spontantinės agregacijos tyrimas

Insulino monomero spontaninės agregacijos tyrimai buvo atlikti skirtingomis sąlygomis 4 temperatūrose (55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C). Iš 7 paveikslo matoma, kad tirpale esant etanolio ar acto rūgšties, fibrilizacija prasideda vėliau, tačiau į tokius monomero tirpalus pridėjus druskos, reakcija prasideda žymiai greičiau nei monomero tirpale be jokių priedų.



7 pav. Spontaninės agregacijos eksperimentiniai rezultatai, esant 65 °C temperatūrai. 5 mg/mL insulino tirpalas 100 mM PB (pH2) 50 μM ThT: 1) be papildomų priedų, 2) su 100 mM NaCl, 3) su 20 % EtOH, 4) su 20 % EtOH ir 100 mM NaCl, 5) su 20 % CH₃COOH, 6) su 20 % CH₃COOH ir 100 mM NaCl.

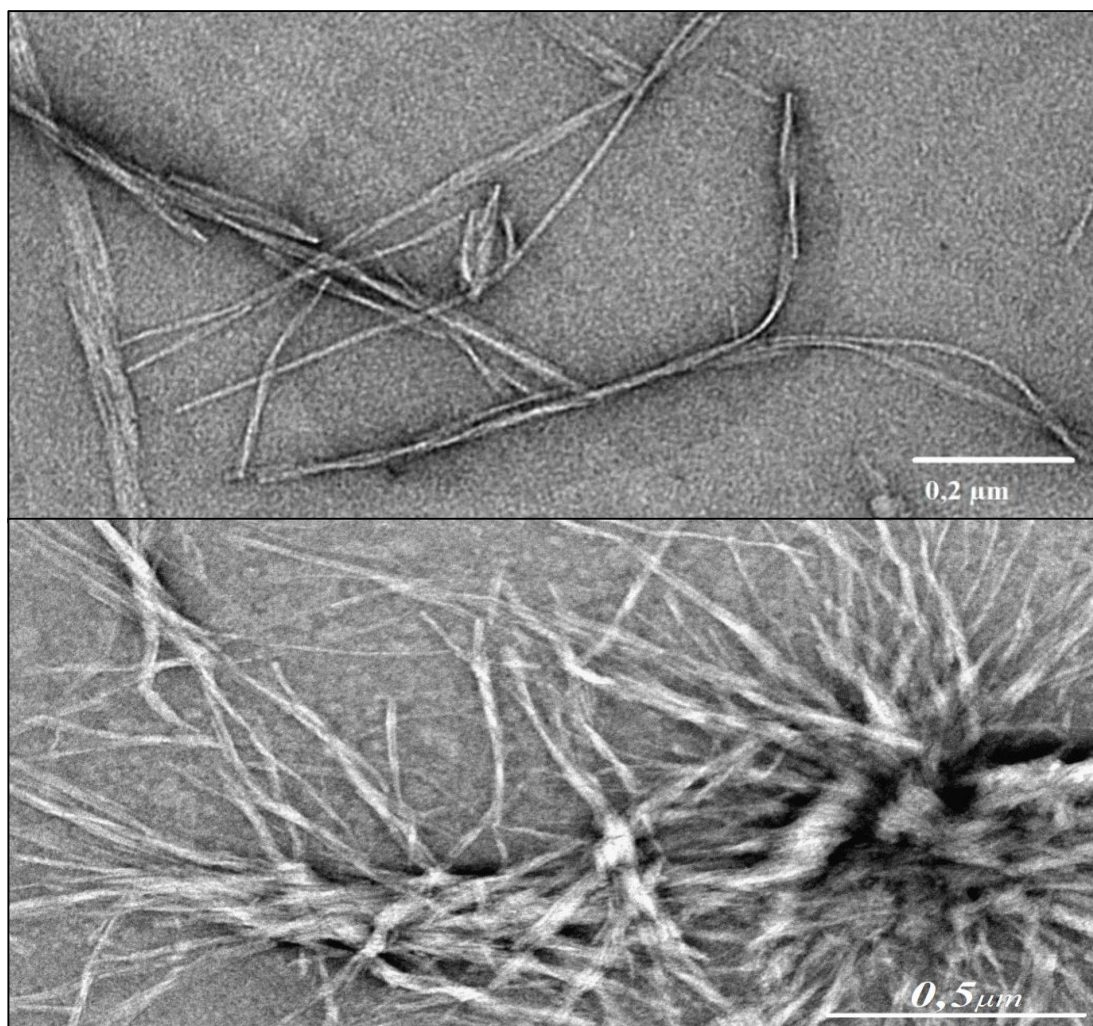
Naudojant apdorotus eksperimentinius duomenis, nubraižyta logaritminio greičio priklausomybė nuo atvirkštinės temperatūros (*Arrhenius* koordinatės) bei apskaičiuotos procesų aktyvacijos energijos (8 pav.). Gautos reikšmės nėra labai tikslios, nes eksperimentiniai duomenys išsibarstę ar turi paklaidas. Taip gali būti todėl, jog prie 60 °C insulinas pradeda išsivynioti, o tai gali daryti įtaką tolimesniems procesams. Dėl nežinomų priežasčių 8 paveikslo 5 dalyje duomenys nepatikimi, tad ir aktyvacijos energija neskaičiuojama.



