



VILNIAUS GEDIMINO TECHNINIS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Tomas Šneideris

**Rekombinantinio amiloido beta gamyba ir potencialių jo agregacijos slopiklių
įvertinimas**

**Production of Recombinant Amyloid Beta Peptide and Evaluation of Potential
Inhibitors of its Aggregation**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

Tomas Šneideris

**Rekombinantinio amiloido beta gamyba ir potencialių jo agregacijos slopiklių
įvertinimas**

**Production of Recombinant Amyloid Beta Peptide and Evaluation of Potential
Inhibitors of its Aggregation**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovas: dr. Vytautas Smirnovas

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantė:

dr. Vaida Buivydienė

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

Bioinžinerijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.

Vilnius

Studentui

Tomui Šneideriui

Baigiamojo darbo (projekto) tema: **Rekombinantinio amiloido beta gamyba ir potencialių jo agregacijos slopiklių įvertinimas**

patvirtinta 2014 m. lapkričio 3 d. dekanų potvarkiu Nr. 320fm

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2015m. birželio 1d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

Pasigaminti rekombinantinio amiloido beta, stebėti pasigaminto rekombinantinio baltymo agregacijos kinetiką ir palyginti gautus rezultatus su aprašomais literatūroje, įvertinti flavonus, kaip potencialius jo agregacijos slopiklius.

Baigiamojo magistro darbo (projekto) konsultantai:

dr. Vaida Buivydienė

Vadovas
(Parašas)

dr. Vytautas Smirnovas

Užduotį gavau

.....
(Parašas)

.....**Tomas Šneideris**.....
(Vardas, pavardė)

.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

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

Antrosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos magistro baigiamasis darbas 4
Pavadinimas **Rekombinantinio amiloido beta gamyba ir potencialių jo agregacijos slopiklių įvertinimas**
Autorius **Tomas Šneideris**
Vadovas **Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Alzheimerio liga – neurodegeneracinė liga, kuria šiuo metu pasaulyje serga apie 24 milijonai žmonių. Svarbiausia šios ligos patloginė ypatybė yra smegenyse plačiai išplitusios senatvinės plokštelės, kurių branduolį sudaro amiloido beta ($A\beta$) peptidų agregatai. Atradus sąsajas tarp Alzheimerio ligos ir $A\beta$ mokslininkai susidomėjo šio peptido agregacijos tyrimais, kuriais siekia išsiaiškinti agregacijos mechanizmus, priežastis ir sąlygas, taip pat labai didelis dėmesys skiriamas agregacijos slopiklių, kurie galėtų būti pritaikyti gydant Alzheimerio ligą ar kaip prevenciniai preparatai, paieškai. Per pastaruosius 30 metų klinikinių tyrimų stadiją pasiekė daugiau nei 200 įvairiausių slopiklių, tačiau nė vienas nebuvo patvirtintas kaip efektyvus ir neturintis šalutinio poveikio slopiklis, kuris būtų tinkamas naudoti gydant Alzheimerio ligą ar kaip prevencinis preparatas.

Darbo metu atlikta rekombinantinio amiloido beta raiška *E. coli* BL(21) Star™ (DE3) kompetentinėse ląstelėse. Vėliau tikslinis baltymas išgrynintas jonų mainų chromatografijos ir gelfiltracijos metodais. Iš viso gauta $9,89 \pm 0,01$ mg gryno $A\beta_{42}$.

Atlikus $A\beta_{42}$ agregacijos kinetikos tyrimus nustatyta, kad $A\beta_{42}$ agregacijos puslaidis eksponentiškai mažėja didėjant $A\beta_{42}$ koncentracijai. Darbo metu gauti $A\beta_{42}$ agregacijos kinetikos tyrimų rezultatai sutampa su aprašomais literatūros šaltiniuose.

Ištyrus 262 flavonų junginių įtaką $A\beta_{42}$ agregacijai, nustatyta, kad nė vienas flavonas nepasižymėjo $A\beta_{42}$ agregaciją slopinančiu poveikiu.

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

Darbo apimtis 56 p. teksto be priedų, 21 paveikslas, 7 lentelės, 92 bibliografinis šaltinis.

Atskirai pridedami darbo priedai.

Prasminiai žodžiai: Amiloidas beta, amiloidas, gryninimas, agregacija, slopikliai, slopinimas, flavonai.

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

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

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master Graduation Thesis 4
Title **Production of Recombinant Amyloid Beta Peptide and Evaluation of Potential Inhibitors of its Aggregation**
Author **Tomas Šneideris**
Academic supervisor **Vytautas Smirnovas**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease, currently affecting 24 million people worldwide. The most important pathological feature of this disease is widespread senile plaques in human brain. Senile plaques are mainly composed of aggregated amyloid beta. The discovery of the link between Alzheimer's disease and aggregation of amyloid beta led to studies of amyloid beta aggregation. Scientists try to understand mechanisms, causes and conditions of amyloid beta aggregation and also try to find inhibitors of amyloid beta aggregation, which could be used as therapeutic or preventive agents in treatment of Alzheimer's disease. Unfortunately, during past 30 years out of 200 inhibitors, that reached clinical trial stage, none was confirmed as safe and effective to use.

During this work recombinant amyloid beta was expressed in E. coli BL (21) Star™ (DE3) cell strain. Later it was purified by ion exchange chromatography and gelfiltration. A total of $9,89 \pm 0,01$ mg of pure recombinant amyloid beta was produced.

Studies of A β 42 aggregation kinetics' showed that halftime of aggregation decreases exponentially with increasing concentration of amyloid beta. Results of A β 42 aggregation kinetics' achieved during this work are similar to one's described in literature sources.

262 flavone derivatives were studied as potential inhibitors of A β 42 aggregation. None of these flavones inhibited amyloid beta aggregation.

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

Thesis consist of: 56 p. text without appendixes, 21 picture, 7 tables, 92 bibliographical entries.

Keywords: Amyloid beta, amyloid, purification, aggregation, inhibitors, inhibition, flavones.

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Tomas Šneideris, 20093162

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIfm-13

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2015 m. gegužės 11 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Rekombinantinio amiloido beta gamyba ir potencialių jo agregacijos slopiklių įvertinimas“ patvirtintas 2014 m. lapkričio 3 d. dekanų potvarkiu Nr. 320fm, 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: dr. Vaida Buivydienė. Mano darbo vadovas Vytautas Smirnovas.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs (usi).

(Parašas)

Tomas Šneideris
(Vardas ir pavardė)

(the document of Declaration of Authorship in the Final Degree Paper)

VILNIUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY

Tomas Šneideris, 20093162

(Student's given name, family name, certificate number)

Faculty of Fundamental Sciences

(Faculty)

Bioengineering, BIfm-13

(Study programme, academic group no.)

**DECLARATION OF AUTHORSHIP
IN THE FINAL DEGREE PAPER**

May 11, 2015

I declare that my Final Degree Paper entitled „Production of Recombinant Amyloid Beta Peptide and Evaluation of Potential Inhibitors of its Aggregation“ is entirely my own work. The title was confirmed on November 3, 2014 by Faculty Dean's order No. 320fm. I have clearly signalled the presence of quoted or paraphrased material and referenced all sources.

I have acknowledged appropriately any assistance I have received by the following professionals/advisers: Dr Vaida Buivydienė.

The academic supervisor of my Final Degree Paper is Vytautas Smirnovas.

No contribution of any other person was obtained, nor did I buy my Final Degree Paper.

(Signature)

Tomas Šneideris
(Given name, family name)

Turinys

Įvadas.....	11
1. Literatūros apžvalga.....	13
1.1. Amiloidas beta.....	13
1.1.1. Amiloido beta sintezė	13
1.1.2. Amiloido beta degradacija	15
1.1.3. Amiloido beta funkcija	16
1.1.4. Amiloido beta agregacija ir susidariusių agregatų toksiškumas	17
1.1.5. Sintetinis ir rekombinantinis amiloidas beta.....	23
1.2. Amiloido beta agregacijos tyrimai	24
1.3. Amiloido beta agregacijos slopikliai	26
1.3.1. Trumpi peptidai.....	26
1.3.2. Mažos molekulės	27
2. Medžiagos ir metodai.....	29
2.1. Aparatūra, medžiagos	29
2.1.1. Reagentai	29
2.1.2. Laboratorinė įranga.....	29
2.1.3. Buferiniai tirpalai	30
2.1.4. Sorbentai	30
2.1.5. Kompetentinės ląstelės	30
2.1.6. Konstruktas	30
2.1.7. Mitybinės terpės.....	30
2.2. Metodai.....	31
2.2.1. Transformacija	31
2.2.2. Raiška.....	31
2.2.3. Amiloido beta gryninimas	31
2.2.4. Mėginių analizė Tricino-NDS-PAAG elektroforezės metodu.....	33
2.2.5. Agregacijos tyrimai.....	33
2.2.6. Agregacijos tyrimai su flavonais	33
2.2.7. Eksperimentinių duomenų aprodojimas	33
2.2.8. Atominės jėgos mikroskopija	34
3. Rezultatai ir jų aptarimas	35
3.1. Rekombinantinio amiloido beta raiška ir gryninimas.....	35
3.1.1. Rekombinantinio Aβ42raiška	35
3.1.2. Amiloido beta gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu	36
3.1.3. Amiloido beta gryninimas gelfiltracijos metodu	37
3.2. Amiloido beta agregacijos tyrimas	40
3.2.1. Agregacijos puslaikio priklausomybė nuo Aβ42 koncentracijos	40
3.3. Flavonų, kaip potencialių amiloido beta agregacijos slopiklių įvertinimas	43
3.3.1. DMSO įtaka amiloido beta agregacijai.....	43
3.3.2. Flavonų įtakos amiloido beta agregacijai tyrimas	43
Išvados.....	48
Literatūros sąrašas	49
Priedai.....	58

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- 021165 – skutelareinas (5,6,7,4'-tetrahidroksiflavonas)
- 19-319 – 6-bromo-2'-metilflavonas
- 22-335 – 3,6,3'-trimetoksiflavonas
- 22-382 – 3,2',4',5'-tetrametoksiflavonas
- 22-387 – 3,6,2',4',5'-pentahidroksiflavonas
- AL – Alzheimerio liga
- AMP – antimikrobinis baltymas
- APOE – apolipoproteino E receptorius
- APP – amiloido beta pirmtakas
- A β – amiloidas beta
- A β 42 – amiloido beta peptidas sudarytas iš 42 amino rūgščių
- B-105 – 3'-benziloksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavonas
- CHD – centriniai hidrofobiniai domenai
- D-425 – 3,6-dimetoksiflavonas
- DMSO – dimetilsulfoksidas
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druskos dihidratas
- G-002 – gossipinas (3,3',4',5,7,8-heksahidroksiflavonas-8-gliukosidas)
- G-500 – gossipetinas (3,5,7,8,3',4'-heksahidroksiflavonas)
- GuHCl – guanidino hidrochloridas
- HIFP – heksafluorizopropanolis
- IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozido
- IR – insulino receptorius
- K-001 – karanjinas, 3-metoksi furano - 2, 3, 7, 8-flavonas
- L-101 – luteolinas, 5,7,3',4'-tetrahidroksiflavonas
- NGF – nervų augimo faktorius
- NMDAR – N-metil-D-aspartato receptorius
- P-102 – kuercetinas (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavonas)
- p75NTR – p75 neurotrofino receptorius
- PrP^C – ląstelinis prioninis baltymas
- RAGE – nefermentinio galutinio glikozilinimo produktų receptorius
- ROS – reaktyvaus deguonies formos
- T-410 – 7,8,2'-Trihidroksiflavonas

TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametiletano-1,2-diaminas

TFA – trifluoracto rūgštis

TFE – trifluoretanolis

ThT – Tioflavinas–T

Tricino-NDS-PAAG – tricino-natrio dodecilsulfato-poliakrilamido gelis

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas

$\alpha 7nAChR$ – 7 nikotino acetilcholino receptorius

Įvadas

Amiloidai – netirpūs fibriles formuojančių baltymų agregatai, kuriuos tarpusavyje sieja panašios struktūrinės savybės. Iki šiol nustatyta virš 20 biochemiškai skirtingų amiloidinių baltymų iš kurių kiekvienas yra susijęs su unikaliu klinikiu sindromu (Sipe, Cohen, 2000; Teplow, 2006).

Terminas amiloidas (lot. – *amylum*, gr. – *amylon* (krakmolas)) pirmą kartą paminėtas 1854 metais vokiečių mokslininko Rudolfo Virchovo (Sipe, Cohen, 2000). Pastaruoju terminu Virchovas pavadino makroskopines audinių anomalijas, kurios, panaudojus teigiamą jodo dažymo reakciją, nusidažydavo violetine spalva. Remdamasis teigiama spalvine reakcija Virchovas padarė išvadą, jog amiloidai yra sudaryti iš krakmolo. 1859 metais Friedreichas ir Kekulė tyrinėdami amiloidus mėginiuose aptiko didelius kiekius azoto, pastarasis atradimas mokslininkams leido padaryti išvadą, jog amiloidai yra sudaryti iš baltymų, o ne iš angliavandenių, kaip buvo manyta anksčiau (Prusiner, 2013; Sipe, Cohen, 2000).

Viena iš amiloidinių baltymų sukeltų ligų yra Alzheimerio (AL). Remiantis naujausiais duomenimis šiuo metu pasaulyje šia neurodegeneracine liga serga apie 24 milijonai žmonių (Reitz, Mayeux, 2014). AL dažniausiai serga senyvo amžiaus žmonės. Šiai ligai yra būdinga neurofibrilinių tinklų, kuriuos sudaro susivijusios nenormalaus *tau* baltymo gijos, formavimasis, neuronų praradimas bei daugelio neuromediatorinių sistemų sutrikimai. Tačiau svarbiausia patologinė ypatybė yra smegenyse plačiai išplitusios senatvinės plokštelės (angl. *Senile plaques*). Senatvinės plokštelės yra sudarytos iš įvairių baltymų, tačiau jų branduolį sudaro amiloido beta (A β) peptidų agregatai, kuriuos 1984 m. nustatė Glenneris ir Vongas (Braak, Del Tredici, 2011; Duran-Aniotz et al., 2013; Plečkaitytė, 2010; Selkoe, 1994; Takahashi et al., 2002; Wilson et al., 2013).

Mokslininkai, tyrinėjantys amiloidą beta ir jo agregaciją, susiduria su įvairiomis problemomis. Viena iš pagrindinių problemų yra duomenų atsikartojamumas ir patikimumas (Teplow, 2006). Dauguma mokslininkų tyrimams naudoja cheminės sintezės būdu pagamintą amiloidą beta, tačiau sintetinio baltymo naudojimas turi keletą trūkumų. Vienas iš trūkumų yra pats cheminės sintezės procesas, atliekant cheminę baltymo sintezę gaunamas produktas niekada nebus 100 % grynas (Teplow, 2006). Kita problema yra tai, jog po sintezės baltymas yra liofilizuojamas ir prieš tyrimus turi būti tirpinamas tirpiklyje, kuris suardytų amiloido beta agregatus iki monomerų. Liofilizuoto amiloido beta tirpinimui mokslininkai naudoja įvairius tirpiklius: dimetilsulfoksidą (DMSO) (Lambert et al., 2001; Stine et al., 2003; Wang et al., 2002), trifluoretanolį (TFE), heksafluorizopropanolį (HIFP) (Zagorski, Barrow, 1992; Zagorski et al., 1999) ir natrio šarmą

(NaOH) (Fezoui et al., 2000). Amiloido beta įgaunama erdvinė struktūra yra priklausoma nuo aplinkos sąlygų (Crescenzi et al., 2002; Sgourakis et al., 2011, 2007), todėl naudojant tokią įvairovę tirpiklių gaunami skirtingą erdvinę struktūrą įgavę monomerai, kurių agregacijos pobūdis skirsis (Teplow, 2006). Rekombinantinio amiloido beta naudojimas tarp mokslininkų nebuvo populiarus dėl sudėtingos gryninimo metodikos. Tačiau neseniai viskas pasikeitė kai 2009 metais Valšas su kolegomis pasiūlė greitą ir našią rekombinantinio amiloido beta gryninimo metodiką, kuria naudojantis yra gaunamas grynas amiloidas beta tinkamas agregacijos tyrimams (Walsh et al., 2009). Naudojantis pastarąja gryninimo metodika mokslininkai tiriantys amiloido beta agregaciją sugebėjo gauti gerai atsikartojančius kinetinius duomenis (Hellstrand et al., 2010).

Nuo amiloido beta susiejimo su Alzheimerio liga atlikta daugybė tyrimų, kurių metu buvo nustatytas A β sintezės kelias (Koo, Squazzo, 1994; LaFerla et al., 2007; D. Selkoe, 1994; Shoji et al., 1992), atlikti A β erdvinės struktūros paieškos tyrimai, kurių metu nustatyta, jog A β antrinės struktūros elementų susidarymas ir išsidėstymas erdvėje labai priklauso nuo aplinkos sąlygų (Crescenzi et al., 2002; Sgourakis et al., 2011, 2007), taip pat atlikta galybė amiloido beta neurotoksiškumo tyrimų, kurių metu buvo tirtas A β oligomerų bei fibrilių neurotoksiškumas (Hoshi et al., 2003; Kirkitadze et al., 2002; Klein et al., 2004; Taylor et al., 2003; Teplow, 2006; Walsh, Selkoe, 2004; Walsh et al., 1999). Labai didelis dėmesys skiriamas A β agregacijos slopiklių paieškai. Kaip slopiklius bandoma panaudoti įvairias mažos molekulinės masės molekules (Doig, 2013) bei trumpus peptidus, kurie sąveikautų su A β monomerais ir neleistų jiems agreguoti (Neddenriep et al., 2011; Viet et al., 2011), tačiau iki šių dienų nėra atrastas nė vienas efektyvus ar neturintis šalutinio poveikio vaistinis preparatas (Doig, Derreumaux, 2015). Literatūroje kaip potencialūs slopikliai yra įvardinami flavonai, tačiau yra aprašomas tik kelių flavonų poveikis amiloido beta agregacijai (Akaishi et al., 2008; Sharoar et al., 2012; Ushikubo et al., 2012). Pastarieji autoriai slopinimo poveikiu laiko tik amiloidams specifinio fluorescencinio dažo Tioflavino–T (ThT) fluorescencijos intensyvumo sumažėjimą, o tai buvo neseniai parodyta kaip nevisai korektiškas metodas slopinimui įvertinti (Malisaukas et al., 2015). Todėl, norint tinkamai įvertinti flavonus kaip potencialius amiloido beta agregacijos slopiklius, reikia atlikti platesnius tyrimus.

Šio darbo tikslas yra rekombinantinio amiloido beta gamyba ir jo agregacijos slopinimo tyrimai.

Tad iškeliami tokie uždaviniai:

1. Pasigaminti rekombinantinio amiloido beta.
2. Stebėti pasigaminto rekombinantinio baltymo agregacijos kinetiką ir palyginti gautus rezultatus su aprašomais literatūroje.
3. Įvertinti flavonus kaip potencialius amiloido beta agregacijos slopiklius.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Amiloidas beta

Amiloidas beta – trumpas, bestruktūris peptidas, sudarytas iš 39-43 amino rūgščių, kuris gaunamas proteolitiškai skaldant A β pirmtaką – APP (angl. *amyloid precursor protein*) baltymą. Žmogaus organizme daugiausiai gaminama A β 40 ir A β 42 peptidų, kuriuos atitinkamai sudaro 40 ir 42 amino rūgštys (**1 pav.**), tačiau retais atvejais pasitaiko trumpesnių (39 a. r.) ir ilgesnių (43 a. r.) amiloido beta peptidų (Hamley, 2012).