8 pav. Spontinės agregacijos greičiai *Arrhenius* koordinatėse ir apskaičiuotos aktyvacijos energijos. 5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2) 50 μM ThT: 1) be papildomų priedų, 2) su 100 mM NaCl, 3) su 20 % EtOH, 4) su 20 % EtOH ir 100 mM NaCl, 5) su 20 % CH₃COOH, 6) su 20 % CH₃COOH ir 100 mM NaCl.

Didžiausias energijos kiekis reakcijai inicijuoti reikalingas insulino tirpalui be papildomų priedų ar su 100 mM NaCl. Kitomis sąlygomis reikalingas žymiai mažesnis energijos kiekis. Taip gali būti dėl to, jog esant 20 % EtOH ar acto rūgšties, insulinas yra linkęs būti monomero formoje.

Naudojant elektroninį mikroskopą buvo įsitikinta, kad tikrai susidaro amiloidinės fibrilės. Gauti insulino agregatų vaizdai (9 pav.).

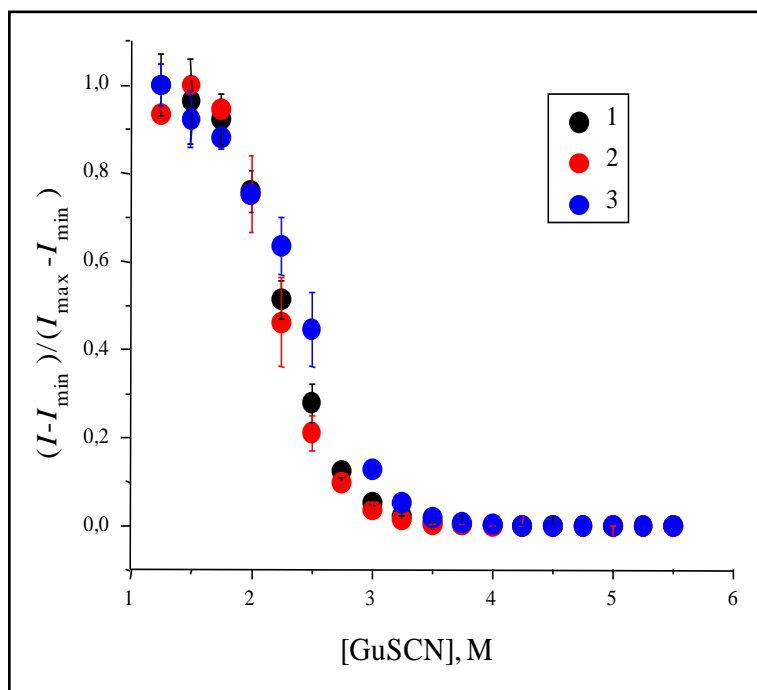


9 pav. Žmogaus insulino fibrilės 100 mM pH 2 fosfatiniame buferyje.

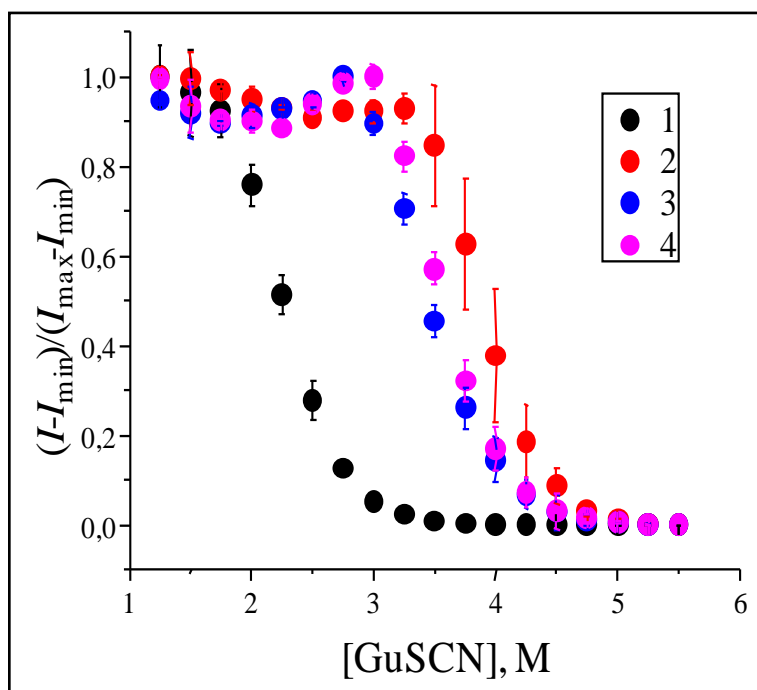
Paveiksle matoma, kad susidariusios fibrilės kartkartėmis apsieja viena kitą ar sulimpa į didesnius darinius, o jų ilgis varijuoja maždaug nuo 0,5 μm iki 1 μm.

3.2. Amiloidinių fibrilių stabilumo tyrimas

Atlikus denatūracijos tyrimą pastebėta, kad fibrilės, pagamintos skirtingomis sąlygomis, yra ne vienodai stabilios. Iš 10 paveikslo matoma, jog NaCl ir etanolis neturėjo didelės įtakos ir fibrilės termodinamiškai panašaus stabilumo, lyginant su amiloidiniais agregatais be priedų. Tačiau gauti duomenys rodo, jog fibrilės su 20 % acto rūgšties bei druskos ir acto rūgšties mišiniu yra daug stabilesnės, nei paprastos fibrilės (11 pav.). Įdomu tai, jog vienas etanolis neturėjo įtakos fibrilių stabilumui, tačiau fibrilės su etanolio ir druskos mišiniu pasižymi panašiu stabilumu, kaip ir fibrilės su acto rūgšties ir druskos mišiniu.



10 pav. Fibrilių stabilumo priklausomybė nuo denatūrantų kiekio. 5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2): 1) be papildomų priedų; 2) su 100 mM NaCl; 3) su 20 % EtOH.

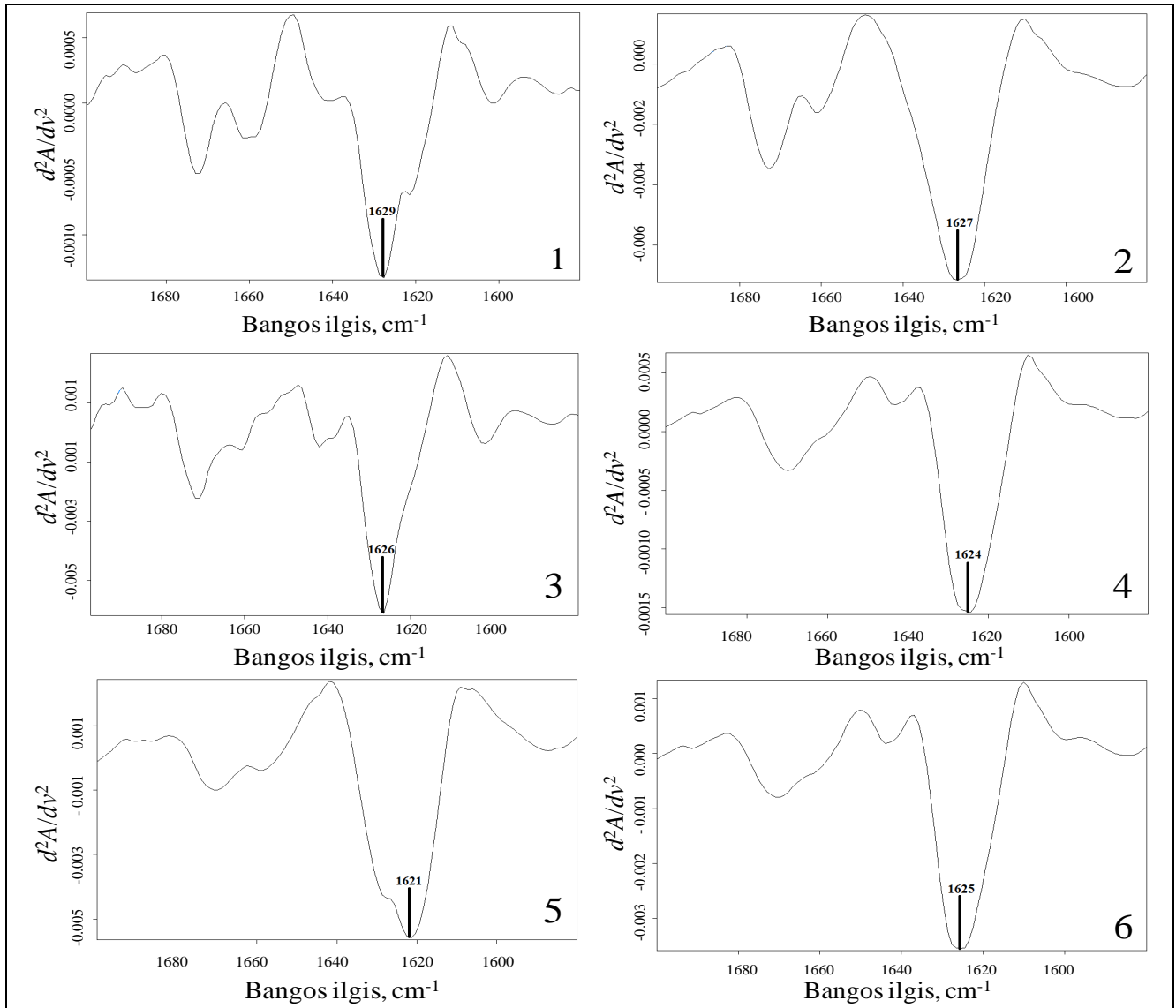


11 pav. Fibrilių stabilumo priklausomybė nuo denatūrantų kiekio. 5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2): 1) be papildomų priedų; 2) su 20 % CH₃COOH; 3) su 100 mM NaCl ir 20 % EtOH; 4) su 100 mM NaCl ir 20 % CH₃COOH

Gali būti, jog taip susidariusių fibrilių stipresnis beta klosčių susipakavimas ar stipresnės vandenilinės jungtys, dėl to jos labiau atsparios denatūrantui.