1 pav. A β 40 ir A β 42 aminorūgščių seka

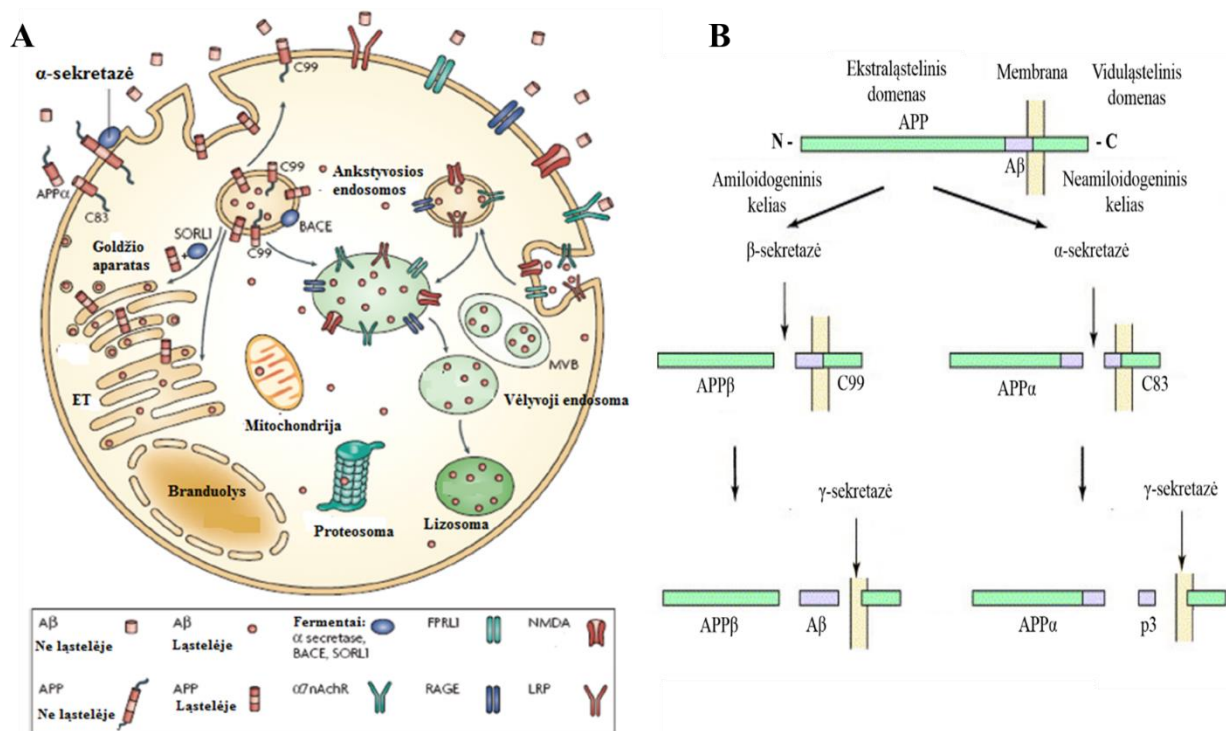
Peptidų ilgis priklauso nuo γ -sekretazės, kuri APP proteolizės metu gali kirpti keliose vietose. Vandeninguose tirpaluose A β 40 yra bestruktūris, o A β 42, kuomet pH yra artimas fiziologiniam, greitai įgauna β klostytą struktūrą. Manoma, jog A β 42 β klostytos konformacijos susidarymas yra inicijuojamas β posūkio, kuris susidaro tarp 23 ir 28 amino rūgščių (Finder, Glockshuber, 2007). Amiloido beta peptidų agregacija ir netirpių agregatų susidarymas yra siejamas su neurodegeneraciniais sutrikimais ir Alzheimerio liga. 90 % žmogaus organizme sintetinamo amiloido beta sudaro A β 40 ir tik 10 % A β 42, tačiau pastarasis peptidas žymiai greičiau agreguoja ir sudaro fibriles ir todėl yra laikomas pavojingesniu (Hamley, 2012).

1.1.1. Amiloido beta sintezė

APP yra labai konservatyvus baltymas, kuris priklauso pirmajai transmembraninių glikoproteinų šeimai. Jį sudaro 590–680 aminorūgščių ekstraląstelinis domenas bei 55 aminorūgščių viduląstelinis domenas. Žmogaus smegenyse yra randamos trys APP izoformos: APP695, APP751 ir APP770. APP695 yra trumpiausia iš trijų izoformų ir daugiausia yra sintetinama neuronuose, o APP751 ir APP770 daugiausia aptinkamos glijos ląstelėse. Visos trys APP izoformos turi A β domeną, todėl yra potencialiai amiloidogeninės. Natūralios APP funkcijos kol kas nėra žinomos, tačiau yra iškelta hipotezė, jog šis baltymas gali veikti kaip motorinio baltymo kinezino–I transportinių pūslelių receptorius (Hamley, 2012; D. Selkoe, 1994; Takahashi et al., 2002; Vardy et al., 2005).

APP susintetintas endoplazminiame tinkle keliauja į goldžio aparatą, kur yra modifikuojamas, tuomet transportinėmis pūslelėmis pernešamas į plazminę membraną. APP esantis ląstelės paviršiuje gali būti inkorporuotas į endosominę-lizosominę sistemą, kur bus sudegraduotas. Vykstant šiam APP apykaitos ciklui amiloido beta peptidai gali būti sintetinami bent trijose ciklo

dalyse: endoplazminiame tinkle, goldžio aparate, endosminėje-lizosminėje sistemoje (**2 pav. A**). Tiek A β 40, tiek A β 42 peptidai gali būti sintezuojami ląstelės viduje. Didžioji dalis ląstelėje sintetinamų A β peptidų yra sekretuojami, tačiau dalis gali likti ir ląstelės viduje (Hamley, 2012; Vardy et al., 2005).



2 pav. Amiloido beta sintezė žmogaus organizme. A – Viduląstelinio ir ekstraląstelinio A β sintezės kelias (Adaptuota iš (Hamley, 2012)). B – APP proteolizė (Adaptuota iš (Vardy et al., 2005))

APP lokalizuotas plazminėje membranoje yra skaldomas α -sekretazės. Po skaldymo yra gaunamas tirpus APP α fragmentas kuris keliauja į ekstraląstelinę erdvę bei C83 fragmentas, kuris pasilieka membranoje (**2 pav. A ir B**). α -sekretazės neapdorotas APP yra inkorporuojamas į ankstyvųjų endosomų plazminę membraną, kur esant SORL1 faktoriui, bus grąžinamas į goldžio aparatą. Ankstyvosios endosomos turi geną BACE1, kuris koduoja β -sekretazę, todėl APP, kuris nėra nukreipiamas grąžinimui į goldžio aparatą, yra skaldomas β -sekretazės. Po skaldymo yra gaunamas tirpus APP β fragmentas bei C99 fragmentas (**2 pav. A ir B**). C99 fragmentas gali būti pernešamas į endoplazminį tinklą, endosomine-lizosomine sistemą arba plazminę membraną, kur yra suskaldomas γ -sekretazės. Po skaldymo γ -sekretaze yra gaunami A β 40 ir A β 42 peptidai, kurie transportinių pūslelių pagalba gali būti pernešti į ekstraląstelinę erdvę. Ekstraląsteliniai A β peptidai gali sąveikauti su ląstelės paviršiaus receptoriais: RAGE, LRP, FPRL1, NMDA, α 7nAChR, A β peptido – receptoriaus kompleksas yra inkorporuojamas į ankstyvasias endosomas. Didžioji dalis A β peptidų ląstelėje yra sekretuojami sekrecinėse pūslelėse ir lizosomose, tačiau

gali būti sekretuojami ir endoplazminiame tinkle, goldžio aparate, mitochondrijose bei citozolyje (2 pav. A) (Hamley, 2012; Vardy et al., 2005).

1.1.2. Amiloido beta degradacija

Amiloido beta gamyba ir degradacija organizme vyksta nepertraukiamai. Esant normaliai A β peptidų koncentracijai ir A β 40/A β 42 santykiui (9:1), A β katabolizmas vyksta normaliai. Pastarųjų peptidų degradacijoje dalyvauja daugybė proteazių, iš kurių kiekviena turi tam tikras jai būdingas savybes (1 lentelė) (Saido, Leissring, 2012). Tačiau organizme staigiai pasikeitus A β 40/A β 42 santykiui, padidėjus A β koncentracijai ar sumažėjus proteazių raiškos lygiui ar aktyvumui proteazės nespėja šalinti amiloido beta pertekliaus, A β peptidai greitai agreguoja ir formuoja fibriles, kurios yra atsparios proteazių poveikiui. Didelio kiekio netirpių agregatų atsiradimas nervinėse ląstelėse sukelia neurodegeneracinius pažeidimus, dėl kurių išsivysto Alzheimerio liga (Saido, Leissring, 2012).

1 lentelė. Proteazės dalyvaujančios A β peptidų degradacijoje. Eks – ekstraląstelinė erdvė. ET – endoplazminis tinklas. GA – goldžio aparatas. Endo – endosomos. Lizo – lizosomos. Mito – mitochondrijos. Cito – citoplazma (Adaptuota iš (Saido, Leissring, 2012))

Tipas	Proteazė	Lokalizacija
Metalo	NEP	Eks, ET, GA
	NEP2	Eks, ET, GA
	hMMEL	Eks, ET, GA
	ECE1	Eks, ET, GA, Endo
	ECE2	Eks, ET, GA, Endo
	ACE	Eks, ET, GA
	MMP2	Eks, ET, GA
	MMP9	Eks, ET, GA
	MMP14/MT MMP	Eks, ET, GA
	CD147/EMMRIN	Eks, ET, GA, Endo
	IDE	Eks, ET, GA, Endo Lizo, Mito
Serino	Plazmino	Eks, ET, GA
	Acilpeptido hidrolazė	Eks, Cito
	Mielino bazinis baltymas	Eks, ET, GA
Asparto	Katepsinas D	Eks, Lizo
	BACE1	Eks, Lizo
	BACE2	Eks, Lizo
Cisteino	Katepsinas B	Eks, Endo, Lizo
Treonino	Proteasoma	Cito
Kiti	Katalininiai antikūniai	-

A β katabolizmas priklauso ne tik nuo daugelio proteazių, bet ir nuo įvairių eliminavimo procesų tarpusavio sąveikų. Eliminavimo procesai susiję su A β katabolizmu: difuzija, aktyvi ir pasyvi pernaša, baltymo-baltymo sąveika, agregacija bei sekrecija. Visi šie procesai veikia vienu metu, sudarydami įvairius kompleksinius ryšius. Vienų ar kitų procesų tarpusavio sąveikos priklauso nuo ląstelės regiono bei subląstelinų skyrių (angl. *subcellular compartment*) (Saido, Leissring, 2012).

1.1.3. Amiloido beta funkcija

Nuo amiloido beta susiejimo su Alzheimerio liga didžiausias dėmesys skiriamas A β agregacijos tyrimams. Tačiau ir sveikame organizme yra aptinkami maži (pikomoliniai) A β kiekiai. Mažomis koncentracijomis amiloidas beta nėra kenksmingas, tačiau mokslininkams pabandžius visiškai panaikinti A β raišką slopinant β arba γ sekretazes arba pašalinant geną, koduojantį APP, pastebėta, jog žūva nervinės ląstelės, o pridėjus fiziologinius kiekius A β nervinių ląstelių žūtis buvo išvengiama. Pastarieji tyrimai leido daryti išvadą, jog A β yra svarbus gyvybinei funkcijai palaikyti (Cárdenas-Aguayo et al., 2014; Pearson, Peers, 2006). Nuo amiloido beta atradimo praėjo 30 metų, tačiau per šį laikotarpį buvo iškeltos tik kelios hipotezės, kuriose aprašomos galimos fiziologinės A β funkcijos .

Viena iš galimų amiloido beta fiziologinių funkcijų yra sinapsinio aktyvumo reguliavimas. Mokslininkai pastebėjo, jog padidėjus sinapsiniam aktyvumui išauga ir amiloido beta raiška. Tuomet atlikus detalesnius tyrimus nustatyta, kad A β slopina sinapsinį aktyvumą, taip galbūt apsaugodamas nervines ląsteles nuo per didelio sinapsinio aktyvumo sukeliama ekscitotoksiškumo (nervinių ląstelių pažeidimų ar mirties) (Cárdenas-Aguayo et al., 2014; Pearson, Peers, 2006).

Moksliniais tyrimais nustatyta, jog A β monomerai slopina neuronų žūtį, kurią sukelia Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ indukuojamas deguonies radikalų susidarymas, tačiau neapsaugo nuo H₂O₂ daromos žalos. Taip pat nustatyta, jog A β agregatai pasižymi priešingu poveikiu, t. y. skatina deguonies radikalų susidarymą. Remiantis pastaraisiais tyrimais buvo iškelta hipotezė, jog amiloidas beta veikia kaip antioksidantas prieš metalo jonų indukuojamą deguonies radikalų susidarymą (Baruch-Suchodolsky, Fischer, 2009; Zou et al., 2002).

2010 m. Soscia kartu su bendradarbiais tyrinėdami A β funkcijas pastebėjo, jog literatūroje aprašomos biocheminės ir fizikocheminės A β savybės yra labai panašios į antimikrobinių baltymų (AMP – angl. *antimicrobial protein*). Pastebėjus šiuos panašumus tyrėjai nusprendė palyginti A β ir žmogaus organizme sintetinio AMP – katelicidino LL-37 antimikrobines savybes *in vitro*. Antimikrobinės savybės buvo tiriamos nustatant minimalias A β ir katelicidino LL-37 slopinimo koncentracijas, t. y. kokios vieno ar kito peptido koncentracijos užtenka tam, kad auginamoje bakterijų kultūroje nustotų daugintis mikroorganizmai. Tyrimai buvo atlikti su 12 skirtingų mikroorganizmų. Amiloido beta peptidai sėkmingai slopino 8 iš 12 tirtų mikroorganizmų augimą. Minimali amiloido beta koncentracija, kurios užteko tam, kad būtų sustabdytas tam tikro mikroorganizmo augimas buvo mažesnė arba panaši į katelicidino LL-37 (**2 lentelė**) (Soscia et al., 2010).

2 lentelė. Antimikrobinis A β poveikis (Adaptuota iš (Soscia et al., 2010))

Mikroorganizmas	Minimali slopinanti koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)		
	A β 40	A β 42	LL-37
<i>Candida albicans</i>	0,78	0,78	6,25
<i>Escherichia coli</i>	1,56	1,56	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50	3,13	25
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12,5	6,25	1,56
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	6,25	6,25
<i>Listeria monocytogenes</i>	25	6,25	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	50	6,25	6,25
<i>Streptococcus agalactiae</i>	50	12,5	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>50	>50	6,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>50	>50	6,25
<i>Streptococcus mitis</i>	50	>50	6,25
<i>Streptococcus salivarius</i>	>50	>50	50

Gavę tokius rezultatus tyrėjai padarė išvadą, jog viena iš amiloido beta funkcijų *in vivo* galėtų būti antimikrobinė.

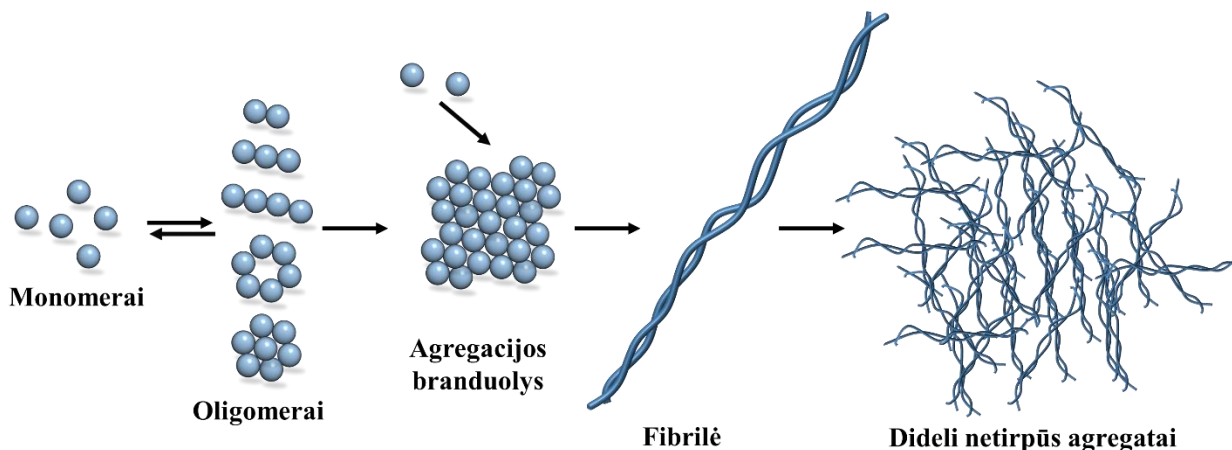
Brajanas Malonėjus kartu su kolegomis, panaudoję elektforezinio mobilumo poslinkio bei chromatino imunoprecipitacijos metodus nustatė, jog esant oksidaciniam stresui A β peptidai gali patekti į branduolį ir sąveikauti su specifine DNR seka esančia APP ir BACE1 genų promotoriuose. A β prisijungimas prie promotorių indukuoja APP ir BACE1 genų raišką, todėl ląstelėje išauga APP bei β -sekretazės kiekiai, o tai lemia A β koncentracijos išaugimą. Taigi tyrėjai padarė išvadą, jog A β gali veikti kaip transkripcijos faktorius, kuris esant tam tikroms sąlygoms indukuoja savo paties sintezę (Bailey et al., 2011; Maloney, Lahiri, 2011).

A β peptidas, APP ir padidėjęs cholesterolio lygis yra siejami su Alzheimerio liga. Nustatyta, jog padidėjęs cholesterolio lygis lemia padidėjusią APP raišką, todėl per pastarąjį dešimtmetį buvo atlikta keletas tyrimų, kurių metu buvo bandoma išsiaiškinti A β daromą įtaką cholesterolio lygio pokyčiams. Šių tyrimų metu buvo nustatyta, jog A β sąveikauja su transportiniu cholesterolio baltymu kaveolinu-1 ir priverčia jį pernešti cholesterolį iš plazminės membranos į goldžio kompleksą, taip pat nustatyta, jog A β 40 slopina cholesterolio ir žemo tankio lipoproteinų sąveiką, taip sumažindamas cholesterolio įnašą bei koncentraciją ląstelėje. Remiantis šiais tyrimais buvo iškelta hipotezė, jog A β peptidas veikia kaip cholesterolio transporto reguliatorius (Igbavboa et al., 2009; Yao, Papadopoulos, 2002).

1.1.4. Amiloido beta agregacija ir susidariusių agregatų toksiškumas

Neurotoksinis amiloido beta poveikis pasireiškia nervinėse ląstelėse ar aplink jas susiformavus toksiškiems A β oligomerams ir fibrilėms. Amiloido beta agregacijos procesas prasideda nuo monomerų, kurie yra bestruktūriai ir egzistuoja kaip daugybės konformerų mišinys. Organizme sutrikus amiloido beta apykaitai ir stipriai padidėjus jo koncentracijai ar išaugus A β 42/A β 40 santykiui, monomerai ima jungtis tarpusavyje bei formuoti trumpai egzistuojančius oligomerus, kurie gali disocijuoti į monomerus arba jungtis tarpusavyje ir formuoti agregacijos branduolį,

kuriame tarp $A\beta$ molekulių susiformuoja β klostės. Susidaręs stabilus agregacijos branduolys sugeba greitai prisijungti $A\beta$ monomerus pakeisdamas jų konformaciją į β klostytą. Prisijungdamas monomerus branduolys greitai ilgėja kol suformuoja fibrilę. Galiausiai fibrilių sankaupos sudaro didelius netirpius agregatus, kurie žmogaus smegenyse dar vadinami senatvinėmis plokštelėmis (**3 pav.**) (Finder, Glockshuber, 2007; Hayden, Teplow, 2013).



3 pav. Amiloido beta agregacijos schema

Toksiški oligomerai ir fibrilės gali susidaryti dėl kelių priežasčių: padidėjusios amiloido beta koncentracijos arba pasikeitusio santykio tarp $A\beta_{40}$ ir $A\beta_{42}$. Abi priežastys gali atsirasti dėl organizmo senėjimo, paveldimų genetinių mutacijų, Dauno sindromo ar galvos traumų. Šiai dienai yra nustatyta penkiolika paveldimų genetinių mutacijų, kurios sukelia Alzheimerio ligą (**3 lentelė**) (Kayed, Lasagna-Reeves, 2012).

3 lentelė. APP baltymą koduojančio geno mutacijos (Adaptuota iš (D. J. Selkoe, Podlisny, 2002))

Mutacija	Pasekmė	Alzheimerio ligos pasireiškimas (žmogaus amžius, metais)
K/M670/1N/L (Švediška)	Išaugusi $A\beta$ koncentracija	44–61
A692G (Flamandų)		40–60
E693Q (Olandiška)		45–60
D694N (Ajosos)		50–60
E693K (Itališka)	Sumažėjusi $A\beta$ koncentracija, tiesių, trumpų fibrilių susidarymas	60–70
E693G (Arktinė)	Sumažėjusi $A\beta$ koncentracija, protofibrilių formavimasis	54–61
T714I (Austriška)		~34
V715M (Prancūziška)		40–60
V715A (Vokiška)		Nėra duomenų
I716V (Floridos)		~53
V717I (Londono)	Išaugęs $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ santykis	39–60
V717F (Indianos)		~43
V717G		40–67
V717L		36–39
L723P (Australiška)		56

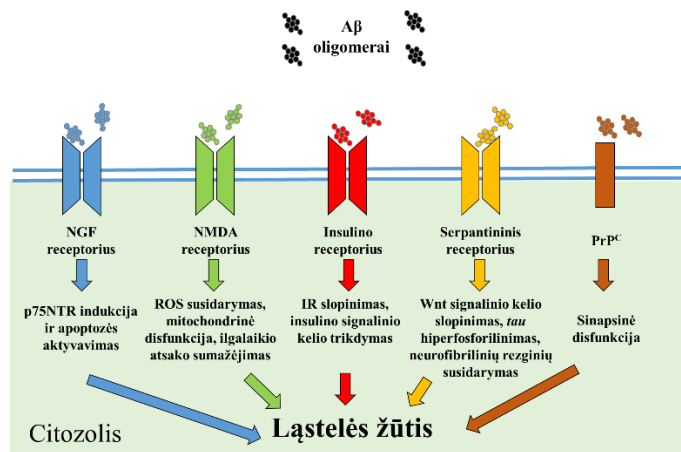
Šiuo metu manoma, jog trumpai egzistuojantys $A\beta$ oligomerai yra pagrindinė toksiška $A\beta$ rūšis, o susiformavusios netirpios fibrilės – antrinė (Kayed, Lasagna-Reeves, 2012), tačiau ši nuomonė

kol kas nėra vieninga, nes nėra pakankamai įrodymų, kurie leistų galutinai nuspręsti oligomerai ar fibrilės yra pagrindiniai Alzheimerio ligos sukėlėjai (Hayden, Teplow, 2013).

Oligomerai

Ląstelės išorėje susiformavę 10-100 kDa Aβ oligomerai gali sąveikauti su ląstelės paviršiuje esančiais receptoriais bei trikdyti jų funkcijas, taip sukeldami sinapsinę disfunkciją, įvairius neurodegeneracinius procesus bei galiausiai ląstelės žūtį. Oligomerų struktūra kol kas nėra tiksliai žinoma dėl oligomerų struktūros polidispersiškumo tarp tokios pačios molekulinės masės oligomerų (Kayed, Lasagna-Reeves, 2012).

Žinoma, kad amiloido beta oligomerai sąveikauja su nervų augimo faktoriaus (NGF) receptoriais ir taip sąlygoja neuronų žūtį, kurią sukelia NGF sąveika su p75 neurotrofino receptoriais (p75NTR) (4 pav.) (Yamamoto et al., 2007; Kayed, Lasagna-Reeves, 2012).



4 pav. Amiloido beta oligomerų sąveika su receptoriais (Adaptuota iš (Kayed, Lasagna-Reeves, 2012))

Oligomerai taip pat trikdo N-metil-D-aspartato receptoriaus (NMDAR) veiklą (4 pav.). Aβ oligomerai aktyvuoja NMDAR, o tai sukelia padidėjusį Ca^{2+} srautą į ląstelės vidų, kuris sutrikdo nuo NMDAR priklausomų pagrindinių signalinių kelių, kuriuose dalyvauja nuo Ca^{2+} priklausoma baltymų fosfatazė – kalcineurinas, taip pat nuo Ca^{2+} kalmodulino komplekso priklausoma baltymų kinazė II bei baltymų fosfatazė 1 ir cAMP atsako elementus rišantis baltymas, veiklą. (Yamin, 2009; Kayed, Lasagna-Reeves, 2012; Shankar et al., 2007; D. Zhao et al., 2004). Fernanda De Felice kartu su kolegomis parodė, jog NMDAR aktyvavimas Aβ oligomeriais taip pat gali stimuliuoti perdėtą reaktyvių deguonies formų (ROS) susidarymą (De Felice et al., 2007).

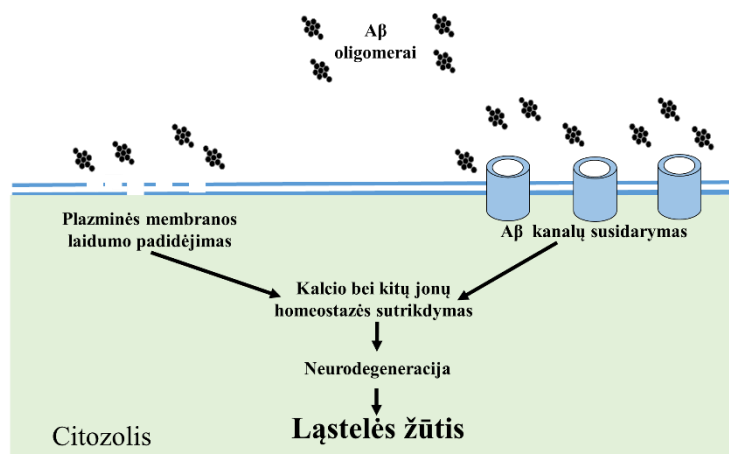
Zhao ir Taunsendas kartu su savo kolegomis nustatė, kad signalo perdavimas, kuris vyksta per neurono insulino receptoriaus (IR), yra ypač jautrus Aβ oligomerams. Oligomerai prisijungę prie IR trikdo jo veiklą arba paverčia jį neaktyviu taip slopindami insulino indukuojamą

autofosforilinimą, kuris yra būtinas greitam specifinių kinazių, kurios aktyvuoja ilgalaikį atsaką, aktyvavimui (**4 pav.**) (Townsend et al., 2007; W.-Q. Zhao et al., 2008).

Nusatyta, kad amiloido beta oligomerai gali jungtis prie cisteiniais turtingo serpantininio (angl. *Frizzled*) receptoriaus domeno šalia arba ant Wnt (angl. *Wingless/integrase-1*) signalinės molekulės surišimo vietos (**4 pav.**). Prisirišę oligomerai slopina Wnt signalinį kelią. Wnt yra sekretuojami glikoproteinai, kurie jungiasi prie serpantininio receptoriaus. Wnt signalinis kelias reguliuoja daugelį kritinių biologinių procesų, kaip: vystymasis, ląstelės judėjimas, ląstelės poliškumas, aksono valdymas, sinapsių formavimasis bei komunikacijas tarp ląstelių. Aβ oligomerų prisijungimas prie serpantininio receptoriaus ir Wnt signalinio kelio slopinimas sukelia *tau* baltymo fosforilinimą bei neurofibrilinių rezginių susidarymą (Magdesian et al., 2008).

Nesenai nustatyta, kad ląstelinis prioninis baltymas (PrP^C) veikia kaip amiloido beta oligomerų receptoriaus, kuris tarpininkauja Aβ oligomerų indukuojamoje sinapsinėje disfunkcijoje (**4 pav.**). Aβ oligomerų prisijungimas prie PrP^C taip pat gali trikdyti sąveiką tarp PrP^C ir koreceptoriaus, kaip NMDAR (Laurén et al., 2009).

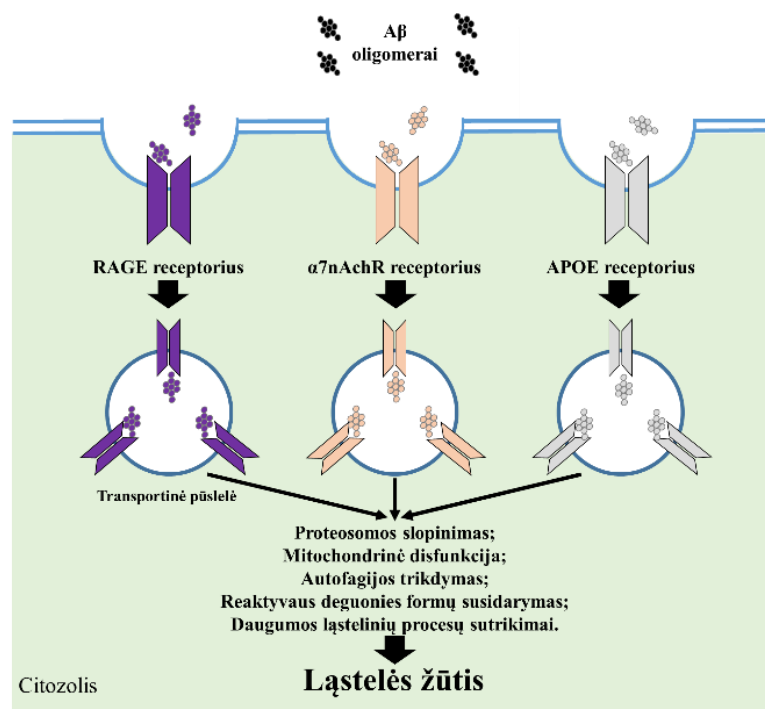
Manoma, kad amiloido beta oligomerai gali ne tik sąveikauti su įvairiais receptoriais ir slopinti jų veiklą bet ir formuoti jonams laidžius kanalus bei didinti plazminės membranos laidumą (**5 pav.**).



5 pav. Amiloido beta oligomerų formuojami kanalai ir poros (Adaptuota iš (Kayed, Lasagna-Reeves, 2012))

Nespecifiškų Aβ porų ar kanalų susidarymas ant neurono membranos sutrikdo kalcio ir kitų jonų homeostazę, kas veda prie daugybinių degeneracinių procesų atsiradimo, įskaitant laisvų radikalų susidarymą ir *tau* fosforilinimą, kas pagreitina neurodegeneraciją ir ląstelės žūtį. Susidare laisvi radikalai taip pat skatina membranos ardymą, dėl kurio nereguliuojamas kalcio jonų srautas į ląstelės vidų yra dar labiau pagreitinamas (Kayed, Lasagna-Reeves, 2012).

Didžioji dalis ląstelėje pagaminamo amiloido beta yra sekretuojama į ląstelės išorę, todėl nenuostabu, jog didžioji dalis amiloido beta oligomerų susidaro būtent ekstraląselinėje erdvėje, tačiau yra nemažai įrodymų, jog amiloido beta oligomerai gali susidaryti ir ląstelės viduje. Amiloido beta oligomerų susidarymą ląstelės viduje gali skatinti tiek sumažėjusi sekrecija į ląstelės išorę ir amiloido beta monomerų susikaupimas ląstelėje, tiek į ląstelės išorę sekretuojamų A β monomerų sugražinimas į ląstelės vidų endocitozės būdu. Į ląstelės vidų gali būti pernešti ne tik A β monomerai, bet ir ląstelės išorėje susidarę oligomerai. Žinoma, kad oligomerų pernašoje dalyvauja nefermentinio galutinio glikozilinimo produktų (RAGE), α 7 nikotino acetilcholino (α 7nAChR) ir apolipoproteino E (APOE) receptoriai. Oligomerų prisijungimas prie pastarųjų receptorių iššaukia receptorių inkorporavimą į transportines pūsleles ir pernašą į ląstelės vidų (6 pav.) (Bhaskar, Lamb, 2012; Kaye, Lasagna-Reeves, 2012).

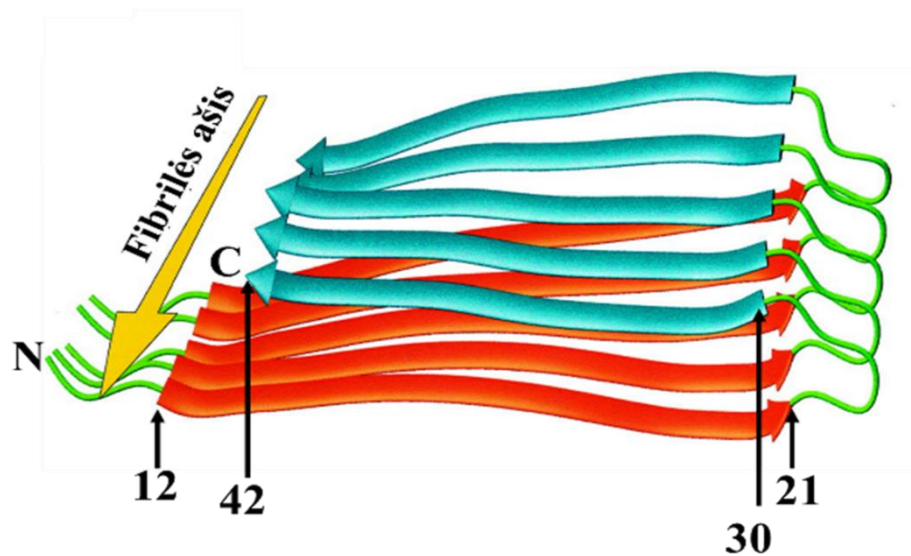


6 pav. Ekstraląstelių amiloido beta oligomerų pernaša į ląstelės vidų (Adaptuota iš (Kayed, Lasagna-Reeves, 2012))

Viduląstelių amiloido beta oligomerų toksiškumo mechanizmas nėra visiškai aiškus, tačiau yra žinoma, kad A β oligomerų susikaupimas ląstelės viduje slopina proteosomos ir ubikvitino proteazių ir hidrolazių aktyvumą. Taip pat žinoma, jog laipsniškas amiloido beta kaupimasis mitochondrijose slopina kvėpavimo grandinės III ir IV kompleksų aktyvumą ir deguonies suvartojimą. Amiloidas beta gali kauptis Alzheimerio liga sergančių žmonių smegenų ląstelių lizosomose. Amiloido beta kaupimasis lizosomose destabilizuoja jų membraną, kas galiausiai lemia membranos suardymą ir lizosomos turinio pasklidimą į citozolį bei autofagijos sutrikdymą (Bhaskar, Lamb, 2012; Kaye, Lasagna-Reeves, 2012).

Fibrilės

Pirminis amiloido beta monomerų agregacijos produktas yra oligomerai, o galutinis netirpios ~10 nm pločio fibrilės, kurios dažnai būna ilgesnės nei 1 μm . A β fibrilės yra apibūdinamos kaip termodinamiškai stabilios, struktūriškai organizuotos, netirpios amiloidinės fibrilės, kurios yra sudarytos iš β klostytą konformaciją įgavusių A β monomerų, tarpusavyje sujungtų tarpmolekulinėmis β klostėmis (Finder, Glockshuber, 2007). Yra žinoma, jog tarpmolekulinės β klostės susiformuoja tarp 12–21 ir 30–42 amino rūgščių, o amiloidinių fibrilių ilgėjimo ašis yra statmena susidariusioms β klostėms (Petkova et al., 2002) (**7 pav.**).



7 pav. Amiloidinės fibrilės struktūra. Geltona rodyklė – fibrilės ilgėjimo ašis. Raudonos ir mėlynos rodyklės žymi amino rūgštis tarp kurių susiformuoja tarpmolekulinės β klostės. (Adaptuota iš (Petkova et al., 2002))

Netirpios fibrilės yra laikomos antrine, mažiau toksiška, amiloido beta agregatų forma. Tačiau jų daromas toksiškas poveikis yra ne ką mažiau svarbus nei oligomerų. Kitaip nei oligomerai, susiformavusios fibrilės yra netirpios ir visiškai atsparios proteazių poveikiui, todėl organizme išlieka labai ilgą laiką. Didelės amiloidinių fibrilių sankaupos, kurios yra aptinkamos Alzheimerio liga sergančių žmonių smegenyse, vadinamos senatvinėmis plokštelėmis. Klinikinių tyrimų rezultatai parodė, kad chirurginis senatvinių plokštelių pašalinimas neištaiso agregatų padarytos žalos bei nesustabdo Alzheimerio ligos (Cappai, Barnham, 2008; Hardy, 2009). Amiloidinių plokštelių formavimasis yra daugiapakopis procesas, kuris trunka ilgą laiką. Amiloido beta fibrilės negrįžtamai pažeidžia neuronų sinapses bei trikdo mikroglios ląstelių veiklą, todėl galiausiai išsivysto lėtinis neurouždegimas, kuris yra labai svarbus veiksnys, lemiantis Alzheimerio ligos atsiradimą. (Bhaskar, Lamb, 2012; Hayden, Teplow, 2013).

1.1.5. Sintetinis ir rekombinantinis amiloidas beta

Cheminės sintezės būdu pagaminto amiloido beta privalumas yra tai, jog jis yra prieinamas dideliais kiekiais, tačiau sintetinis amiloidas beta turi ir keletą trūkumų, kurie gali daryti įtaką eksperimentų rezultatams. Po sintezės proceso peptido liofilizate lieka pašalinių medžiagų, kaip trifluoroacto rūgštis (TFA), kurios gali komplikuoti peptido tirpinimą ir paruošimą tyrimams. Pašalinės priemaišos esančios peptido liofilizate gali pakeisti biofizikines ir biologines peptido savybes (Teplow, 2006). Neįvertinus pašalinių priemaišų svorio gali būti netinkamai apskaičiuota baltymo koncentracija, tas taip pat gali paveikti eksperimento rezultatus. Cheminės sintezės būdu gaminamas peptidas niekada nėra gaunamas 100 % grynas, pasitaiko, jog yra susintetinami peptidai, kurių sudėtis arba ilgis nuo tikslinio produkto skiriasi viena ar keliomis amino rūgštimis, tokius peptidus yra ypač sunku atskirti vienus nuo kitų. Liofilizuotą peptidą reikia tirpinti tirpiklyje, kuris suardytų amiloido agregatus iki monomerų, tačiau šiuo metu mokslininkai nėra sutarę, kuris tirpiklis yra tinkamiausias ir naudoja įvairius tirpiklius (DMSO (Lambert et al., 2001; Stine et al., 2003; Wang et al., 2002), TFE, HIFP (Zagorski, Barrow, 1992; Zagorski et al., 1999), NaOH (Fezoui et al., 2000)) ar jų mišinius. Esant tokiai variacijai tirpiklių gaunami skirtingi rezultatai, kadangi kaip ir buvo parodyta (Crescenzi et al., 2002; Sgourakis et al., 2011, 2007) tyrimais A β antrinės struktūros elementų formavimasis ir išsidėstymas erdvėje priklauso nuo aplinkos sąlygų, todėl tirpinant liofilizuotą A β viename iš anksčiau minėtų tirpiklių gaunami skirtingos erdvinės struktūros amiloido beta monomerai, kurių agregacijos pobūdis skiriasi (Soto et al., 1995; Teplow, 2006).

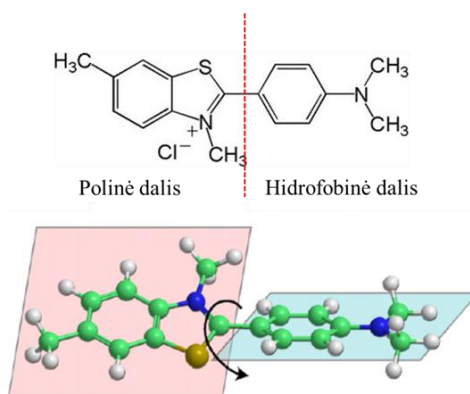
Pasigaminti rekombinantinį baltymą dažnai yra pigiau nei pirkti pagamintą cheminės sintezės būdu, tačiau rekombinantinio amiloido beta naudojimas nebuvo populiarus tarp mokslininkų dėl komplikuočių gryninimo metodikų. Viskas pasikeitė, kai 2009 metais Valšas aprašė greitą ir sąlyginai paprastą rekombinantinio A β gryninimo metodiką (Walsh et al., 2009). Rekombinantinis baltymas N- gale turi prijungtą metioniną, kurį koduojančios nukleorūgštys adeninas (A), timinas (T) ir guaninas (G) tarnauja kaip translacijos iniciacijos kodonas (ATG), kuris yra reikalingas rekombinantinių baltymų raiškai *E. coli* ląstelėse. *E. coli* ląstelėse susintetinto rekombinantinio A β 42 masių spektrometrinės analizės tyrimai parodė, kad N- gale esantis metioninas nėra spontaniškai pašalinamas metionino aminopeptidazės (Walsh et al., 2009). Palyginus sintetinio A β 42 ir rekombinantinio A β 42, kuris N- terminaliniame gale turi prijungtą metioniną, agregacijos laikus, fibrilių morfologiją bei toksiškumą buvo gauti labai panašūs rezultatai (Walsh et al., 2009), kurie leido daryti išvadą, jog metionino prijungimas nedaro didelės įtakos amiloido beta agregacijai.

1.2. Amiloido beta agregacijos tyrimai

Alzheimerio liga sergančių žmonių smegenyse aptikus amiloido beta agregatus ir juos įvardinus kaip šios ligos sukėlėjus dauguma mokslininkų susidomėjo amiloido beta agregacijos tyrimais. Agregacijos tyrimais mokslininkai siekia išsiaiškinti agregacijos mechanizmus, priežastis ir sąlygas, taip pat labai didelis dėmesys skiriamas agregacijos slopiklių, kurie galėtų būti pritaikyti Alzheimerio ligos gydime ar kaip prevenciniai preparatai, paieškai.

Literatūros šaltiniuose, kuriuose yra aprašomi amiloidinių baltymų agregacijos tyrimai, vienas iš pagrindinių metodų naudojamų amiloidinių baltymų agregacijai stebėti yra fluorescencinės spektrometrijos metodas, kurio metu yra stebimas amiloidams specifinio dažo Tioflavino T fluorescencijos intensyvumo pokytis laike (Akaishi et al., 2008; Cohen et al., 2013; Hellstrand et al., 2010; McKoy et al., 2012; Nieznanski et al., 2012; Stöhr et al., 2012; Vandersteen et al., 2012).

Tioflavinas T (**8 pav.**) yra fluorescencinis dažas, kurio fluorescencijos intensyvumas išauga jam jungiantis prie amiloidinių agregatų. ThT sužadintas 440 nm bangos ilgio šviesa išspinduliuoja 482 nm bangos ilgio šviesą (emisijos maksimumas).



8 pav. Tioflavinas T (Amdursky et al., 2012).

Tikslus molekulinis Tioflavino T jungimosi prie amiloidinių agregatų mechanizmas nėra žinomas, tačiau yra iškelta keletas hipotezių. Viena iš hipotezių teigia, jog ThT vandeniniuose tirpaluose formuoja micelas, kurios hidrofobinės sąveikos dėka jungiasi prie amiloidinių agregatų paviršiaus (Khurana et al., 2005). Kita hipotezė teigia, kad ThT veikia kaip molekulinis rotorius, kuris jungiasi prie amiloidinių agregatų lygiagrečiai amiloidinių fibrilių ašiai (Biancalana, Koide, 2010) arba sudaro dimerus hidrofobinėse amiloidinių fibrilių ertmėse. Tirpale mažas energinis barjeras leidžia ThT polinei daliai ir hidrofobinei daliai laisvai sukintis apie jas jungiančią C-C jungtį, besisukant kampas tarp polinės ir hidrofobinės dalies keičiasi nuo 37° iki 90°, kas sukelia perėjimą iš fluoresuojančios būsenos į nefluoresuojančią. ThT prisijungus prie amiloidinių agregatų polinės ir hidrofobinės dalių sukimasis yra imobilizuojamas, dėl to yra išlaikoma

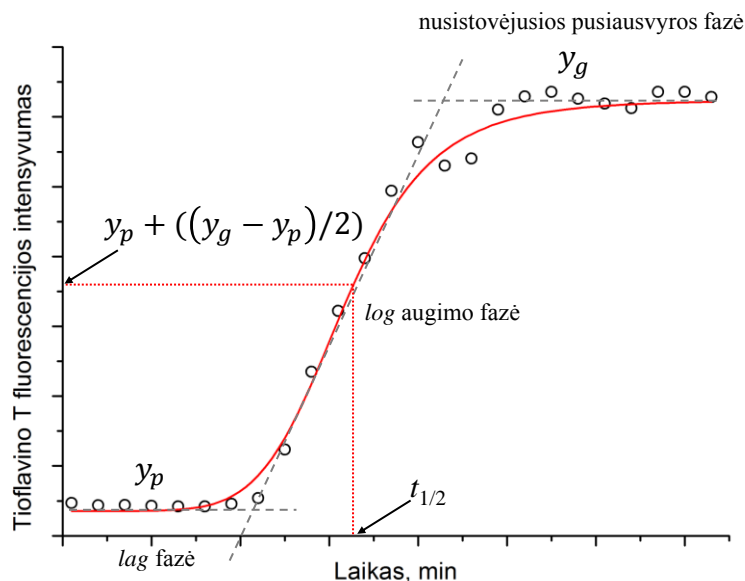
fluoresuojanti būseną (Amdursky et al., 2012; Biancalana, Koide, 2010; Qin et al., 2010; Sabate et al., 2013; Sulatskaya et al., 2011).