3.3. FT-IR spektroskopijos tyrimas

Buvo užrašyti fibrilių infraraudonieji spektrai (12 pav.). Amido I' juosta, esanti tarp 1640 ir 1620 cm^{-1} , yra spektrinė insulino amiloidinių fibrilių charakteristika. Juostos forma ir pozicija apibūdina skirtingų fibrilių beta klosčių struktūrą, o juostos poslinkis į mažesnių reikšmių pusę rodo stipresnius vandenilinius ryšius (Dzwolak *et al.* 2004).



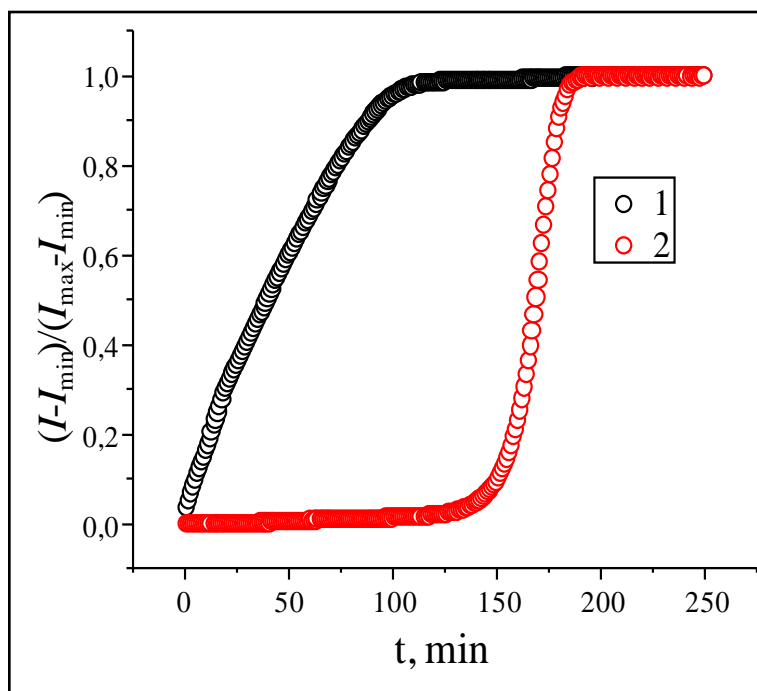
12 pav. Insulino amiloidinių fibrilių infraraudonieji spektrai. 5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2): 1) be papildomų priedų, 2) su 100 mM NaCl, 3) su 20 % EtOH, 4) su 20 % EtOH ir 100 mM NaCl, 5) su 20 % CH_3COOH , 6) su 20 % CH_3COOH ir 100 mM NaCl.

Iš paveikslo matoma, jog fibrilių su acto rūgštimi ir druskos bei acto rūgšties/etanolio mišiniu spektrai yra šiek tiek pasislinkę į mažesnių reikšmių pusę, nei esant kitoms sąlygoms (12 paveikslo 4, 5, 6 dalys). Tad galima teigti, jog šių amiloidinių fibrilių yra stipresni vandeniliniai ryšiai, bei

susidaro stabilesnės β klostės. Dėl šios priežasties buvo matomas didesnis fibrilių atsparumas GuSCN, esant 20 % acto rūgšties, 20 % acto rūgšties ir 100 mM NaCl bei 20 % etanolio ir 100 mM NaCl tirpaluose.

3.4. Fibrilių ilgėjimo tyrimai

Homogenizavus suagregavusį baltymą, jis buvo dedamas į baltymo monomero tirpalą ir stebimas agregacijos procesas. Kadangi ši reakcija tikrai vyksta, amiloidinės fibrilės gali būti naudojamos kaip sėkla. Toks fibrilių naudojimas yra daug tinkamesnis modelis procesams *in vitro*, nei natyvų baltymą destabilizuojant, pavyzdžiui, ilgą laiką šildant, nes sėjimas žymiai sutrumpina fibrilizacijos laiką bei eksperimentus galima atlikti žemesnėse temperatūrose (13 pav.) (Dzwolak *et al.* 2004).