Minimali Aβ42 peptidų agregatų detekcijos riba yra 0,2 μM (Hellstrand et al., 2010). Tirpale esant mažesnei Aβ42 koncentracijai nei 0,2 μM amiloidinių fibrilių susidarymo negalime stebėti, nes nėra matoma skirtumo tarp bazinio ThT fluorescencijos spektro ir ThT + Aβ42 spektro.

Amiloidinių agregatų (fibrilių) susidarymas gali būti aprašomas sigmoidine kreive, kuri susideda iš *lag* fazės (oligomerų formavimasis ir agregacijos branduolių susidarymas), *log* augimo fazės (greitas monomerų prisijungimas prie agregacijos branduolių ir jų ilgėjimas) bei nusistovėjusios pusiausvyros fazės (fibrilių susidarymas) (Nielsen et al., 2001). Aβ agregacijos duomenys gauti fluorescencinės spektrometrijos analizės metu gluodinami sigmoidine kreive (**9 pav.**), kurią aprašo lygtis:

$$Y = y_p + (y_g - y_p) * \frac{x^n}{t_{1/2}^n + x^n} \quad (1)$$

kur Y yra fluorescencijos intensyvumas, x – laikas ir F yra laikas, kai pasiekama 50 % maksimalaus fluorescencijos intensyvumo, y_p – pradinė fluorescencijos intensyvumo reikšmė, y_g – galutinė fluorescencijos intensyvumo reikšmė, n = Hillo koeficientas.



9 pav. Eksperimentinių amiloido beta agregacijos duomenų gluodinimas sigmoidine kreive. Juodi apskritimai – eksperimentiniai duomenys; Raudona kreivė – eksperimentinių duomenų gluodinimas sigmoidine kreive, kurią aprašo 1 lygtis

Eksperimentinius duomenis gluodinant sigmoidine kreive, kurią aprašo 1 lygtis, galime nesunkiai nustatyti agregacijos procesą charakterizuojančius parametrus: agregacijos $t_{1/2}$, ThT fluorescencijos intensyvumo pokytį, bei pradinę ir galutinę intensyvumo reikšmes.

1.3. Amiloido beta agregacijos slopikliai

Atradus sąsajas tarp amiloido beta agregatų susidarymo žmogaus smegenyse ir Alzheimerio ligos mokslininkams tapo labai svarbu surasti A β agregacijos slopiklius, kuriuos būtų galima panaudoti Alzheimerio ligos gydyme ar kaip prevencinius preparatus. Absoliutus amiloido beta kiekis priklauso nuo APP ir jį kerpančių γ ir β sekretazių, todėl yra logiška pirmiausia ieškoti slopiklių, kurie slopintų šias sekretazes ir taip sumažintų A β koncentraciją bei galimybę susidaryti jo agregatams. Tačiau šiuo metu dauguma efektyvių γ ir β sekretazių slopiklių pasižymi šalutiniais poveikiais, kurie gali sukelti net mirtį (Doig, 2013). Taip pat yra kuriamos įvairios strategijos, kurios padidintų amiloido beta degradacijoje dalyvaujančių proteazių raišką ar aktyvumą. Padidinus A β degraduojančių proteazių raišką ar aktyvumą būtų galima sumažinti absoliučią A β koncentraciją ir taip sumažinti jo agregacijos riziką, tačiau šių proteazių raiškos ar aktyvumo padidinimas gali turėti ir pašalinių padarinių, kaip nespecifinis karpymas, kuris paveiktų ir kitus baltymus (Doig, 2013). Vienais iš potencialiausių slopiklių yra laikomi trumpi peptidai ir mažos molekulinės masės medžiagos, kurių taikynys būtų A β monomeras. Neleidžiant monomerams agreguoti tarpusavyje būtų išvengiama toksiškų oligomerų ir fibrilių susidarymo. Per pastaruosius 30 metų klinikinių tyrimų stadiją pasiekė daugiau nei 200 įvairiausių slopiklių (Mangialasche et al., 2010), tačiau nė vienas nebuvo patvirtintas kaip efektyvus ir neturintis šalutinio poveikio slopiklis, kuris būtų tinkamas naudoti Alzheimerio ligos gydyme ar kaip prevencinis preparatas (Doig, Derreumaux, 2015).

1.3.1. Trumpi peptidai

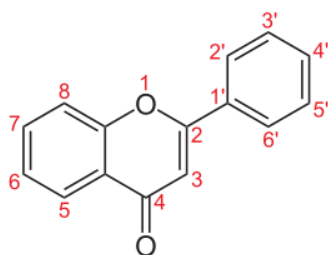
Amiloido beta agregacijos slopinimui mėginama panaudoti trumpus peptidus, kurių tikslas būtų blokuoti centrinis hidrofobinius amiloido beta domenų (Leu12-Ala21, Ala30-Ala42). Centriniai hidrofobiniai domenai (CHD) yra svarbus slopinimo taikynys, nes būtent jie yra save atpažįstantys elementai, kurie formuoja beta klostes tarp A β molekulių ir lemia agregatų susidarymą. Trumpas peptidas prisijungęs prie CHD blokuotų jo sąveiką su kitu CHD ir taip neleistų susidaryti amiloido beta agregatams. Tokio slopinimo mechanizmo galimybė buvo įrodyta moksliniais tyrimais, kurių metu trumpi peptidai (*D*-(PGKLVYA); *D*-(KKLVFFARRRRA); *L*-(KLVFF); *L*-(LPFFD)), sudaryti tiek iš *L* tiek iš *D* aminorūgščių slopino A β agregaciją bei neleido susidaryti toksiškiems oligomerams ir fibrilėms. Peptidai sudaryti iš *D* amino rūgščių yra atsparesni proteazių poveikiui, todėl yra labiau patrauklūs kaip slopikliai (Doig, Derreumaux, 2015; Doig, 2013). Tačiau peptidai dažniausiai netampa vaistiniaisiais preparatais dėl keleto priežasčių. Peptidai yra linkę į degradaciją bei negali laisvai kirsti ląstelės membranos, o tai daro juos prastais vaistiniaisiais preparatais. Dauguma vaistinių preparatų atitinka Lipinskio penketo taisyklę ($5 \leq$ vandenilinio ryšio donoriai;

$10 \leq$ vandenilinio ryšio akceptoriai; molekulinė masė < 500 Da; pasiskirstymo koeficientas $\log(P) \leq 5$), kuri nusako cheminio junginio tinkamumą būti vaistiniu preparatu. Tačiau peptidai, kurie slopina A β agregaciją, neatitinka Lipinskio taisyklės ir dėl to gali būti blogai įsisavinami žmogaus organizme (Doig, 2013). Siekiant, kad trumpi peptidai būtų patvirtinti kaip tinkami būti vaistiniai preparatai, reikia ieškoti modifikacijų, kurios leistų pagerinti molekulinės peptido savybes, taip pat reikia sukurti peptidų įvedimo ir pernašos sistemas, kurios užtikrintų slopinančio peptido patekimą į žmogaus smegenų neuronų, mikroglisos ląsteles bei tarpląstelinę erdvę.

1.3.2. Mažos molekulės

Literatūroje yra aprašoma daugybė organinių junginių, kurie *in vitro* slopina A β agregaciją arba mažina jo toksiškumą (Doig, 2013). Keleto tokių junginių pavyzdžiai yra pateikti 4 lentelėje. Vienu iš potencialiausių A β agregacijos slopiklių buvo laikomas „AlzhemedTM“, kuris puikiai slopino A β agregaciją *in vitro*, įveikė I ir II klinikinių tyrimų stadijas, tačiau III klinikinių tyrimų stadijoje nebuvo patvirtintas kaip pakankamai efektyvus ir saugus naudoti ir dėl to buvo pripažintas neveiksniu (Aisen et al., 2007; Doig, Derreumaux, 2015). Kitas daug žadantis slopiklis – metileno mėlis, kuris šiuo metu yra klinikinių tyrimų stadijoje. Metileno mėlis slopina toksiškų oligomerų susidarymą ir taip apsaugo nervines ląsteles nuo toksiško oligomerų poveikio (Necula et al., 2007; Paban et al., 2014).

Potencialiais A β agregacijos slopikliais yra laikomi flavonai. Flavonai – organiniai junginiai, kurių pagrindą sudaro 2-fenil-1-benzopiran-4-ketonas (**10 pav.**).

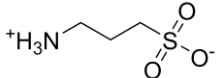
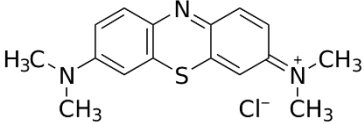
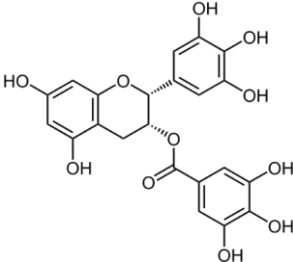
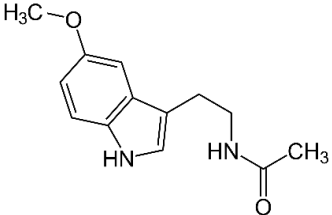
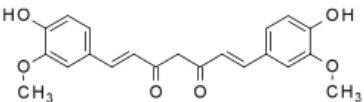
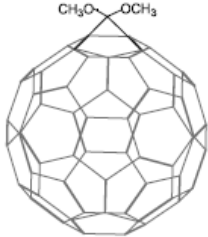
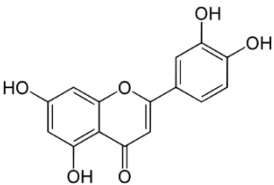


10 pav. 2-fenil-1-benzopiran-4-ketonas

Šiuo metu literatūroje yra aprašomi keletas natūralių ir sintetinių flavonų, kurie slopina A β agregaciją *in vitro* (Akaishi et al., 2008; Sharoar et al., 2012; Ushikubo et al., 2012). Tačiau pastaruosiuose literatūros šaltiniuose vienu iš pagrindinių A β agregacijos slopinimo požymių yra laikomas ThT fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas. Autoriai mano, jog ThT fluorescencijos intensyvumas sumažėja, nes susidaro mažesnis kiekis A β agregatų. Tačiau apie slopinimo efektyvumą spręsti vien tik iš ThT fluorescencijos intensyvumo pokyčio yra rizikinga, kadangi dabar nėra tiksliai žinoma, ar flavonai nedaro įtakos ThT fluorescencijos intensyvumui. Todėl, norint tiksliau įvertinti flavonų įtaką A β agregacijos procesui, reiktų atkreipti dėmesį į agregacijos puslaikį ($t_{1/2}$), kuris tiesiogiai priklauso nuo A β koncentracijos (Hellstrand et al., 2010). Manant,

jog flavonai sąveikauja su A β monomerais ir taip sumažina laisvų monomerų koncentraciją, kurie galėtų agreguoti, $t_{1/2}$ reikšmė turėtų padidėti. Sumažėjęs ThT fluorescencijos intensyvumas, tačiau nepakitusi $t_{1/2}$ reikšmė leistų daryti išvadą, kad flavonas neslopina A β agregacijos, tačiau keičia ThT fluorescencijos intensyvumą. Padidėjusi $t_{1/2}$ reikšmė leistų daryti išvadą, kad tam tikras flavonas slopina A β agregacijos procesą. $t_{1/2}$ reikšmę galime nesunkiai sužinoti gluodindami eksperimentinius duomenis sigmoidine kreive, kurią aprašo 1 lygtis.

4 lentelė. Potencialūs A β agregacijos slopikliai

Slopiklis	Struktūrinė formulė	Poveikis	Literaūros šaltinis
Alzhemed™		Slopina A β monomerų agregaciją	(Aisen et al., 2007)
Metileno mėlis		Slopina toksiškų oligomerų susidarymą	(Necula et al., 2007)
EGCG		Sąveikauja su A β monomerais ir verčia juos formuoti nestruktūrizuotus oligomeras, kurie nėra toksiški ir negali formuoti fibrilių	(Ehrnhoefer et al., 2008)
Melatoninas		Sąveikaudamas su A β monomeru pakeičia jo antrinę struktūrą ir taip slopina amiloidinių fibrilių susidarymą	(Pappolla et al., 1998)
Kurkuminas		Neleidžia A β monomerams agreguoti tarpusavyje, taip pat gali išardyti jau susidariusius agregatus	(Yang et al., 2005)
Fulerenas		Sąveikauja su CHD ir slopina A β monomerų agregaciją	(Kim, Lee, 2003)
Luteolinas		Slopina A β fibrilių susidarymą	(Akaishi et al., 2008)

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Aparatūra, medžiagos

2.1.1. Reagentai

Acros Organics: amonio persulfatas 99,5 %; amonio chloridas 99,6 %; dinatrio hidrofosfatas 99 %; druskos rūgštis 37 % $\rho = 1,18$ g/ml; glicerolis 99 %; karbamidas (urėja) 99,5 %; natrio chloridas (ypač švarus); natrio šarmas 50 % $\rho = 1,50$ g/ml; natrio sulfatas 99 %.

Carl Roth GmbH+Co.: agar-agaras; ampicilino natrio druska 99 %; ditioneitolis 99 %; guanidino hidrochloridas 99,7 %; kalio dihidrofosfatas 99 %; Luria Broth mitybinė terpė; tricinas 99 %; tris(hidroksimetil)aminometanas (TRIS) 99 %.

Fisher Scientific: „EZ Run BP 2620-1” poliakrilamido gelių dažas; akrilamidas/bisakrilamidas 37,5:1; dekstrozė; dimetilsulfoksidas (DMSO); etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) 99 %; laktozė; magnio sulfatas 99,5 %; molekulinės masės žymuo „Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder“; molekulinės masės žymuo „Page Ruler Low Range Unstained Protein Ladder“; natrio dodecilsulfatas (NDS) 99 %; triptonas; TEMED.

Indofine Chemical Company: flavonai, kurių pilnas sąrašas su kodiniais pavadinimais pateiktas prieduose.

Oxoid: mielių ekstraktas

Sigma: Tioflavinas T (ThT)

2.1.2. Laboratorinė įranga

- 96 šulinėlių mikroplokštelės: „Corning“.
- Atominės jėgos mikroskopas „MultiMode SPM” sujungtas su NanoScope III a valdymo įrenginiu.
- Centrifuga (šaldoma) „Herolab HiCen SR“ (AF 6.500 ir AS 4.500 rotoriai).
- Chromatografinė kolonėlė „Tricorn 10/300“.
- Chromatografinė sistema „Äkta purifier“.
- Elektroforezės aparatas „Biometra Minigel-Twin“ su „Biometra PS 300 T“ srovės šaltiniu.
- Filtrai: 0,45 μ m porų dydžio, 47 mm diametro „Sartorius Stedim Biotech“.
- Homogenizatorius Potter–Elvehjem „Sigma–Aldrich“.
- Koncentratoriai „Amicon® Ultra–15“, kurių pralaidumas yra 30 kDa ir 3 kDa.
- Magnetinė maišyklė „Velp Scientifica ARE“.
- Mikroplokštelių sandarinimo juosta „Nunc“.
- Mikroplokštelių skaitytuvas „Synergy H4 Hybrid Multi-Mode“.
- pH metras Thermo Fisher Orion Dual Star pH/ISE“.

- Purtyklė: „IKA KS 4000i control“.
- Sūkurinė maišyklė: „Velp Scientifica Vortex Mixer“.
- Svarstyklės: „Kern PCB 1000–2“; „Denver Instruments TP-214“.
- Termostatas „Fisher Scientific IB-15G“.
- Termostatinė purtyklė „Ditabis MHR 23“.
- Termostatinė vonelė „Fisher Scientific Mini Dry Bath“.
- Ultragarsinis homogenizatorius „Bandelin Sonopuls“.
- Vakuuminė filtravimo sistema „Sigma–Aldrich“.
- Zondas „PointProbe NCHR“.
- Vandens valymo sistema: „Simplicity system“.

2.1.3. Buferiniai tirpalai

A: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA.

B: 8 M Urėjos; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA.

C: 8 M Urėjos; 25 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA.

D: 8 M Urėjos; 125 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA.

E: 8 M Urėjos; 500 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA.

F: 8 M GuHCl; 50 mM Tris/HCl pH 8.

G: 20 mM natrio fosfato pH 8; 200 μM EDTA.

2.1.4. Sorbentai

GE Healthcare: „DEAE Sepharose™ 6 Fast Flow“; „Superdex™ 75“.

2.1.5. Kompetentinės ląstelės

Baltymų ekspresijai naudotas kamienas *E. coli* BL21 Star™(DE3), kuris turi tokias genetines charakteristikas: *F⁻ ompT hsdSB (rB–mB–) gal dcm rne131*(DE3). Kamienas pirktas iš *Invitrogen*.

2.1.6. Konstruktas

pet3a plazmidė su atsparumo ampicilinui genu ir įklonuotu Aβ42 baltymą koduojančiu genu. Plazmidė padovanota *dr. Christophe Cullin iš Prancūzijos Bordo Segalen universiteto*. Plazmidė aprašyta (Vignaud et al., 2013; Walsh et al., 2009) literatūros šaltiniuose.

2.1.7. Mitybinės terpės

Agarizuota LB (Broth) terpė: 25 g Luria Broth mitybinės terpės, 15 g agaro ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.

S.O.C. mitybinė terpė: 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės. Triptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami

97 ml dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje. Ataušinus iki kambario temperatūros, pridedama Mg druskų ir gliukozės ir steriliai nufiltruojama.

ZYM-5052 autoinduktyvi mitybinė terpė: terpės ruošimo protokolas aprašytas (Studier, 2005) literatūros šaltinyje.

2.2. Metodai

2.2.1. Transformacija

Paruoštos Petri lėkšteles su agarizuota LB terpe, kurioje yra ampicilino (100 µg/ml), šildomos 37 °C temperatūroje apie 1 val. Į 100 µl kompetentinių *E. coli* BL(21) Star™ (DE3) ląstelių kultūrą įdedama 1 µl plazmidinės DNR. Transformacijos mišinys laikomas 30 min. ledo vonioje. Vykdomas temperatūrinis šokas, 90 s laikoma 42 °C temperatūroje, tuomet mišinys greitai perkeliamas į ledo vonią ir laikomas joje 2 min. Į transformacijos mišinį pridedama 400 µL S.O.C. mitybinės terpės ir auginama 45 min 37 °C temperatūroje termostatuojamoje purtyklėje (220 aps./min). 50 µl transformantų steriliai užsėjama ant pašildytos Petri lėkštelės. Lėkštelė inkubuojama termostate 37 °C temperatūroje 16 val.

2.2.2. Raiška

100 ml Luria Broth mitybinės terpės, kurioje yra 100 mg/l ampicilino, užsėjama viena kolonija nuo Petri lėkštelės ir auginama per naktį 37 °C temperatūroje, purtant (220 aps/min) (naktinė kultūra). Kitą dieną 9 kolbos su 400 ml ZYM-5052 autoinduktyvios mitybinės terpės (dieninė kultūra), kurioje yra 100 mg/l ampicilino, užsėjamos 1 ml naktinės kultūros, auginamos 37 °C temperatūroje 20-24 valandas, purtant (220 aps/min). Vėliau biomasė centrifuguojama 15 min. 4 °C temperatūroje 5400 \times g, supernatantas nupilamas, o biomasė užšaldoma -20 °C temperatūroje iki tolimesnio gryninimo etapo.

2.2.3. Amiloido beta gryninimas

Amiloido beta gryninimo metodika sudaryta remiantis (Hellstrand et al., 2010; Walsh et al., 2009) literatūros šaltiniais.

Biomasės ardymas

Užšaldyta biomasė, gauta iš 3,6 L kultūrinio skysčio, atšildoma, užpilama 100 ml buferinio tirpalo **A**, homogenizuojama Potter–Elvehjem homogenizatoriumi, vėliau ant ledo 10 min. ardoma ultragarsu 50 % galios darbiniais ciklais, kas 30s darant 30s pertraukas. Suardyta biomasė centrifuguojama 10 min, 4 °C temperatūroje 18000 \times g. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos resuspenduojamos 100 ml buferinio tirpalo **A** ir homogenizuojamos Potter–Elvehjem homogenizatoriumi. Pastaroji procedūra kartojama du kartus. Taip pašalinami tirpūs baltymai. Kadangi tikslinis baltymas yra sintetinamas intarpinių kūnelių pavidale ląstelių nuolaužos yra

resuspenduojamos 50 ml buferinio tirpalo **B** ir homogenizuojamos Potter–Elvehjem homogenizatoriumi. Homogenizuotos nuolaužos centrifuguojamos 15 min, 4 °C temperatūroje 18000 x g, galiausiai gaunamas skaidrus supernatantas, kuriame yra tikslinis baltymas.