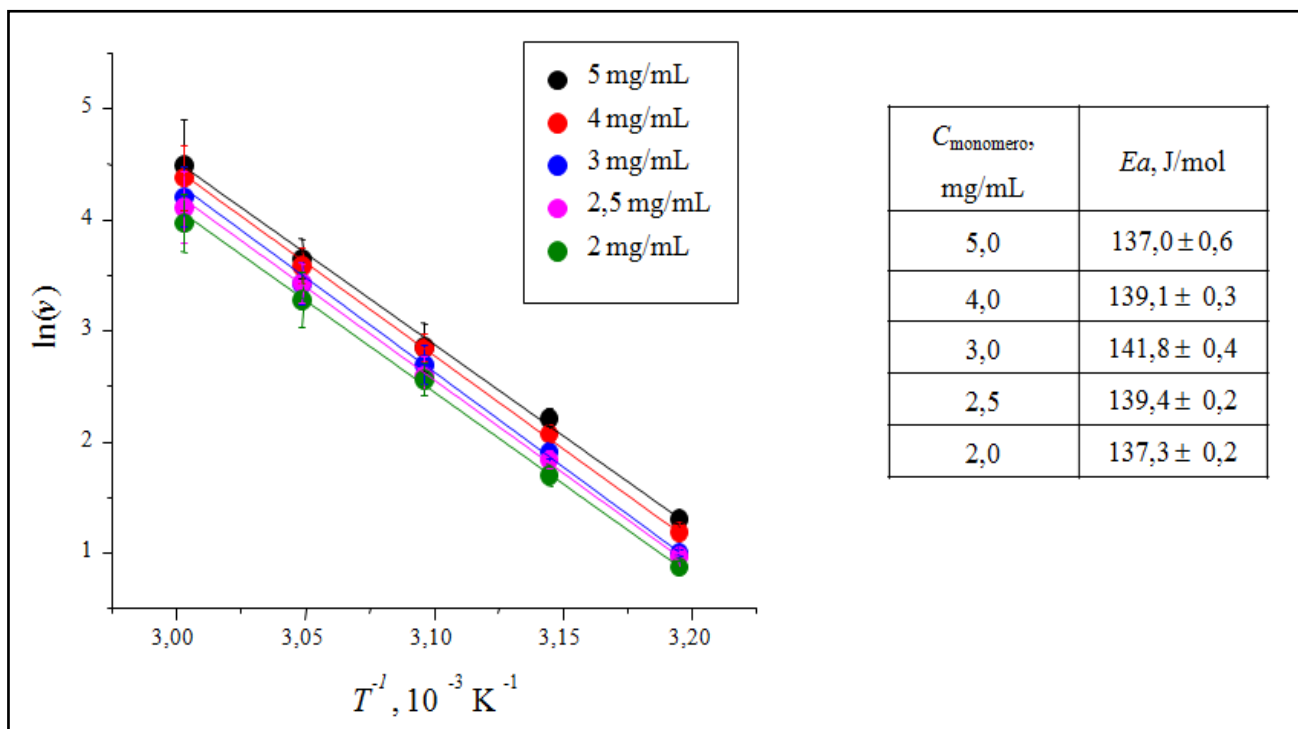
13 pav. Spontaninės ir sėklinės segregacijos palyginimas. 1) 5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2) 50 μ M ThT, esant 0,1 mg/mL sėklos be papildomų priedų, 45 °C. 2) 5 mg/mL insulino 100 mM PB (pH2) 50 μ M ThT, 65 °C.

Sėjimo eksperimentų metu neužtenka laiko spontaninei agregacijai prasidėti. Be to, tokie eksperimentai leidžia stebėti atskyrą procesą – fibrilių ilgėjimą.

3.4.1. Aktyvacijos energijos priklausomybės nuo baltymo koncentracijos tyrimas

Manoma, jog tirpale esant skirtingai baltymo koncentracijai, gali būti reikalingas ir skirtingas energijos kiekis amiloidogenezei inicijuoti (Buell *at al.* 2010). Tačiau eksperimentiniai duomenys

rodo, jog nepriklausomai nuo baltymo koncentracijos, reakcija yra limituojama vienodo energetinio barjero (14 pav.).



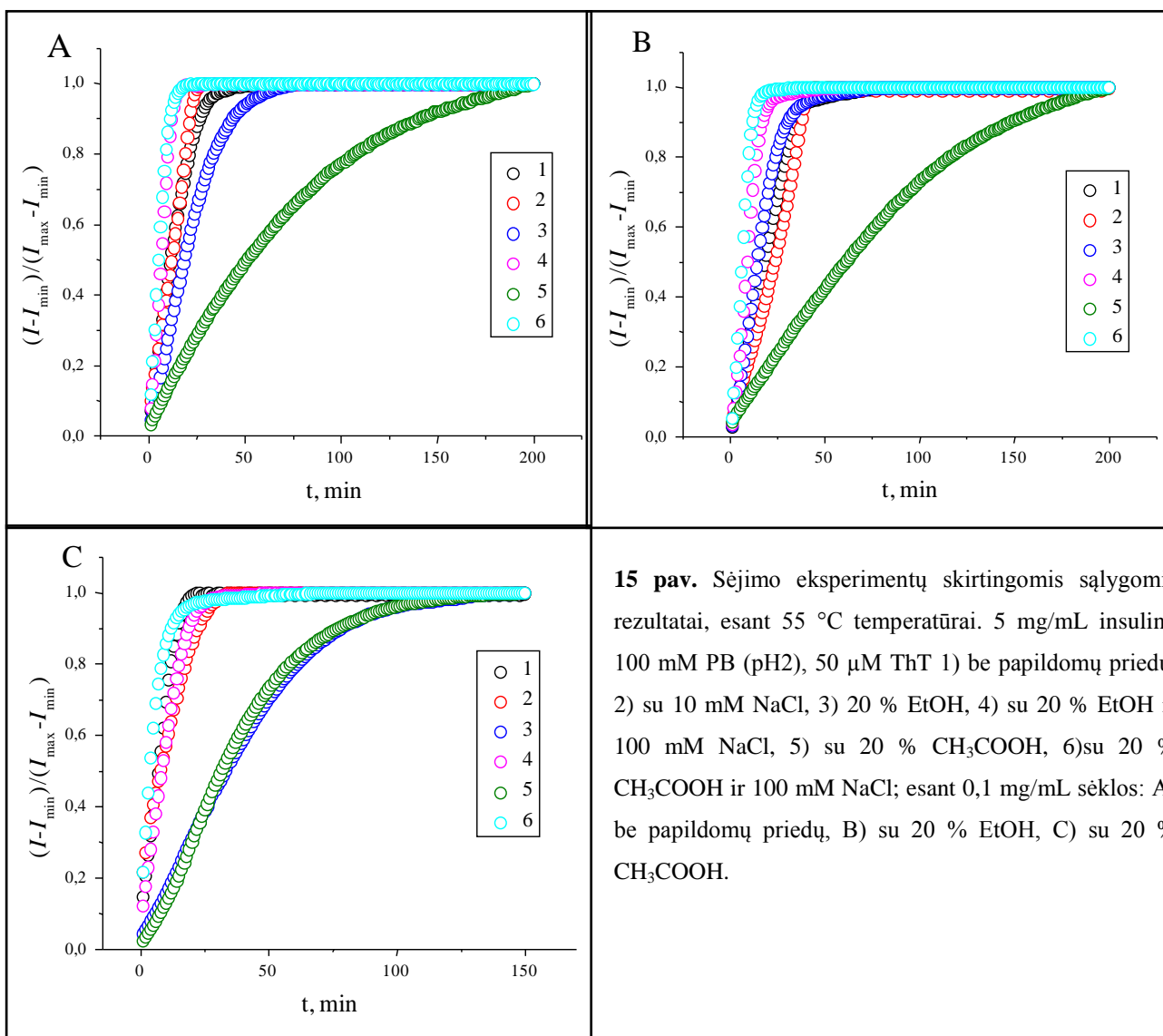
14 pav. Fibrilių ilgėjimo, esant skirtingai monomero koncentracijai, greičiai *Arrhenius* koordinatėse ir apskaičiuotos aktyvacijos energijos.