Jonų mainų chromatografija stacionariomis sąlygomis

50 ml supernatanto, gauto po paskutinio biomasės centrifugavimo, atskiedžiami 150 ml buferinio tirpalo **B**. Tuomet atskiestas baltymų tirpalas sumaišomas su 50 ml dietilaminoetil (DEAE) sefarozės (nulygsvarintos buferiniu tirpalu **B**). Mišinys švelniai maišomas 30 min. 4 °C temperatūroje. Tuomet mišinys užnešamas ant Biuchnerio piltuvo, ant kurio yra uždėtas filtrinis popierius, o pats piltuvas yra uždėtas ant vakuuminio indo. Sorbentas praplaunamas 50 ml buferinio tirpalo **B**. Tuomet ant sorbento užpilama 50 ml buferinio tirpalo **C** ir palaikoma 5 min., tuomet vakuumo pagalba nusiurbama. Šio žingsnio esmė yra atplauti nespecifiškai su sorbentu sąveikaujančius baltymus. Vėliau ant sorbento yra užpilama 50 ml buferinio tirpalo **D** ir palaikoma 5 min., tuomet vakuumo pagalba nusiurbama. Šis žingsnis yra kartojamas keturis kartus, o surinktose frakcijose yra tikslinis baltymas. Galiausiai sorbentas praplaunamas buferiniu tirpalu **E** tam, kad nuo sorbento būtų atplauti stipriai su sorbentu sąveikaujantys baltymai ir sorbentas vėliau galėtų būti regeneruojamas. Surinktos frakcijos su tiksliniu baltymu yra apjungiamos kartu. Tam kad atskirtume didelius baltymus, kurie galėjo atsiplauti kartu su tiksliniu baltymu, nuo tikslnio baltymo apjungtos frakcijos yra filtruojamos, pasinaudojant 30000 Da pralaidumo centrifuginiais filtrais, centrifuguojama 15 °C temperatūroje 4000 x g. Surinktas filtratas koncentruojamas su 3000 Da pralaidumo centrifuginiais koncentratoriais (centrifuguojama 15 °C temperatūroje 4000 x g), stengiamasi tūrį sumažinti bent 20 kartų (nuo 200 ml iki 10 ml). Sukoncentruotas baltymas išpilstomas į mėgintuvėlius po 1ml ir saugomas -80 °C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

Gelfiltracija

Norint tirti Aβ42 peptidų agregaciją yra labai svarbu turėti Aβ42 peptidus monomerų formoje, todėl monomerai nuo dimerų ir kitų agregatų atskiriami gelfiltracijos metodu. Sukoncentruoti Aβ42 mėginiai (1 ml) atšildomi ir praskiedžiami 3 ml buferinio tirpalo **F**. Tuomet mėginys koncentruojamas (15 °C temperatūroje, 4000 x g) iki 250-500μl su 3000 Da pralaidumo centrifuginiais koncentratoriais. Koncentruotas mėginys per 0,5 ml tūrio užnešimo kilpą užnešamas ant chromatografinės kolonėlės Tricorn 10/300, kuri yra pakrauta Superdex 75 sorbentu. Eliucija vykdoma 1 ml/min greičiu, leidžiant buferinį tirpalą **G**, kuris prieš leidimą buvo degazuotas. Surinktos baltymo frakcijos (2 ml) praskiedžiamos 6 ml buferinio tirpalo **F** ir koncentruojamos bei gryninamos kaip buvo nurodyta anksčiau., tik dabar eliucijos metu surinktas mėginys yra laikomas šaltai ant ledo. Po dviejų gryninimų gelfiltracijos metodu yra gaunamas grynas amiloido beta

monomerų tirpalas. Baltymo koncentracija nustatoma išmatuojant baltymo tirpalo absorbciją esant 280 nm bangos ilgiui ir apskaičiuojant pagal formulę:

$$C \text{ (Mol/l)} = A/\varepsilon * l \quad (2)$$

kur A – baltymo tirpalo optinis tankis ($\lambda = 280 \text{ nm}$), ε – baltymo ekstinkcijos koeficientas ($1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l – optinio kelio ilgis (0,5 cm).

Amiloidas beta yra labai agregatyvus, todėl gryninimas gelfiltracijos metodu turi būti atliekamas tik prieš pat agregacijos tyrimus.

2.2.4. Mėginių analizė Tricino-NDS-PAAG elektroforezės metodu

A β 42 molekulinė masė yra ~4645 Da, tokios mažos molekulinės masės peptidas nėra matomas naudojant NDS-PAAG elektroforezės metodą, todėl yra naudojamas didesnės raiškos Tricino-NDS-PAAG elektroforezės metodas, kurio protokolas yra pateikiamas literatūros šaltinyje (Schägger, 2006).

2.2.5. Agregacijos tyrimai

Gelfiltracijos metodu išgrynintas amiloidas beta yra skiedžiamas buferiniu tirpalu **G** iki 5; 4,5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1 μM koncentracijos. Į mėginius pridedama 50 μM ThT. Mėginiai išpilstomi po 100 μl į 96 šulinėlių mikroplokšteles. Plokštelės su mėginiais patalpinamos į Synergy H4 Hybrid Multi-Mode mikroplokštelių skaitytuvą. Amiloido beta agregacijos procesas stebimas matuojant ThT intensyvumo pokytį laike. Visi matavimai atliekami 37 °C temperatūroje esant pastoviam 16 Hz purtymui.

2.2.6. Agregacijos tyrimai su flavonais

Flavonai agregacijos tyrimams paruošiami juos ištirpinant 100 % DMSO, galutinė flavonų koncentracija 20 mM. Gelfiltracijos metodu išgrynintas amiloidas beta yra skiedžiamas buferiniu tirpalu **G** taip, kad galutinė jo koncentracija pridėjus flavonų būtų 3 μM . Į mėginius pridedama 50 μM ThT ir norima flavono koncentracija, visuose mėginiuose yra 1 % DMSO. Mėginiai išpilstomi po 100 μl į 96 šulinėlių mikroplokšteles. Plokštelės su mėginiais patalpinamos į Synergy H4 Hybrid Multi-Mode mikroplokštelių skaitytuvą. Amiloido beta agregacijos procesas stebimas matuojant ThT intensyvumo pokytį laike. Visi matavimai atliekami 37 °C temperatūroje esant pastoviam 16 Hz purtymui. Flavono poveikis A β 42 agregacijai įvertintas palyginant mėginių, kuriuose buvo A β 42 ir flavonas ir mėginių, kuriuose buvo tik A β 42 agregacijos puslaikius ir ThT intensyvumą.

2.2.7. Eksperimentinių duomenų apdorojimas

Agregacijos $t_{1/2}$ ir maksimalus ThT intensyvumas nustatomi eksperimentinius duomenis gluodinant sigmoidine kreive (**9 pav.**), kurią aprašo 1 lygtis. Duomenų apdorojimui naudota „Origin 8.1“ programinė įranga.

Santykiniis agregacijos puslaikis ir ThT intensyvumas apskaičiuojami padalinant mėginių, kuriuose buvo flavonai, agregacijos $t_{1/2}$ ir maksimalų ThT intensyvumą (I_{max}) iš kontrolinių mėginių, kuriuose nebuvo flavonų, agregacijos $t_{1/2}$ ir maksimalaus ThT intensyvumo ($t_{1/2}(\text{A}\beta+\text{Flavonas}) / t_{1/2}(\text{A}\beta)$) ir ThT intensyvumą ($I_{max}(\text{A}\beta+\text{Flavonas}) / I_{max}(\text{A}\beta)$).

Standartinės matavimų paklaidos apskaičiuojamos naudojant Stjudento skirstinį su 0,95 patikimumo lygmeniu. Daroma nuo 3 iki 9 matavimų pakartojimų.

2.2.8. Atominės jėgos mikroskopija

30 μl mėginio užnešama ant aukščiausios kokybės V1 1 cm diametro žėručio disko. Mėginys palaikomas 30 min. ant žėručio Vėliau žėrutis švelnia srove nuplaunamas 1 ml MilliQ vandens ir nudžiovinamas po švelnia suspausto azoto srove. Mikroskopavimas atliekamas MultiMode SPM atominės jėgos mikroskopu dinaminiame virpančiojo zondo režime (angl. *Tapping mode*). Skenavimui naudotas PointProbe NCHR zondas, kurio virpėjimo dažnis ~ 300 kHz. Skenavimo greitis 0,5-1 Hz, maksimali skenavimo kokybė 512×512 taškų.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

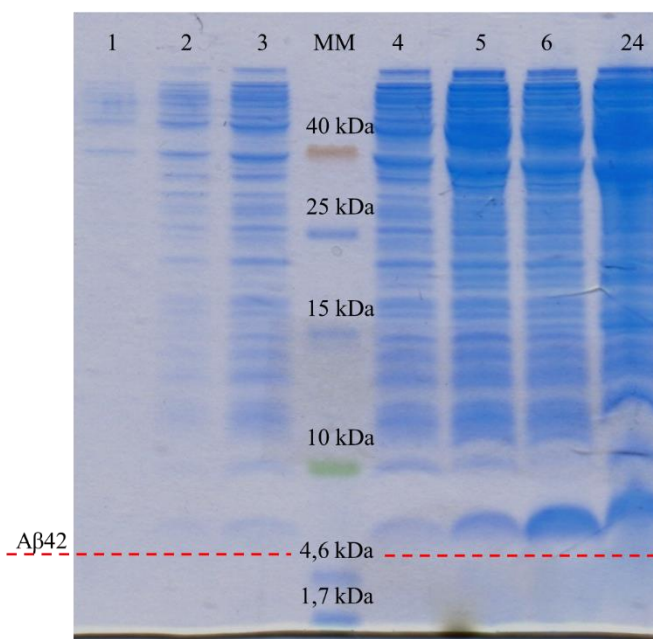
3.1. Rekombinantinio amiloido beta raiška ir gryninimas

3.1.1. Rekombinantinio A β 42raiška

Plazmidė *pet3a* su įklonuotu A β 42 baltymą koduojančiu genu sėkmingai transformuota į kompetentines *E. coli* BL21 Star™ (DE3) ląsteles.

Atlikus literatūros analizę transformantus nuspręsta auginti autoinduktyvioje ZYM–5052 mitybinėje terpėje, kurios 1 l kainuoja beveik 1,5 karto pigiau nei 1 l Luria Broth mitybinės terpės, kurioje yra 1 mM izopropil- β -D-tiogalaktopiranozido (IPTG) (Skaičiavimai pateikti prieduose **6 lentelėje**). Taip pat auginant ZYM–5052 mitybinėje terpėje yra gaunama iki 4 katrų daugiau biomasės nei auginant Luria Broth mitybinėje terpėje (Studier, 2005).

Rekombinantinio A β 42 raiška transformantuose patikrinta paėmus mėginius iš auginamos kultūros ir atlikus jų analizę Tricino-NDS-PAAG elektroforezės metodu (**11 pav.**).



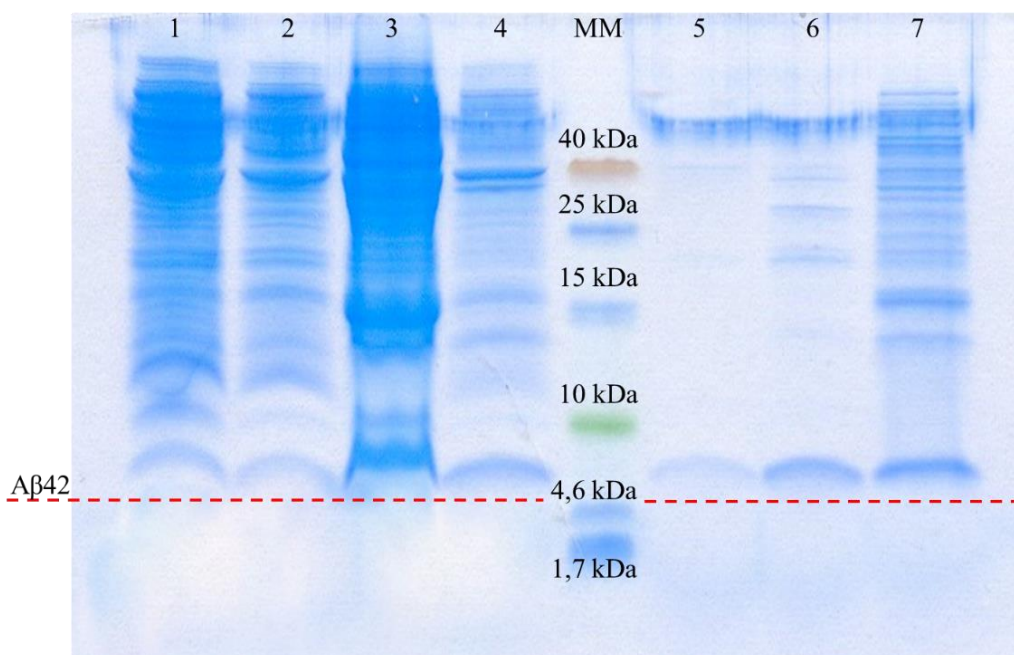
11 pav. A β 42 raiška transformantuose. Skaičiai 1–24 nurodo kiek val. praėjus po dienos kultūros užsėjimo buvo paimtas mėginys. MM – molekulinės masės žymuo

Naudojantis „ExPASy ProtParam“ (Gasteiger et al., 2005) įrankiu apskaičiuota teorinė rekombinantinio A β 42 molekulinė masė – 4645 Da. Tuomet remiantis 11 pav. pateikta elektroforegrama nustatyta, jog A β 42 raiška transformantuose vyksta (matomos baltymo juostelės ties 4,6 kDa molekulinės masės žymeniu) ir prasideda praėjus 3–4 val. po dienos kultūros užsėjimo. 11 pav. pateiktoje elektroforegamoje matyti, jog baltymo raiškos lygis auga kartu su kultūros auginimo laiku, todėl buvo nuspręsta, jog visi transformantai bus auginami 24 valandas

po dienos kultūros užsėjimo. Darbo metu iš viso užauginti 25,6 litrai ląstelių kultūros iš kurios gauta $212,55 \pm 0,03$ g biomasės.

3.1.2. Amiloido beta gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu

Baigiamojo darbo metu atlikta 10 gryninimų jonų mainų chromatografijos metodu stacionariomis sąlygomis, kurių metu nuo tikslinio baltymo atskirta didžioji dalis pašalinių baltymų ir kitų priemaišų. Gryninimo metu paimti mėginiai analizuoti Tricino-NDS-PAAG elektroforezės metodu (**12 pav.**).



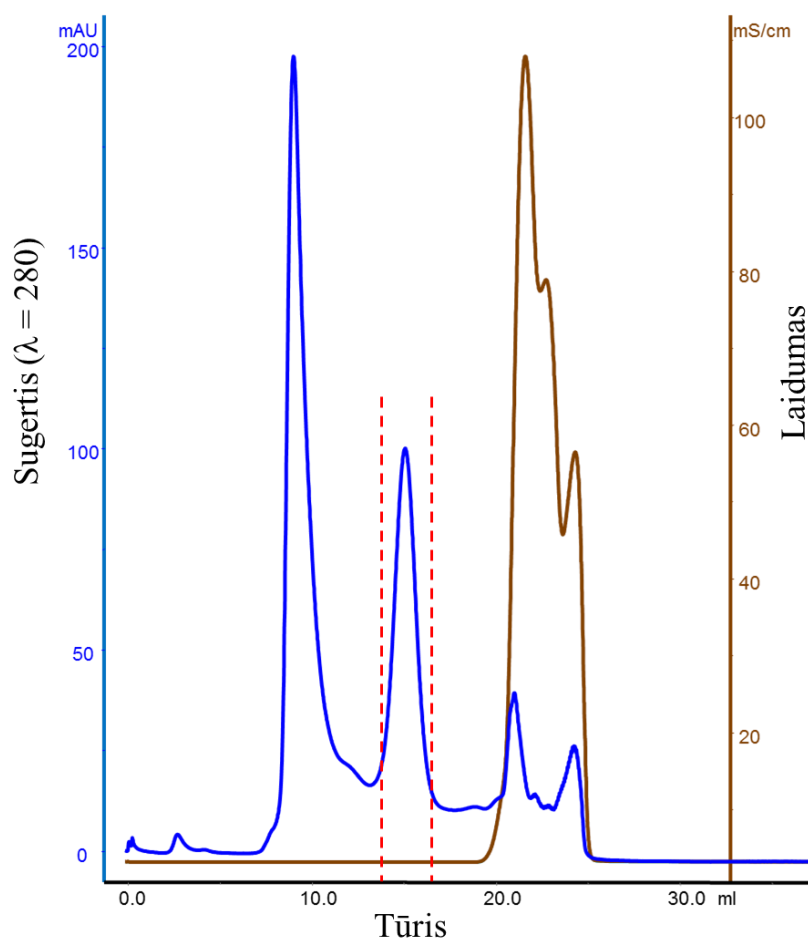
12 pav. Amiloido beta gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu. 1, 2 – mėginys po biomasės ardymo ultragarsu ir tirpių baltymų atskyrimo. 3 – mėginys po tarpinių kūnelių tirpinimo buferiniame tirpale B. 4 – mėginys po pakrautos kolonėlės praplovimo buferiniu tirpalu B. 5 – mėginys po kolonėlės praplovimo buferiniu tirpalu C. 6 – mėginys po kolonėlės praplovimo buferiniu tirpalu D. 7 – mėginys po kolonėlės praplovimo buferiniu tirpalu E. MM – molekulinės masės žymuo

12 pav. pateiktoje elektroforegamoje matyti, jog rekombinantinis Aβ42 buvo aptiktas visuose gryninimo metu paimtuose mėginiuose, panašūs rezultatai aprašomi ir (Walsh et al., 2009) literatūros šaltinyje. Taip pat kaip ir anksčiau minėtame literatūros šaltinyje, didžioji dalis Aβ42 buvo aptikta mėginyje, kuriame tarpiniai kūneliai buvo ištirpinti buferiniame tirpale **B** (**12 pav. 3**) ir tik maža dalis aptikta kartu su tirpiaisiais baltymais (**12 pav. 1 ir 2**). Buferinis tirpalas **B** su ištirpusiu Aβ42 buvo užneštas ant DEAE-sefarozės sorbento. Vėliau Aβ42 nuo sorbento desorbuotas laiptiniu gradientu didinant NaCl koncentraciją. Remiantis 12 pav. pateikta elektroforegrama, tolimesniam gryninimui buvo nutarta naudoti baltymo frakcijas, kurios buvo surinktos po baltymo desorbcijos buferiniu tirpalu **D** (**12 pav. 6**), kadangi būtent šiose frakcijose

buvo aptiktas pakankamai didelis kiekis A β 42 ir sąlyginai mažas kiekis priemaišinių baltymų, kuriuos nesunkiai galima atskirti gelfiltracijos metodu.

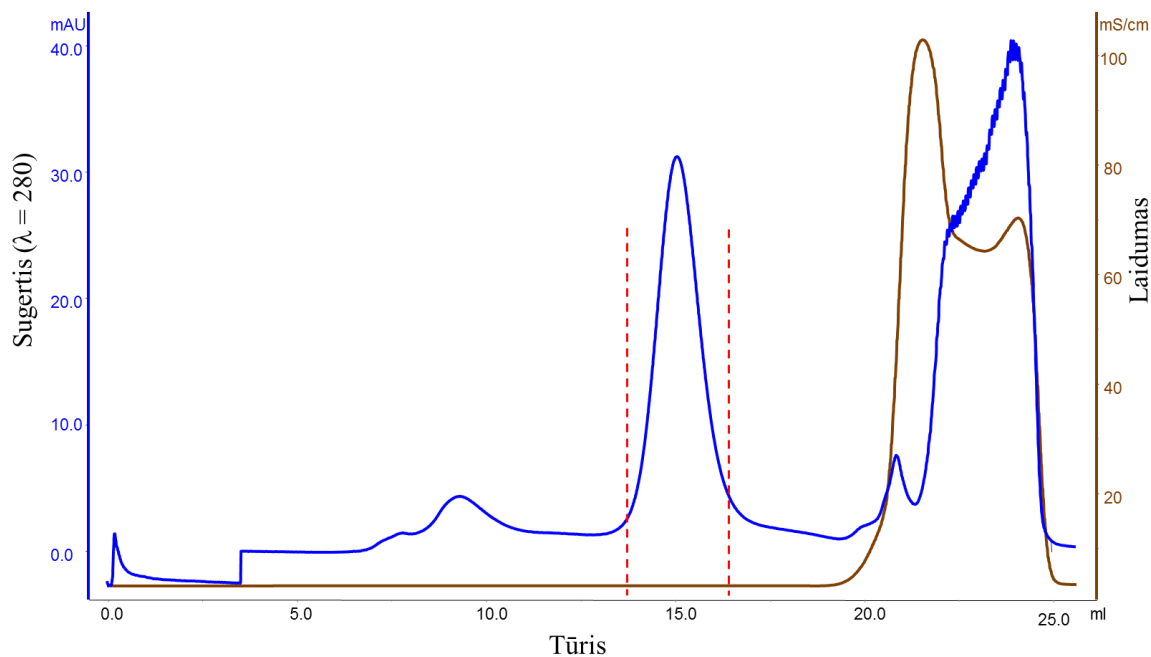
3.1.3. Amiloido beta gryninimas gelfiltracijos metodu

Amiloidas beta yra ypač agregatyvus baltymas (Hayden, Teplow, 2013), todėl frakcijos, surinktos po gryninimo jonų mainų chromatografijos metodu, buvo gryninamos gelfiltracijos metodu tik prieš pat agregacijos tyrimus. Gelfiltracijos metodu rekombinantinis A β 42 buvo atskirtas nuo galimai susidariusių A β 42 agregatų (dimerai, trimerai ir pan.) ir priemaišinių baltymų (**13 pav.**).



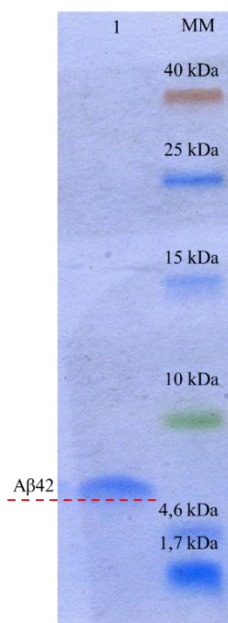
13 pav. Rekombinantinio A β 42 gryninimas gelfiltracijos metodu. Mėlyna linija – sugertis ($\lambda = 280$). Ruda linija – laidumas (mS/cm). Raudonos punktyrinės linijos žymi surenkamą baltymo tirpalą

Atlikus A β 42 gryninimą gelfiltracijos metodu, pastebėta, kad tikslinio baltymo smailė (pažymėta raudonomis punktyrinėmis linijomis) nevisiškai atsiskiria nuo priemaišinių baltymų smailės (kairėje pusėje nuo tikslinio baltymo smailės). Todėl buvo nuspręsta surinktas tikslinio baltymo frakcijas pakartotinai gryninti gelfiltracijos metodu (**14 pav.**).



14 pav. Pakartotinis rekombinantinio A β 42 gryninimas gelfiltracijos chromatografijos metodu. Mėlyna linija – sugertis ($\lambda = 280$). Ruda linija – laidumas (mS/cm). Raudonos punktyrinės linijos žymi surenkamą baltymo tirpalą

Remiantis 14 pav. pateikta chromatograma buvo padaryta išvada, jog po pakartotino gryninimo gelfiltracijos metodu A β 42 buvo visiškai atskirtas nuo įvairių priemaišų. Ši išvada buvo patvirtina atlikus mėginio analizę Tricino-NDS-PAAG elektroforezės metodu (**15 pav.**). 15 pav. pateiktoje elektroforegamoje matyti tik vieno baltymo juostelė.



15 pav. Po pakartotinės gelfiltracijos paimto mėginio analizė Tricino-NDS-PAAG elektroforezės metodu. 1 – mėginys paimtas po pakartotinės gelfiltracijos. MM – molekulinės masės žymuo

Visose anksčiau pateiktose elektroforegramose matyti, kad baltymo juostelė, kuri atitinka Aβ42, yra truputėlį aukščiau nei 4,6 kDa molekulinės masės žymuo, todėl siekiant galutinai patvirtinti, jog buvo išgrynintas reikiamas baltymas buvo nuspręsta atlikti mėginio, paimto po pakartotinio gryninimo gelfiltracijos metodu, masių spektrometrinę analizę (atliko dr. Vytautas Smirnovas). Gauti masių spektrometrinės analizės duomenys parodė, jog mėginyje esančio baltymo molekulinė masė sutampa su rekombinantinio Aβ42 molekulinė masė (**7 lentelė**), todėl buvo padaryta išvada, jog buvo gautas reikiamas baltymas.

7 lentelė. Masių spektrometrinės analizės duomenys

Teorinė rekombinantinio Aβ42 molekulinė mase, Da	Praktiškai išmatuota rekombinantinio Aβ42 molekulinė mase, Da
4645	4645 ± 1

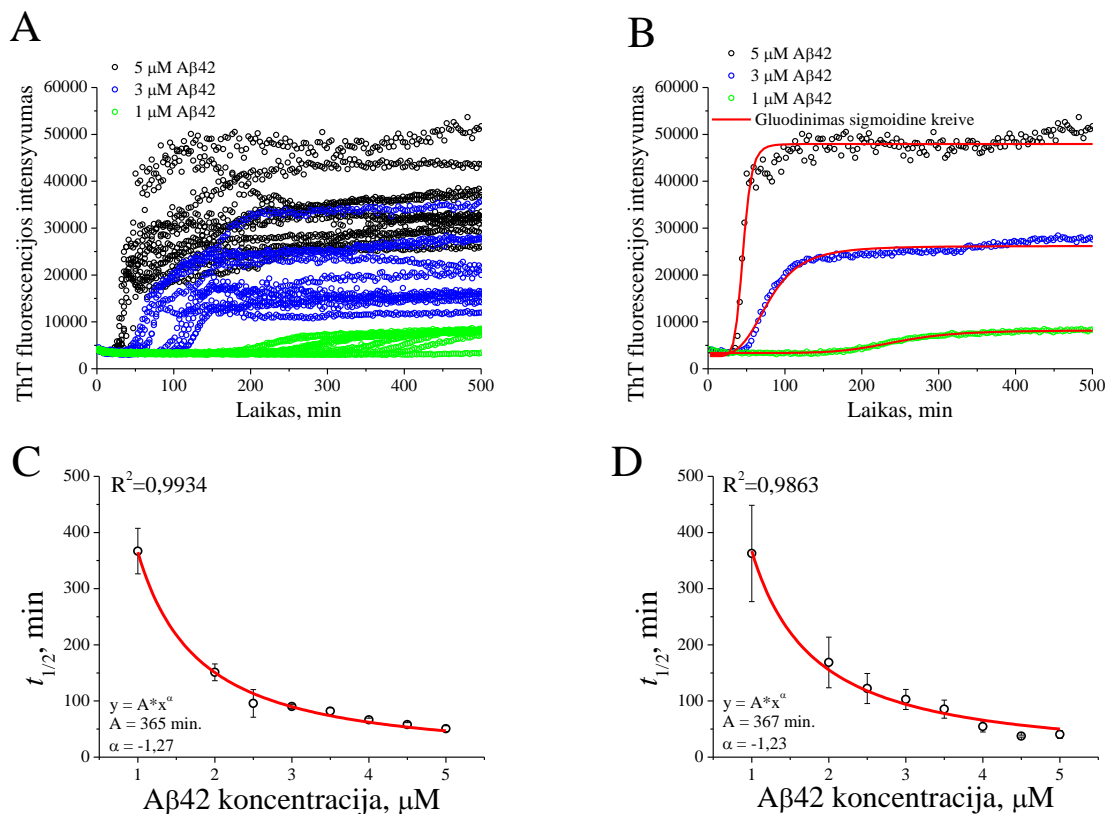
Viso darbo metu atlikti 44 gryninimai gelfiltracijos metodu (pirma gelfiltracija ir pakartotinė skaičiuojama kaip 1 gryninimas), po kurių iš viso buvo gauta $9,89 \pm 0,01$ mg gryno rekombinantinio Aβ42. Literatūros šaltinyje (Hellstrand et al., 2010) nurodoma, kad po kiekvieno gryninimo gelfiltracijos metodu buvo gaunama 5–12 μM gryno rekombinantinio Aβ42, šio darbo metu po kiekvieno gryninimo vidutiniškai buvo gaunama 24 ± 5 μM gryno baltymo.

3.2. Amiloido beta agregacijos tyrimas

3.2.1. Agregacijos puslaikio priklausomybė nuo A β 42 koncentracijos

Pasigaminus gryno rekombinantinio A β 42 visų pirma nuspręsta patikrinti kaip šis baltymas agreguoja ir ar yra gaunami gerai atsikartojantys duomenys, bei kaip rezultatai sutampa su aprašomais literatūroje.

Atlikti A β 42 agregacijos kinetikos tyrimai, kurių metu agregacijos procesas stebėtas matuojant amiloidams specifinio dažo ThT fluorescencijos pokytį laike, neapdorotų eksperimentinių duomenų pavyzdžiai pateikti **16 pav. A** grafike. A β 42 agregacijos tyrimų metu nustatyta eksponentinė agregacijos $t_{1/2}$ priklausomybė nuo A β 42 koncentracijos (**16 pav. C, D**). $t_{1/2}$ buvo nustatyta eksperimentinius duomenis gluodinant sigmoidine kreive (**16 pav. B**), kurią aprašo 1 lygtis. Kadangi buvo siekiama patikrinti ar A β 42, gautas po skirtingų gryninimų jonų mainų chromatografijos ir gelfiltracijos metodais, agreguoja taip pat ir ar gaunami rezultatai atsikartoja, buvo atlikti du A β 42 agregacijos $t_{1/2}$ priklausomybės nuo A β 42 koncentracijos tyrimai (**16 pav. C, D**).



16 pav. A β 42 agregacijos tyrimai. A – neapdoroti eksperimentiniai duomenys. B – eksperimentinių duomenų gluodinimas sigmoidine kreive. C, D – $t_{1/2}$ priklausomybė nuo A β 42 koncentracijos, juodi taškai eksperimentiniai duomenys, raudona linija – eksperimentinių duomenų gluodinimas eksponentine kreive. C ir D eksperimentų metu naudotas A β 42, gautas po skirtingų gryninimų jonų mainų chromatografijos ir gelfiltracijos metodais Paklaidos apskaičiuotos iš 6 pakartojimų

Iš 16 pav. C ir D grafikų matyti, jog Aβ42 agregacijos $t_{1/2}$ mažėja didėjant Aβ42 koncentracijai. Duomenis pabandyta gluodinti literatūros šaltinyje (Hellstrand et al., 2010) aprašoma eksponentine kreive, kurios lygtis yra:

$$y = Ax^\alpha \quad (3)$$

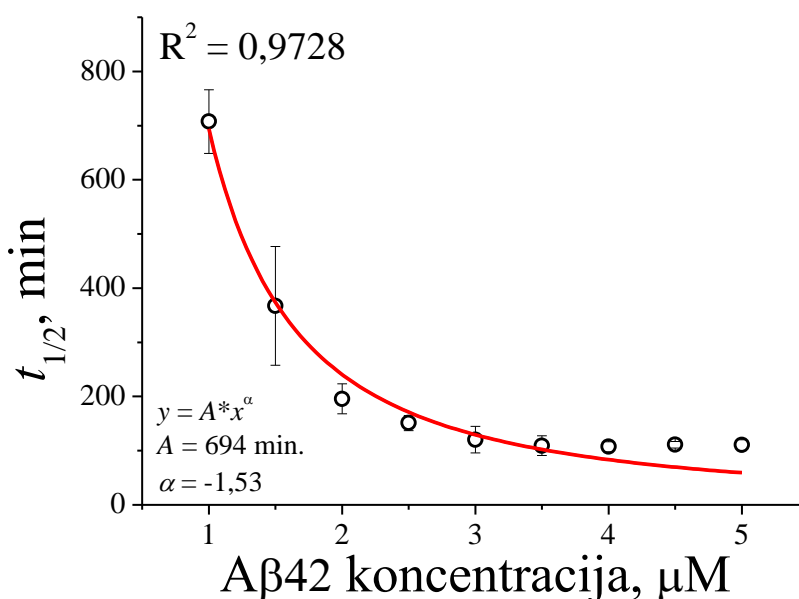
kur y – agregacijos $t_{1/2}$, x – Aβ42 koncentracija, A – proporcingumo konstanta, α – eksponentė.

Eksponentinė kreivė gerai aprašo eksperimentinius duomenis ($R^2 = 0,9934$ (16 pav. C); $R^2 = 0,9863$ (16 pav. D)).

Remiantis 16 pav. C ir D grafikais padaryta išvada, jog eksperimentai gerai atsikartoja, nes skirtingų eksperimentų metu nustatyti Aβ42 agregacijos puslaikiai praktiškai sutampa, taip pat A ir α konstantų reikšmės beveik vienodos (A – 365 min. ir 367 min.; α – -1,27 ir -1,23).

Šio tyrimo metu gauti rezultatai yra labai panašūs į literatūros šaltinyje (Hellstrand et al., 2010) aprašomus, todėl buvo padaryta išvada, jog buvo pasigamintas toks pats rekombinantinis Aβ42, bei sugebėta atkartoti agregacijos tyrimus aprašomus literatūros šaltinyje (Hellstrand et al., 2010). Toks rezultatų atsikartojamumas tarp skirtingų laboratorijų yra siekiamybė, kadangi kaip ir buvo pažymėta literatūrinėje apžvalgoje, mokslininkai dirbantys su amiloidu beta susiduria su prasto duomenų atsikartojamumo problema.

Kadangi agregacijos tyrimai buvo atliekami esant pastoviam 16 Hz dažnio purtymui nuspręsta patikrinti purtymo įtaką agregacijos puslaikui (17 pav.).



17 pav. Aβ42 agregacijos puslaikio priklausomybė nuo Aβ42 koncentracijos (be purtymo). Juodi apskritimai – eksperimentiniai duomenys. Raudona linija – gluodinimas eksponentine kreive. Paklaidos apskaičiuotos iš 4 pakartojimų

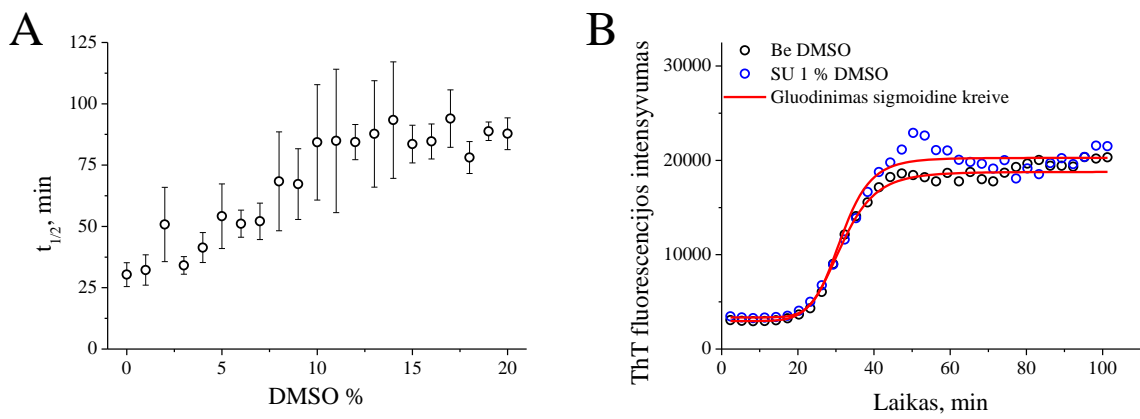
Palyginus 16 pav. ir 17 pav. pateiktus agregacijos puslaikius nustatyta, jog nepurtomo A β 42 agregacija vyksta lėčiau. Tiek su purtymu, tiek be purtymo nustatyta eksponentinė agregacijos $t_{1/2}$ priklausomybė nuo A β 42 koncentracijos. Panašūs rezultatai pateikiami (Cohen et al., 2013) literatūros šaltinyje.

Nustačius, jog su pasigamintu rekombinantiniu A β 42 galime atkartoti literatūroje aprašomus agregacijos tyrimus, nuspręsta pereiti prie agregacijos slopinimo tyrimų. Kadangi tyrimams su slopikliais reikia, kad baltymas pakankamai greitai agreguotų tolimesniems tyrimams nuspręsta naudoti 3 μ M A β 42 koncentraciją ir tyrimus atlikti esant pastoviam 16 Hz dažnio purtymui.

3.3. Flavonų, kaip potencialių amiloido beta agregacijos slopiklių įvertinimas

3.3.1. DMSO įtaka amiloido beta agregacijai

Šio darbo metu buvo norima įvertinti įvairių flavonų poveikį A β 42 agregacijai, todėl buvo paruošti pradiniai 20 mM koncentracijos flavonų tirpalai, iš kurių vėliau buvo atliekami skiedimai. Kadangi flavonai buvo tirpinami 100 % DMSO visų pirma nuspręsta patikrinti kokią įtaką A β 42 agregacijai daro likutinė DMSO koncentracija, kurią į mėginius įnešime kartu su flavonais (18 pav.).



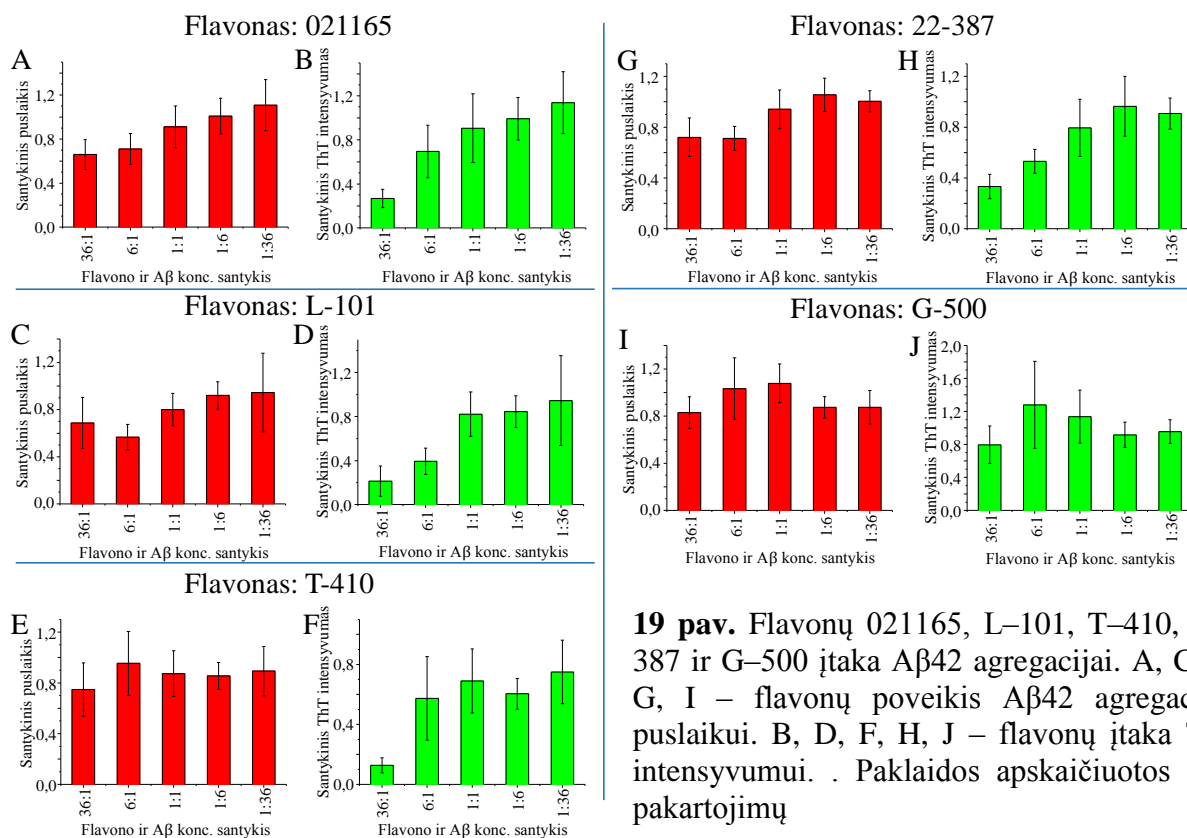
18 pav. DMSO įtaka A β 42 agregacijai. A – santykinio A β 42 agregacijos $t_{1/2}$ priklausomybė nuo DMSO koncentracijos. B – A β 42 agregacija be DMSO ir su 1 % DMSO. Paklaidos apskaičiuotos iš 4 pakartojimų

18 pav. A grafike matyti, jog augant DMSO koncentracijai lėtėja A β 42 agregacija. Remiantis 18 pav. A ir B grafikais padaryta išvada, jog 1 % DMSO nedaro didelės įtakos A β 42 agregacijai, todėl buvo nuspręsta, kad agregacijos tyrimuose su flavonais likutinė DMSO koncentracija neturi viršyti 1 %.

3.3.2. Flavonų įtakos amiloido beta agregacijai tyrimas

A β 42 agregacijos tyrimus su flavonais nuspręsta pradėti nuo penkių flavonų (021165; L–101; T–410; 22–387; G–500), kurie literatūroje yra įvardinami kaip stiprūs insulino agregacijos slopikliai (Malisauskas et al., 2015). Insulinas kaip ir A β 42 priklauso amiloidinių baltymų grupei (Sipe, Cohen, 2000), todėl buvo norima patikrinti ar šie flavonai neveikia kaip universalūs amiloidinių baltymų agregacijos slopikliai. Flavonas L–101 literatūroje taip pat įvardinamas kaip potencialus A β 42 agregacijos slopiklis (Akaishi et al., 2008), tačiau jo slopinimo požymiu yra laikomas ThT fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas, todėl šiuo tyrimu taip pat buvo norima patikrinti kokią įtaką šis flavonas daro A β 42 agregacijos $t_{1/2}$. Agregacijos tyrimai atlikti naudojant 3 μ M A β 42 koncentraciją, flavono ir A β 42 koncentracijų santykiai buvo: 36:1, 6:1, 1:1, 1:6 ir 1:36,

visuose mėginiuose buvo 1 % DMSO. Flavono poveikis A β 42 agregacijai įvertintas apskaičiuojant santykinę agregacijos puslaikį ($t_{1/2}$ (A β +Flavonas) / $t_{1/2}$ (A β)) ir ThT intensyvumą (I_{max} (A β +Flavonas) / I_{max} (A β)). (19 pav.).