Atsižvelgus į šiuos duomenis, tolesniems tyrimams buvo pasirinkta didžiausia baltymo koncentracija, t. y., 5 mg/mL. Taip tikėtasi mažesnių eksperimentinių paklaidų.

3.4.2. Fibrilių ilgėjimo skirtingomis sąlygomis tyrimas

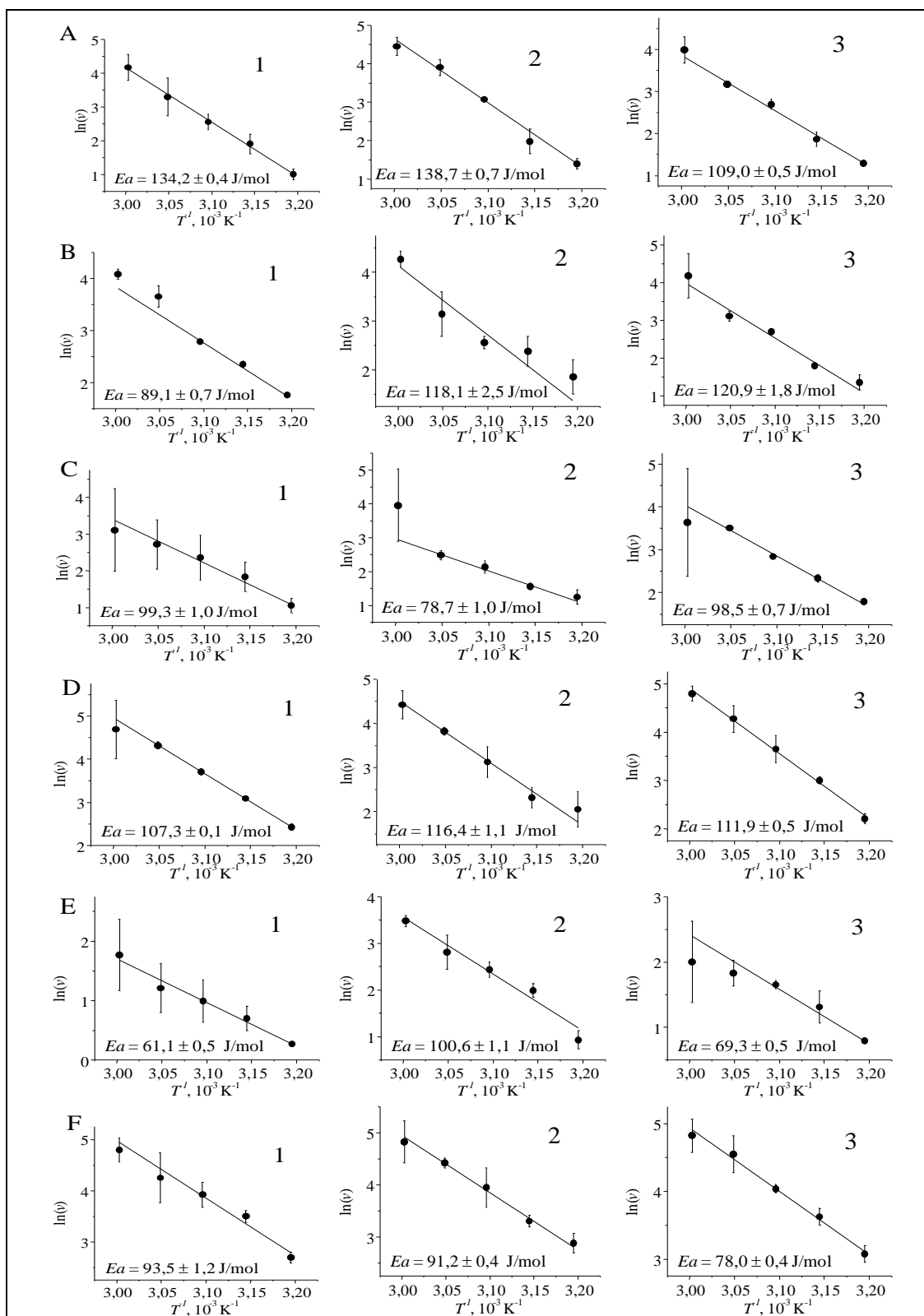
Manoma, kad vykdant baltymo agregaciją skirtingomis sąlygomis, galima gauti skirtingas amiloidines fibriles (šiek tiek pakeista struktūra), kurios gali priversti tą patį baltymą agreguoti skirtingomis kryptimis (Dzwolak *et al.* 2004). Tai yra, amiloidinės fibrilės gali ilgėti išlaikydamos savo formą, nors esamomis sąlygomis monomeras virstų į kitokios formos fibriles.