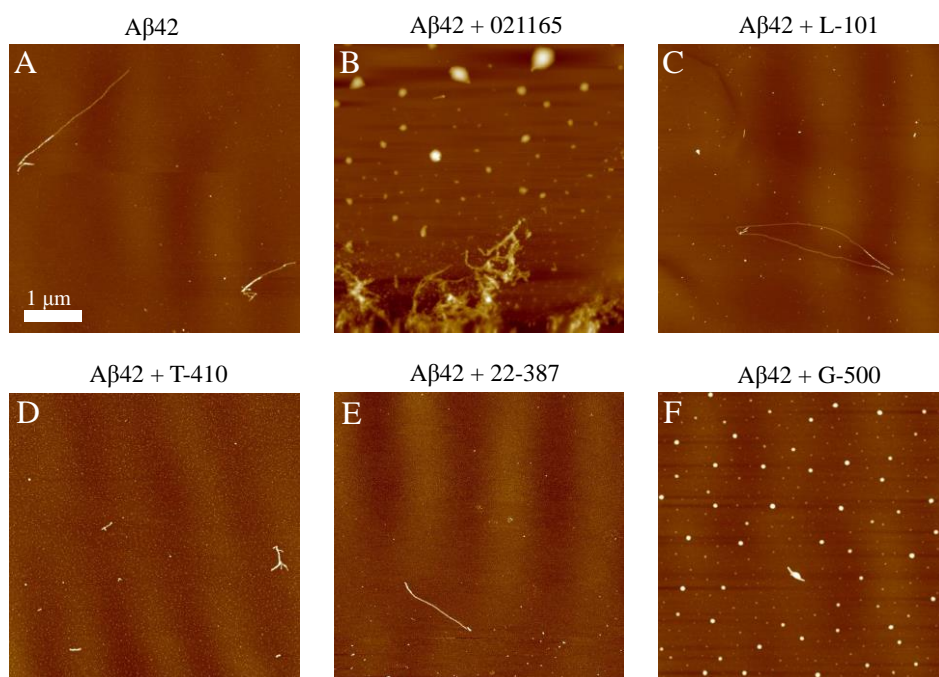


19 pav. Flavonų 021165, L–101, T–410, 22–387 ir G–500 įtaka A β 42 agregacijai. A, C, E, G, I – flavonų poveikis A β 42 agregacijos puslaikui. B, D, F, H, J – flavonų įtaka ThT intensyvumui. . Paklaidos apskaičiuotos iš 9 pakartojimų

19 pav. matyti, jog didinant 021165, L–101, T–410 ir 22–387 flavonų koncentracijas mažėja santykinis ThT fluorescencijos intensyvumas (19 pav. B, D, F, H), toks fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas literatūros šaltiniuose (Akaishi et al., 2008; Sharoar et al., 2012; Ushikubo et al., 2012) laikomas A β 42 agregacijos slopinimo požymiu, tačiau jei atkreipsime dėmesį į santykinę A β 42 agregacijos puslaikį (19 pav. A, C, E, G) pamatysime, kad didėjant flavonų koncentracijai santykinis A β 42 agregacijos puslaikis ne didėja, o mažėja arba beveik nekinta. Santykinio agregacijos puslaikio sumažėjimas reiškė jog šie flavonai skatina A β 42 agreguoti greičiau. Didinant flavono G–500 koncentraciją santykinis A β 42 agregacijos puslaikis ir ThT fluorescencijos intensyvumas praktiškai nepakito (19 pav. I, J). Literatūros šaltinyje (Akaishi et al., 2008) teigiama, jog ThT intensyvumas sumažėja, nes susidaro mažesnis kiekis A β 42 agregatų. Manant jog mažesnis kiekis agregatų susidaro dėl to, jog flavonas jungiasi prie A β 42 molekulių ir taip neleidžia joms agreguoti, turėtume matyti santykinio agregacijos puslaikio padidėjimą, kadangi kaip ir buvo parodyta 3.2.1. dalyje, agregacijos puslaikis yra priklausomas nuo A β 42 monomero koncentracijos. Kadangi 19 pav. matyti, jog didinat flavonų koncentraciją

ThT intensyvumas mažėja, o santykinis A β 42 agregacijos puslaikis nekinta arba mažėja, darome prielaidą, jog pastarieji penki flavonai neslopina A β 42 agregacijos, o tik trikdo ThT fluorescencijos intensyvumą. Šią prielaidą būtų galima paneigti arba patvirtinti A β 42 agregacijos su flavonais ir be flavonų metu matuojant dinaminį šviesos išsibarstymą. Tačiau šioms tyrimams reikia labai didelių kiekių baltymo (0,5–1 mg/ml) (Borgstahl, 2007; Shen et al., 1993), tokiose koncentracijose A β 42 suagreguotų gryninimo metu ir todėl negalėtume stebėti jo agregacijos proceso.

Siekiant įsitikinti, kad mėginiuose, kuriuose buvo didžiausios koncentracijos flavonų, tikrai susidarė fibrilės, mėginiai buvo ištirti atominės jėgos mikroskopu (**20 pav.**).



20 pav. A β 42 agregacijos mėginių mikroskopavimas atominės jėgos mikroskopu.

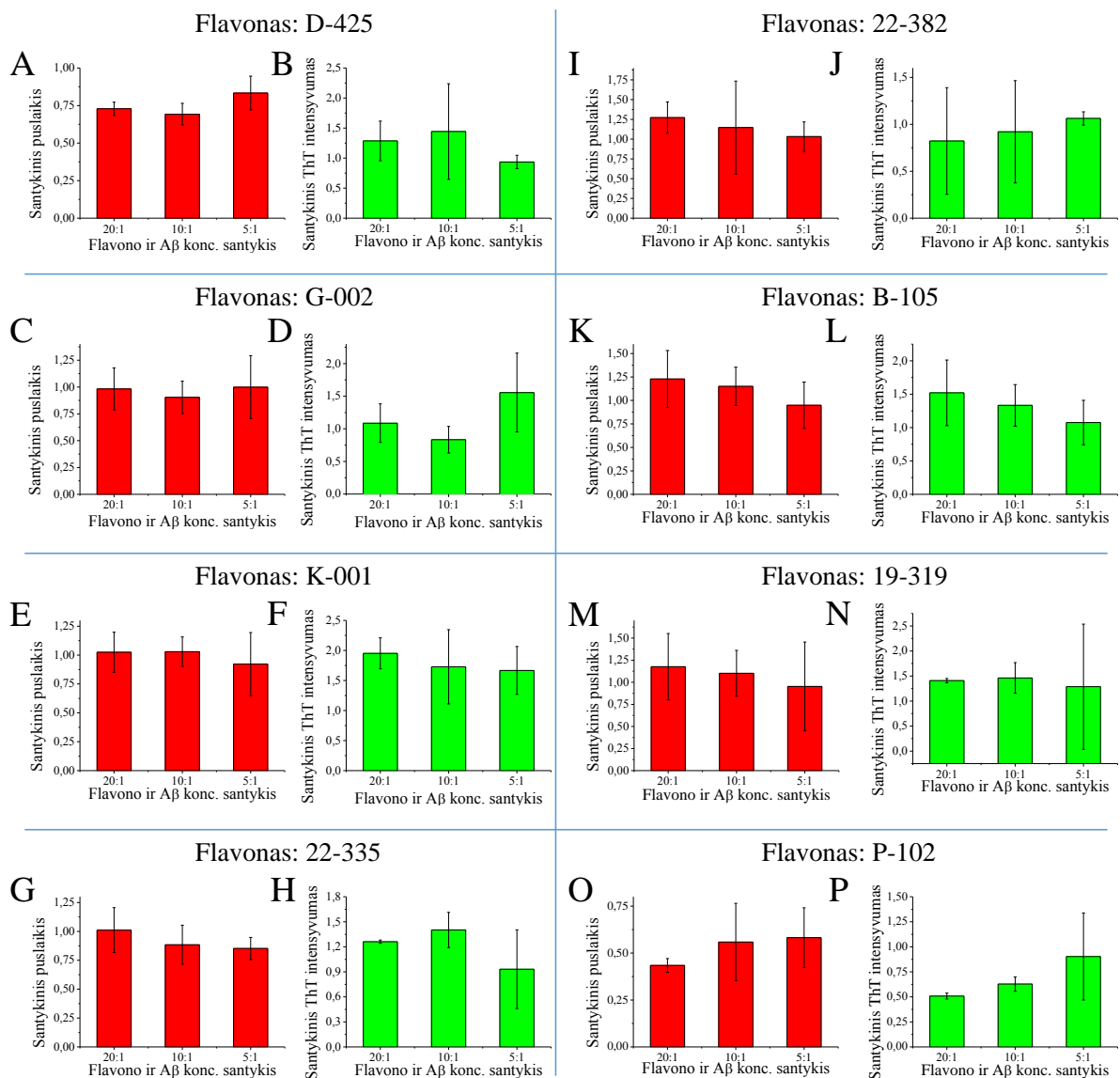
20 pav. A nuotraukoje matyti, jog nesant flavonų susidarė ilgesnės nei 1 μ m ilgio, 5–6 nm skersmens A β 42 fibrilės. Panašaus dydžio fibrilės susidarė ir mėginiuose, kuriuose buvo L–101 ir 22–387 flavonai (19. pav. C ir E). 20 pav. D ir F nuotraukose matyti, jog mėginiuose, kuriuose buvo T-410 ir G–500 flavonai, susidariusios fibrilės buvo trumpesnės nei 1 μ m ilgio, tačiau tokio pačio skersmens kaip ir fibrilės, kurios susidarė mėginiuose be flavonų. 20 pav. B nuotraukoje matyti, jog mėginiuose, kuriuose buvo 021165 flavonas, susidarė dideli kiekiai agregatų, kurių skersmuo buvo 6–10 nm. Mėginiuose aptiktų fibrilių dydis sutampa su aprašomu literatūros šaltinyje (Hayden, Teplow, 2013).

Pastarieji penki flavonai neslopino A β 42 agregacijos, o tik mažino ThT intensyvumą, todėl buvo nuspręsta atlikti tyrimus su visais 262 laboratorijoje turimais flavonais. Agregacijos tyrimai atlikti naudojant 3 μ M A β 42 koncentraciją, flavono ir A β 42 koncentracijų santykis buvo 50:1,

visuose mėginiuose buvo 1 % DMSO. Su kiekvienu flavonu atlikta tik po vieną matavimą, siekiant greitai atrinkti flavonus, kurie potencialiai galėtų slopinti A β 42 agregaciją (matavimų duomenys darbe nepateikiami). Šio tyrimo metu nustatyta, jog didžioji dalis (215) flavonų neslopino A β 42 agregacijos. Iš 262 flavonų tolimesniems tyrimams buvo pasirinkti 47, kurie labai stipriai slopino arba didino ThT fluorescencijos intensyvumą, dėl ko nebuvo galima nustatyti agregacijos puslaikio.

Su atrinktais 47 flavonais atlikti detalesni agregacijos tyrimai. Tyrimų metu nustatyta, jog iš 47 nė vienas flavonas nepasižymėjo stipriu A β 42 agregaciją slopinančiu poveikiu, 3 flavonai galimai labai silpnai slopino A β 42 agregaciją, tačiau dėl matavimų paklaidų dydžio sunku teisingai įvertinti šiuos rezultatus (**21 pav. I, K ir M**), o likusieji flavonai nedarė jokio poveikio (**21 pav. C, E ir G**) arba greitino (**21 pav. A ir O**) A β 42 agregaciją. ThT fluorescencijos išaugimas literatūros šaltiniuose (Akaishi et al., 2008; Ushikubo et al., 2012) laikomas A β 42 agregaciją skatinančiu požymiu, tačiau 21 pav. matyti, jog ThT fluorescencijos intensyvumą didino ir tie flavonai, kurie galimai silpnai lėtino A β 42 agregaciją (**21 pav. I, K ir M**) ir tie kurie nedarė jokio poveikio (**21 pav. E ir G**) ar greitino agregacijos procesą (**21 pav. A**), todėl flavonų įtaką A β 42 agregacijai vertinti tik pagal ThT fluorescencijos intensyvumo pokytį yra nekorektiška, kadangi matome, jog dalis flavonų, kurie panašiai veikia ThT fluorescencijos intensyvumą, skirtingai keičia agregacijos puslaikį. Remiantis pastaraisiais rezultatais darome išvadą, jog tarp A β 42 agregacijos puslaikio ir ThT fluorescencijos pokyčio nėra tiesioginio ryšio.

Literatūros šaltiniuose (Akaishi et al., 2008; Ushikubo et al., 2012) aprašomų A β 42 agregacijos slopinimo tyrimų metu didžiausias naudotas flavono ir A β koncentracijų santykis buvo 5:1 (100:20 μ M) šio darbo metu 50:1 (150:3 μ M), tačiau net ir esant tokiam dideliame flavono A β koncentracijų santykiui nė vienas flavonas nepasižymėjo A β 42 agregaciją slopinančiu poveikiu, dauguma flavonų nedarė jokios įtakos agregacijos puslaikiui, tačiau keitė ThT fluorescencijos intensyvumą. Dalis flavonų stipriai slopina ThT fluorescencijos intensyvumą, dėl ko negalime nustatyti A β 42 agregacijos puslaikio esant didelėms šių flavonų koncentracijoms, tad reikia surasti metodą, kuris leistų stebėti A β 42 agregaciją esant didelėms šių flavonų koncentracijoms.



21 pav. Flavonų įtaka Aβ42 agregacijai. A, C, E, G, I, K, M, O – flavonų poveikis Aβ42 agregacijos puslaikui. B, D, F, H, J, L, N, P – flavonų įtaka ThT intensyvumui. Paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų

Apibendrinant tyrimus su flavonais galime teigti, kad didžioji dalis flavonų neslopina Aβ42 agregacijos. Panašūs rezultatai ir išvados padarytos literatūros šaltinyje (Malisauskas et al., 2015), kuriame yra aprašomas flavonų poveikis insulino agregacijai. Flavonai 22-382, B-105 ir 19-319 galimai labai silpnai slopina Aβ42 agregaciją, todėl siekiant šiuos flavonus patvirtinti kaip potencialius Aβ42 agregacijos slopiklius, reikia atlikti platesnius tyrimus, kurių metu būtų įvertintas didesnių šių flavonų koncentracijų poveikis Aβ42 agregacijai, atlikti citotoksiškumo tyrimai, nustatytas slopinimo mechanizmas.

Išvados

1. Baigiamojo magistro darbo metu išgryninta $9,89 \pm 0,01$ mg rekombinantinio A β 42.
2. A β 42 agregacijos puslaikis eksponentiškai mažėja didėjant A β 42 koncentracijai. Darbo metu gauti A β 42 agregacijos kinetikos tyrimų rezultatai sutampa su aprašomais literatūros šaltiniuose (Cohen et al., 2013; Hellstrand et al., 2010).
3. Iš 262 tirtų flavonų nė vienas flavonas nepasižymėjo stipriu A β 42 agregaciją slopinančiu poveikiu.

Literatūros sąrašas

- Aisen, P., Gauthier, S., Vellas, B., Briand, R., Saumier, D., Laurin, J., Garceau, D. 2007. Alzhemed: A Potential Treatment for Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*, vol. 4, p. 473–478.
- Akaishi, T., Morimoto, T., Shibao, M., Watanabe, S., Sakai-Kato, K., Utsunomiya-Tate, N., Abe, K. 2008. Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid beta protein. *Neuroscience Letters*, vol. 444, p. 280–5.
- Amdursky, N., Erez, Y., Huppert, D. 2012. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. *Accounts of Chemical Research*, vol. 45, p. 1548–57.
- Bailey, J. A., Maloney, B., Ge, Y. W., Lahiri, D. K. 2011. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid B-peptide interacting domain (ABID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene*, vol. 488, p. 13–22.
- Baruch-Suchodolsky, R., Fischer, B. 2009. Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry*, vol. 48, p. 4354–70.
- Bhaskar, K., Lamb, B. 2012. Non-fibrillar Amyloidogenic Protein Assemblies - Common Cytotoxins Underlying Degenerative Diseases. *Non-Fibrillar Amyloidoigenic Protein Assemblies-Common Cytotoxins Underlying Degenerative Diseases*, p. 289–317.
- Biancalana, M., Koide, S. 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1804, p. 1405–12.
- Borgstahl, G. E. O. 2007. How to use dynamic light scattering to improve the likelihood of growing macromolecular crystals. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 363, p. 109–129.
- Braak, H., Del Tredici, K. 2011. Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? *Acta Neuropathologica*, vol. 121, p. 589–95.
- Cappai, R., Barnham, K. J. 2008. Delineating the mechanism of Alzheimer's disease Abeta peptide neurotoxicity. *Neurochemical Research*, vol. 33, p. 526–532.
- Cárdenas-Aguayo, M. C., Silva-Lucero, M. C., García, U. 2014. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. *Neurochemistry*, p. 1–26.
- Cohen, S. I. a, Linse, S., Luheshi, L. M., Hellstrand, E., White, D. a, Rajah, L., ... Knowles, T. P. J. 2013. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, p. 9758–63.

- Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A. M., Temussi, P. A., Picone, D. 2002. Solution structure of the Alzheimer amyloid Beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment: Similarity with a virus fusion domain. *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, p. 5642–5648.
- De Felice, F. G., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K., Fernandez, S. J., Ferreira, S. T., Klein, W. L. 2007. A β oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, p. 11590–11601.
- Doig, A. J. 2013. Inhibitor Design Against Cytotoxic β -Amyloid Species. *Alzheimer's Disease: Insights into Low Molecular Weight and Cytotoxic Aggregates from In Vitro and Computer Experiments*, p. 187–206.
- Doig, A. J., Derreumaux, P. 2015. Inhibition of protein aggregation and amyloid formation by small molecules. *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 30, p. 50–56.
- Ehrnhoefer, D. E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., ... Wanker, E. E. 2008. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 15, p. 558–566.
- Fezoui, Y., Hartley, D. M., Harper, J. D., Khurana, R., Walsh, D. M., Condrón, M. M., ... Teplow, D. B. 2000. An improved method of preparing the amyloid beta-protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, vol. 7, p. 166–178.
- Finder, V. H., Glockshuber, R. 2007. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegenerative Diseases*, vol. 4, p. 13–27.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, p. 571–607.
- Hayden, E. Y., Teplow, D. B. 2013. Biophysical Characterization of Amyloid beta Assembly. *Alzheimer's Disease: Insights into Low Molecular Weight and Cytotoxic Aggregates from In Vitro and Computer Experiments*, vol. 7, p. 83–125.
- Hamley, I. W. 2012. The amyloid beta peptide: A chemist's perspective. role in Alzheimer's and fibrillization. *Chemical Reviews*, vol. 112, p. 5147–5192.
- Hardy, J. 2009. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: A critical reappraisal. *Journal of Neurochemistry*, vol. 110, p. 1129–1134.
- Hellstrand, E., Boland, B., Walsh, D. M., Linse, S. 2010. Amyloid β -protein aggregation produces highly reproducible kinetic data and occurs by a two-phase process. *ACS Chemical Neuroscience*, vol. 1, p. 13–8.
- Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., Sato, K. 2003. Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate

- tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, p. 6370–6375.
- Igbavboa, U., Sun, G. Y., Weisman, G. a., He, Y., Wood, W. G. 2009. Amyloid β -protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes. *Neuroscience*, vol. 162, p. 328–338.
- Yamamoto, N., Matsubara, E., Maeda, S., Minagawa, H., Takashima, A., Maruyama, W., ... Yanagisawa, K. 2007. A ganglioside-induced toxic soluble A β assembly: Its enhanced formation from A β bearing the arctic mutation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, p. 2646–2655.
- Yamin, G. 2009. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 87, p. 1729–1736.
- Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., ... Cole, G. M. 2005. Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, p. 5892–5901.
- Yao, Z. X., Papadopoulos, V. 2002. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 16, p. 1677–1679.
- Kayed, R., Lasagna-Reeves, C. a. 2012. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *Advances in Alzheimer's Disease*, vol. 3, p. 67–78.
- Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. a, Krishna, V., Grover, R. K., ... Singh, S. 2005. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, vol. 151, p. 229–38.
- Kim, J. E., Lee, M. 2003. Fullerene inhibits beta-amyloid peptide aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 303, p. 576–579.
- Kirkitadze, M. D., Bitan, G., Teplow, D. B. 2002. Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: The emerging role of oligomeric assemblies. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 69, p. 567–577.
- Klein, W. L., Stine, W. B., Teplow, D. B. 2004. Small assemblies of unmodified amyloid β -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, vol. 25, p. 569–580.
- Koo, E. H., Squazzo, S. L. 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, p. 17386–17389.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., Oddo, S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, vol. 8, p. 499–509.