Darbo metu buvo nuspręsta patikrinti, ar bus matomi fibrilių ilgėjimo termodinamikos skirtumai, reakcijas vykdant su skirtingais monomero tirpalais, t. y., pridėjus skirtingų priedų, kaip etanolis, druska ar acto rūgštis. Buvo atlikti sėjimo eksperimentai, sudarant 6 skirtingas sąlygas (15 pav.). Bandymai vyko 5 skirtingose temperatūrose (40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C).



Iš paveikslėlio matoma, kad visais atvejais monomero tirpaluose su 20 % acto rūgšties elongacija vyksta daug lėčiau, nei kitomis sąlygomis, o druska labai paspartina fibrilių ilgėjimą, net esant monomero tirpale acto rūgšties ar etanolio.

Naudojant apdorotus eksperimentinius duomenis nustatyti greičiai, kurie atidėti *Arrhenius* koordinatėse, apskaičiuotos aktyvacijos energijos (16 pav.). Aiškios koreliacijos nematoma. Įvairūs priedai aktyvacijos energiją sumažina. Reakcijos mišinyje esant monomerui be priedų ir sėklai be priedų ar su 100 mM NaCl, gaunamos didžiausios aktyvacijos energijos. Tai reiškia, kad šioms reakcijoms reikalingas didžiausias energijos kiekis elongacijai pradėti. Tačiau reakcijos mišinyje esant monomerui su 20 % acto rūgšties ir sėklai be papildomų priedų, gaunama mažiausia aktyvacijos energijos reikšmė.



16 pav. Sėjimo eksperimentų, esant skirtingomis sąlygomis, greičiai *Arrhenius* koordinatėse. Monomero tirpalas skirtingomis sąlygomis: A) be papildomų priedų, B) su 10 mM NaCl, C) 20 % EtOH, D) su 20 % EtOH ir 100 mM NaCl, E) su 20 % CH₃COOH, F) su 20 % CH₃COOH ir 100 mM NaCl; sėkla: 1) be papildomų priedų, 2) su 20 % EtOH, 3) su 20 % CH₃COOH.

Palyginus spontaninės agregacijos eksperimentų ir fibrilių ilgėjimo eksperimentų duomenis matoma, kad spontaninės agregacijos aktyvacijos energijos yra žymiai mažesnės. Kadangi spontaninė agregacija vykdoma aukštesnėse temperatūrose nei sėklinė, procesas nereikalauja papildomos energijos baltymo išsivyniojimui. O sėklinės agregacijos atveju, baltymas, prieš prisijungdamas prie fibrilės, turi prarasti savo natyvią struktūrą išsivyniodamas. Todėl procesas reikalauja didesnio aktyvacijos energijos kiekio.

Spontaninės agregacijos metu daugiausiai laiko užima nukleacijos procesas, kuomet fibrilių ilgėjimas beveik neaptinkamas, ir apskaičiuotos aktyvacijos energijos tai gali atspindėti. Sėklinės agregacijos metu galima stebėti fibrilių ilgėjimo procesą, tai atspindi ir apskaičiuotos aktyvacijos energijos. Be to, iš gautų duomenų matyti, jog elongacijos procesas yra labiau priklausomas nuo temperatūros, elongacijos greitis stipriai kinta. Ko negalima matyti spontaninės agregacijos atveju.

IŠVADOS

1. Spontantinės agregacijos metu didžiausia aktyvacijos energija yra reikalinga susidaryti fibrilėms insulino tirpale be papildomų priedų ($90,6 \pm 2,7$ J/mol) bei su 100 mM NaCl ($100,5 \pm 0,9$ J/mol). Kitomis sąlygomis reikalingas žymiai mažesnis energijos kiekis ($29,6 \pm 1,1$ J/mol, $44,6 \pm 1,8$ J/mol, $67,2 \pm 2,4$ J/mol).
2. Stabiliausios fibrilės formuojasi 20 % acto rūgšties, 20 % acto rūgšties ir 100 mM NaCl bei 20 % etanolio ir 100 mM NaCl tirpaluose.
3. Fibrilių ilgėjimo reakcija nepriklauso nuo baltymo koncentracijos, o reakcijos energetiniam barjerui įveikti reikalingas panašus aktyvacijos energijos kiekis (apie 139 J/mol).
4. Fibrilių ilgėjimo reakcijos aktyvacijos energiją įvairūs priedai sumažina. Reakcijos mišinyje esant monomerui be priedų ir sėklai be priedų ar su 100 mM NaCl, elongacijos procesui reikalingas didžiausias energijos kiekis ($134,2 \pm 0,4$ J/mol, $128,7 \pm 0,7$ J/mol). Mažiausias energijos kiekis ($61,1 \pm 0,5$ J/mol) fibrilių ilgėjimui reikalingas monomerui esant 20 % acto rūgštyje su sėkla be papildomų priedų


(Parašas)

LITERATŪRA

1. Aguzzi, A., Calella, A. M. 2009. Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases, *Physiol Rev* vol. 89, p. 1105–1152.
2. Buell, A. K., Blundell, J. R., *et al.* 2010. Frequency Factors in a Landscape Model of Filamentous Protein Aggregation, *PHYSICAL REVIEW LETTERS* vol. 104, 228101(4)
3. Buell, A. K., Dhulesia, A., *et al.* 2012. Detailed analysis of the energy barriers for amyloid fibril growth, *Angew. Chem. Int. Ed.* vol. 51, p. 5247–5251.
4. Chiti, F., Dobson, C. M. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annual Review of Biochemistry* vol. 75, p. 333–366.
5. Cushman, M., Johnson, B. S., *et al.* 2010. Prion-like disorders blurring the divide between transmissibility and infectivity, *Journal of Cell Science* vol. 123, p. 1191–1201.
6. Dzwolak, W., Grudzielanek, S., *et al.* 2005. Ethanol-perturbed amyloidogenic self-assembly of insulin looking for origins of amyloid strains, *Biochemistry* vol. 44, p. 8948–8958
7. Dzwolak, W., Smirnovas, V., *et al.* 2004. Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner an FT-IR spectroscopic study, *Protein Science* vol. 13, p. 1927–1932
8. Frost, B., Diamond, M. I. 2010. Prion-like Mechanisms in Neurodegenerative Diseases, *Nat Rev Neurosci* vol. 11, p. 155–159.
9. Hartl, F. U., Bracher, A., *et al.* 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature* vol. 475, p. 324–332.
10. Hartl, F. U., Hayer-Hartl, M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo, *Nature Structural & Molecular Biology* vol. 16, p. 574–581.
11. Hudson, S. A., Ecroyd, H., *et al.* 2009. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds, *FEBS Journal* vol. 276, p. 5960–5972.
12. Jahn, T. R., Radford, S. E. 2007. Folding versus aggregation Polypeptide conformations on competing pathways, *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 469, p. 100–117.
13. Knowles, T. P. J., Shu, W., *et al.* 2007. Kinetics and thermodynamics of amyloid formation from direct measurements of fluctuations in fibril mass, *PNAS* vol. 104, p. 10016–10021.

14. Lee, C., Nayak, A., *et al.* 2007. A Three-Stage Kinetic Model of Amyloid Fibrillation, *Biophysical Journal* vol. 92, p. 3449–3458.
15. Mauro, M., Craparo, E. F., *et al.* 2007. Kinetics of Different Processes in Human Insulin Amyloid Formation, *J. Mol. Biol.* vol. 366, p. 258–274.
16. Milto. K., Botyriute, A., *et al.* 2013. Amyloid-Like Fibril Elongation Follows Michaelis Menten Kinetics, *PLoS ONE* vol. 8, p. 6864–6867.
17. Nielsen, L., Khurama, R., *et al.* 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation elucidation of the molecular mechanism, *Biochemistry* vol. 40, p. 6036–6046.
18. Qiagen [interaktyvus], [žiūrėta 2014-04-22]. Prieiga per internetą: <<http://www.qiagen.com/products/catalog/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-q#productdetails>>.
19. Sipe, J. D., Cohen, A. S., *et al.* 2000. History of the Amyloid Fibril, *Journal of Structural Biology* vol. 130, p. 88–98.
20. Westermark, T. G., Westermark, P. 2010. Prion-like aggregates: infectious agents in human disease, *Trends in Molecular Medicine* vol. 16, p. 501–507.
21. Zhang, J., Muthukumar, M. 2009. Simulations of nucleation and elongation of amyloid fibriles, *THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS* vol. 130, p. 5102–5118.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju baigiamojo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui, konsultantui Ričardui Mališauskui bei Ksenijai Michailovai už suteiktas žinias, naudingus patarimus bei pastabas baigiamojo bakalauro darbo metu.