- Lambert, M. P., Viola, K. L., Chromy, B. a., Chang, L., Morgan, T. E., Yu, J., ... Klein, W. L. 2001. Vaccination with soluble A β oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *Journal of Neurochemistry*, vol. 79, p. 595–605.
- Laurén, J., Gimbel, D. a, Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., Strittmatter, S. M. 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, vol. 457, p. 1128–1132.
- Magdesian, M. H., Carvalho, M. M. V. F., Mendes, F. a., Saraiva, L. M., Juliano, M. a., Juliano, L., ... Ferreira, S. T. 2008. Amyloid- β binds to the extracellular cysteine-rich domain of frizzled and inhibits Wnt/ β -catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, p. 9359–9368.
- Malisauskas, R., Botyriute, A., Cannon, J. G., Smirnovas, V. 2015. Flavone Derivatives as Inhibitors of Insulin Amyloid-Like Fibril Formation. *Plos One*, vol. 10, p. 1–14.
- Maloney, B., Lahiri, D. K. 2011. The Alzheimer's amyloid beta-peptide (A β) binds a specific DNA AB-interacting domain (ABID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: Characterizing a new regulatory motif. *Gene*, vol. 488, p. 1–12.
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., Kivipelto, M. 2010. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology*, vol. 9, p. 702–716.
- McKoy, A. F., Chen, J., Schupbach, T., Hecht, M. H. 2012. A novel inhibitor of amyloid β (A β) peptide aggregation: from high throughput screening to efficacy in an animal model of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, p. 38992–9000.
- Necula, M., Breydo, L., Milton, S., Kaye, R., Van Der Veer, W. E., Tone, P., Glabe, C. G. 2007. Methylene blue inhibits amyloid A β oligomerization by promoting fibrillization. *Biochemistry*, vol. 46, p. 8850–8860.
- Neddenriep, B., Calciano, A., Conti, D., Sauve, E., Paterson, M., Bruno, E., Moffet, D. A. 2011. Short Peptides as Inhibitors of Amyloid Aggregation. *The Open Biotechnology Journal*, vol. 5, p. 39–46.
- Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., ... Fink, a L. 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*, vol. 40, p. 6036–46.
- Nieznanski, K., Choi, J.-K., Chen, S., Surewicz, K., Surewicz, W. K. 2012. Soluble prion protein inhibits amyloid- β (A β) fibrillization and toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, p. 33104–8.
- Paban, V., Manrique, C., Filali, M., Maunoir-Regimbal, S., Fauvelle, F., Alescio-Lautier, B. 2014. Therapeutic and preventive effects of methylene blue on Alzheimer's disease pathology in a transgenic mouse model. *Neuropharmacology*, vol. 76, p. 68–79.
- Pappolla, M., Bozner, P., Soto, C., Shao, H., Robakis, N. K., Zagorski, M., ... Ghiso, J. 1998. Inhibition of Alzheimer β -fibrillogenesis by melatonin. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, p. 7185–7188.

- Pearson, H. a, Peers, C. 2006. Physiological roles for amyloid beta peptides. *The Journal of Physiology*, vol. 575, p. 5–10.
- Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., Tycko, R. 2002. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, p. 16742–16747.
- Plečkaitytė, M. 2010. Alzheimerio liga: molekulinis mechanizmas, naujos hipotezės, gydymo perspektyvos. *Medicina*, vol. 46, p. 70–76.
- Qin, L., Vastl, J., Gao, J. 2010. Highly sensitive amyloid detection enabled by thioflavin T dimers. *Molecular bioSystems*, vol. 6, p. 1791–5.
- Reitz, C., Mayeux, R. 2014. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, vol. 88, p. 640–651.
- Sabate, R., Rodriguez-Santiago, L., Sodupe, M., Saupe, S. J., Ventura, S. 2013. Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, vol. 49, p. 5745–7.
- Saido, T., Leissring, M. a. 2012. Proteolytic degradation of amyloid β -protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 2, p. 1–18.
- Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, vol. 1, p. 16–22.
- Selkoe, D. 1994. Cell Biology of the Amyloid -Protein Precursor and the Mechanism of Alzheimer's Disease. *Annual Review Cell Biology*, vol. 10, p. 373–403.
- Selkoe, D. J., Podlisny, M. B. 2002. Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, vol. 3, p. 67–99.
- Sgourakis, N. G., Yan, Y., McCallum, S. a, Wang, C., Garcia, A. E. 2007. The Alzheimer's Peptides AB40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water: A Combined MD / NMR Study. *Journal of Molecular Biology*, vol. 368, p. 1448–1457.
- Sgourakis, N. G., Merced-Serrano, M., Boutsidis, C., Drineas, P., Du, Z., Wang, C., Garcia, A. E. 2011. Atomic-level characterization of the ensemble of the AB(1-42) monomer in water using unbiased molecular dynamics simulations and spectral algorithms. *Journal of Molecular Biology*, vol. 405, p. 570–583.
- Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., Sabatini, B. L. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 27, p. 2866–2875.
- Sharoar, M. G., Thapa, A., Shah Nawaz, M., Ramasamy, V. S., Woo, E.-R., Shin, S. Y., Park, I.-S. 2012. Keampferol-3-O-rhamnoside abrogates amyloid beta toxicity by modulating

- monomers and remodeling oligomers and fibrils to non-toxic aggregates. *Journal of Biomedical Science*, vol. 19, p. 104.
- Shen, C. L., Scott, G. L., Merchant, F., Murphy, R. M. 1993. Light scattering analysis of fibril growth from the amino-terminal fragment beta(1-28) of beta-amyloid peptide. *Biophysical Journal*, vol. 65, p. 2383–2395.
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., ... Frangione, B. 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 258, p. 126–9.
- Sipe, J. D., Cohen, A. S. 2000. Review: history of the amyloid fibril. *Journal of Structural Biology*, vol. 130, p. 88–98.
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., ... Moir, R. D. 2010. The Alzheimer's disease-associated amyloid B-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE*, vol. 5, p. 1–10.
- Soto, C., Castaño, E. M., Kumar, R. a, Beavis, R. C., Frangione, B. 1995. Fibrillogenesis of synthetic amyloid-beta peptides is dependent on their initial secondary structure. *Neuroscience Letters*, vol. 200, p. 105–108.
- Stine, W. B., Dahlgren, K. N., Krafft, G. a., LaDu, M. J. 2003. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, p. 11612–11622.
- Stöhr, J., Watts, J. C., Mensinger, Z. L., Oehler, A., Grillo, S. K., DeArmond, S. J., ... Giles, K. 2012. Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (A β) prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, p. 11025–30.
- Studier, F. W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, vol. 41, p. 207–234.
- Sulatskaya, A. I., Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K. 2011. Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: stoichiometry and affinity of dye binding, absorption spectra of bound dye. *The Journal of Physical Chemistry. B*, vol. 115, p. 11519–24.
- Taylor, B. M., Sarver, R. W., Fici, G., Poorman, R. a, Lutzke, B. S., Molinari, A., ... Epps, D. E. 2003. Spontaneous aggregation and cytotoxicity of the beta-amyloid Abeta1-40: a kinetic model. *Journal of Protein Chemistry*, vol. 22, p. 31–40.
- Takahashi, R. H., Nam, E. E., Edgar, M., Gouras, G. K. 2002. Alzheimer beta-amyloid peptides: normal and abnormal localization. *Histology and Histopathology*, vol. 17, p. 239–246.
- Teplow, D. B. 2006. Preparation of amyloid beta-protein for structural and functional studies. *Methods in Enzymology*, vol. 413, p. 20–33.
- Townsend, M., Mehta, T., Selkoe, D. J. 2007. Soluble AB inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, p. 33305–33312.

- Ushikubo, H., Watanabe, S., Tanimoto, Y., Abe, K., Hiza, A., Ogawa, T., ... Akaishi, T. 2012. 3,3',4',5,5'-Pentahydroxyflavone is a potent inhibitor of amyloid β fibril formation. *Neuroscience Letters*, vol. 513, p. 51–6.
- Vandersteen, A., Hubin, E., Sarroukh, R., De Baets, G., Schymkowitz, J., Rousseau, F., ... Broersen, K. 2012. A comparative analysis of the aggregation behavior of amyloid- β peptide variants. *FEBS Letters*, vol. 586, p. 4088–93.
- Vardy, E. R. L. C., Catto, A. J., Hooper, N. M. 2005. Proteolytic mechanisms in amyloid-beta metabolism: Therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, vol. 11, p. 464–472.
- Viet, M. H., Ngo, S. T., Lam, N. S., Li, M. S. 2011. Inhibition of aggregation of amyloid peptides by beta-sheet breaker peptides and their binding affinity. *The Journal of Physical Chemistry. B*, vol. 115, p. 7433–46.
- Vignaud, H., Bobo, C., Lascu, I., Sörgjerd, K. M., Zako, T., Maeda, M., ... Cullin, C. 2013. A structure-toxicity study of A β 42 reveals a new anti-parallel aggregation pathway. *PLoS ONE*, vol. 8, p. 1–13.
- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., ... Teplow, D. B. 1999. Amyloid Beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, p. 25945–25952.
- Walsh, D. M., Selkoe, D. J. 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*, vol. 44, p. 181–193.
- Walsh, D. M., Thulin, E., Minogue, A. M., Gustavsson, N., Pang, E., Teplow, D. B., Linse, S. 2009. A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta-peptide. *The FEBS Journal*, vol. 276, p. 1266–81.
- Wang, H. W., Pasternak, J. F., Kuo, H., Ristic, H., Lambert, M. P., Chromy, B., ... Trommer, B. L. 2002. Soluble oligomers of β amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Research*, vol. 924, p. 133–140.
- Wilson, C. A., Doms, R. W., Lee, V. M. 2013. University of Pennsylvania School of Medicine Science Overview : APP and Amyloid Beta in Alzheimer ' s Intracellular APP processing and A-beta production in Alzheimer ' s disease, p. 1–11.
- Zagorski, M. G., Barrow, C. J. 1992. NMR studies of amyloid beta-peptides: Proton assignments, secondary structure, and mechanism of an alpha-helix --> beta-sheet conversion for a homologous, 28-residue, N-terminal fragment. *Biochemistry*, vol. 31, p. 5621–5631.
- Zagorski, M. G., Yang, J., Shao, H., Ma, K., Zeng, H., Hong, A. 1999. Methodological and chemical factors affecting amyloid β peptide amyloidogenicity. *Methods in Enzymology*, vol. 309, p. 189–204.
- Zhao, D., Watson, J. B., Xie, C.-W. 2004. Amyloid beta prevents activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor phosphorylation

during hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neurophysiology*, vol. 92, p. 2853–2858.

Zhao, W.-Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., ... Klein, W. L. 2008. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 22, p. 246–260.

Zou, K., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., Michikawa, M. 2002. A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, p. 4833–4841.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju baigiamojo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui ir dr. Linai Baranauskienei už suteiktas žinias, naudingus patarimus bei pastabas baigiamojo magistro darbo metu. Taip pat dėkoju dr. Christophe Cullin iš Prancūzijos Bordo Segalen universiteto, kuris maloniai sutiko padovanoti *pet3a* plazmidę su įklonuotu A β 42 baltymą koduojančiu genu, bei Prof. dr Roland Winter iš Vokietijos Dortmundo technikos universiteto, už galimybę pasinaudoti atominės jėgos mikroskopu.

Priedai

5 lentelė. Flavonai ir jų kodiniai pavadinimai

Pavadinimas	Kodas	Pavadinimas	Kodas
Galanginas, 3,5,7-Trihidroksiflavonas	020067	6,8-Dichloro-4'-metilflavonas	19-308
Akacetinas, 5,7-Dihidrokiy-4'-metoksiflavonas	020072	4'-metilflavonas	19-311
Diosmetinas, 5,7,3'-Trihidroksi-4'-metoksiflavonas	020082	4'-Bromo-6-chloroflavonas	19-315
5,7-Dimetoksiflavonas	021010	4'-Bromo-6-chloro-7-metilflavonas	19-316
Kuercetageninas, 3,3',4',5,6,7-Heksahidroksiflavonas	021030	4'-Bromo-6-metilflavonas	19-318
Kaempferolio-3,7,4'-trimetil eteris	021070	6-Bromo-2'-metilflavonas	19-319
Kuercetino-3,7,3',4'-tetrametil eteris	021074	6-Bromo-3'-metilflavonas	19-320
6-metoksiluteolinas, 6-metoksi 5,7,3',4'-tetrahidroksiflavonas	021084	6-Chloro-7,2'-dimetilflavonas	19-322
Skutolareinas, 5,6,7,4'-Tetrahidroksiflavonas	021165	6-Chloro-7,3'-dimetilflavonas	19-323
3-metoksiflavonas	021188	6-Chloro-2'-metilflavonas	19-326
Skutolareino tetrametil eteris	021278	6,4'-Dibromoflavonas	19-327
Kuercetino-3,5,7,3',4'-pentametil eteris	021285	6,8-Dichloro-2'-metilflavonas	19-328
Homoorientinas, Luteolino-6-C-Gliukozidas	021055S	6,2'-Dimetilflavonas	19-329
Rhamnetinas, 3,3',4',5-Tetrahidroksi-7-metoksiflavonas	021136S	6,3'-Dimetilflavonas	19-330
Morinas, 3,5,7,2',4'-Pentahidroksiflavonas	021344S	2'-Bromo-6-chloroflavonas	19-386
Tangeretinas, 4',5,6,7,8-Pentametoksiflavonas	06-026	8-Bromo-6-chloro-2',5'-dimetoksiflavonas	19-829
8-Karboksi-3-metilflavonas	16-001	6-Chloro-2',5'-dimetoksi-7-metilflavonas	19-831
6-Bromo-4'-chloroflavonas	17-018	2',5'-Dimetoksiflavonas	19-833
6-Bromoflavonas	17-024	2',5'-Dimetoksi-6-fluoroflavonas	19-834
4'-Chloro-6,8-dibromoflavonas	17-041	3',5'-Dihidroksiflavonas	19-868
4'-Chloroflavonas	17-042	4'-Benziloksi-5,7-dimetoksiflavonas	19-887
6-Chloroflavonas	17-043	3-hidroksi-7,2',4'-trimetoksiflavonas	22-201
4'-Chloro-6-metilflavonas	17-044	3-hidroksi-6,2',4'-trimetoksiflavonas	22-204
6-Chloro-7-metilflavonas	17-069	3,6,2',4'-Tetrahidroksiflavonas	22-205
6,8-Dibromoflavonas	17-092	3,4'-Dihidroksiflavonas	22-206
6,4'-Dichloroflavonas	17-105	2',4'-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-211
6,8-Dichloroflavonas	17-106	3-hidroksi-6,2',3'-trimetoksiflavonas	22-215
6,4'-Dichloro-7-metilflavonas	17-111	3-hidroksi-7,2',3'-trimetoksiflavonas	22-216
6,8,4'-Trichloroflavonas	17-156	2',3'-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-219
6-Bromo-2'-chloroflavonas	19-180	3-hidroksi-6,3',4'-trimetoksiflavonas	22-222
6,2'-Dichloroflavonas	19-201	7,4'-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-301
2',6'-Dichloro-7-metilflavonas	19-203	2',4'-Dimetoksi-3-hidroksi-6-metilflavonas	22-304
6,8,2'-Trichloroflavonas	19-208	3-hidroksi-4'-metoksi-6-metilflavonas	22-306
8-Bromo-2',6-dichloroflavonas	19-209	3-hidroksi-3',4',5'-trimetoksiflavonas	22-308
2'-Chloroflavonas	19-210	3,6,3',4'-Tetrametoksiflavonas	22-309
2'-Chloro-6-metilflavonas	19-211	3',4'-Dimetoksi-3-hidroksi-6-metilflavonas	22-317
6-Bromo-4'-metilflavonas	19-298	3,6,2',3'-Tetrahidroksiflavonas	22-318
6-Chloro-7,4'-dimetilflavonas	19-300	3,6,2',3'-Tetrametoksiflavonas	22-319
6-Chloro-4'-metilflavonas	19-301	7,3',4',5'-Tetrametoksiflavonas	22-320
6,2',4'-Trimetoksiflavonas	22-322	3,3',7,8-Tetrametoksiflavonas	22-399

6,2',3'-Trimetoksiflavonas	22-323	3,7,8,4'-Tetrametoksiflavonas	22-400
6,2',3'-Trihidroksiflavonas	22-324	3-hidroksi-7,8,2',3'-tetrametoksiflavonas	22-403
7,3'-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-326	Apigeninas, 5,7,4'-Trihidroksiflavonas	A-002
3,7,3'-Trihidroksiflavonas	22-327	5,7,4'-Trimetoksiflavonas	A-106
3,7,3'-Trimetoksiflavonas	22-328	Baikaleinas, 5,6,7-Trihidroksiflavonas	B-101
7,2',3'-Trimetoksiflavonas	22-329	3'-Benziloksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavonas	B-105
7,2',4'-Trimetoksiflavonas	22-330	Baikaleino-5,6,7-trimetileteris	B-251
3'-hidroksi- α -naftoflavonas	22-331	5,7-Dihidroksiflavonas	C-005
3'-hidroksi- β -naftoflavonas	22-332	Miricetas, 3,5,7,3',4',5'-Heksahidroksiflavonas	C-101
6,3'-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-333	7,8-Dihidroksiflavonas	D-008
3,6,3'-Trihidroksiflavonas	22-334	7,8-Dimetoksiflavonas	D-024
3,6,3'-Trimetoksiflavonas	22-335	3,7-Dihidroksi-3',4'-dimetoksiflavonas	D-111
6,7,3'-Trihidroksiflavonas	22-336	6,7-Dihidroksiflavonas	D-112
5,7,3',4',5'-Pentahidroksiflavonas	22-340	5,4'-Dihidroksi-7-metoksiflavonas	D-115
7,3',4',5'-Tetrahidroksiflavonas	22-341	5,6-Dihidroksi-7-metoksiflavonas	D-116
3,6,3',4'-Tetrahidroksiflavonas	22-344	5,3'-Dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavonas	D-123
3-hidroksi-7,3',4',5'-tetrametoksiflavonas	22-345	3',4'-Dimetoksiflavonas	D-204
3,7,3',4',5'-Pentametoksiflavonas	22-346	6,4'-Dihidroksiflavonas	D-250
6,2'-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-349	5,4'-Dihidroksiflavonas	D-251
3,6,2'-Trimetoksiflavonas	22-352	3,2'-Dihidroksiflavonas	D-252
7,2'-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-354	5,2'-Dihidroksiflavonas	D-253
3,6,2'-Trihidroksiflavonas	22-355	6,2'-Dihidroksiflavonas	D-254
3,3',4'-Trimetoksiflavonas	22-356	7,2'-Dihidroksiflavonas	D-255
5,6-Dihidroksiflavonas	22-357	3,6-Dihidroksiflavonas	D-256
5,7,3'-Trimetoksiflavonas	22-358	3,7-Dihidroksiflavonas	D-257
3'-metoksi-6-metilflavonas	22-359	3',4'-Dihidroksiflavonas	D-258
3'-metoksi-8-metilflavonas	22-360	5,4'-Dimetoksiflavonas	D-260
2'-metoksi-6-metilflavonas	22-361	5,2'-Dimetoksiflavonas	D-263
5,7,2'-Trimetoksiflavonas	22-362	6,2'-Dimetoksiflavonas	D-264
3'-hidroksi-6-metilflavonas	22-363	6,4'-Dimetoksiflavonas	D-265
4'-hidroksi-6-metilflavonas	22-364	7,2'-Dimetoksiflavonas	D-266
3-hidroksi-2',4',5'-trimetoksiflavonas	22-375	2',3'-Dihidroksiflavonas	D-406
3-hidroksi-2',4',5',6-tetrametoksi flavonas	22-379	2',4'-Dihidroksiflavonas	D-407
3,2',4',5',6-Pentametoksiflavonas	22-381	3,5-Dihidroksiflavonas	D-408
3,2',4',5'-Tetrametoksiflavonas	22-382	5,3'-Dihidroksiflavonas	D-409
5,7-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-385	6,3'-Dihidroksiflavonas	D-410
3-hidroksi-6-metil-3',4'-metilenedioksi flavonas	22-386	7,3'-Dihidroksiflavonas	D-411
3,6,2',4',5'-Pentahidroksiflavonas	22-387	7,4'-Dihidroksiflavonas	D-412
3,7,2',4',5'-Pentametoksiflavonas	22-388	3',4'-Dihidroksi- α -naftoflavonas	D-413
3-hidroksi-7,8,2'-trimetoksiflavonas	22-390	3',4'-Dihidroksi- β -naftoflavonas	D-414
3-hidroksi-7,8,3'-trimetoksiflavonas	22-391	2',4'-Dimetoksiflavonas	D-420
3,7,8,2'-Tetrahidroksiflavonas	22-392	3,2'-Dimetoksiflavonas	D-421
6,7,3',4'-Tetrahidroksiflavonas	22-393	3,3'-Dimetoksiflavonas	D-422
6,7,3',4'-Tetrametoksiflavonas	22-395	3,4'-Dimetoksiflavonas	D-423
3-hidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavonas	22-398	3,6-Dimetoksiflavonas	D-425
3,7-Dimetoksiflavonas	D-426	8-hidroksi-7-metoksiflavonas	H-428

5,3'-Dimetoksiflavonas	D-427	4'-hidroksi- α -naftooflavonas	H-432
6,3'-Dimetoksiflavonas	D-428	4'-hidroksi- β -naftooflavonas	H-433
6,7-Dimetoksiflavonas	D-429	7-hidroksi-5-metilflavonas	H-439
7,3'-Dimetoksiflavonas	D-430	7-hidroksi-3-metilflavonas	H-440
7,4'-Dimetoksiflavonas	D-431	6-hidroksi-4'-metoksiflavonas	H-500
3',4'-Dimetoksi- α -naftooflavonas	D-432	2'-hidroksi- α -naftooflavonas	H-510
5,3'-Dimetoksiflavonas	D-427	6,4'-Dimetoksi-3-hidroksiflavonas	H-601
6,3'-Dimetoksiflavonas	D-428	6-hidroksi-7-metoksiflavonas	H-602
6,7-Dimetoksiflavonas	D-429	2'-hidroksi- β -naftooflavonas	H-603
7,3'-Dimetoksiflavonas	D-430	Karanjinas, 3-metoksi furano - 2, 3, 7, 8-flavonas	K-001
7,4'-Dimetoksiflavonas	D-431	Kaempferidas, 4'-metoksi-3,5,7-trihidroksiflavonas	K-101
3',4'-Dimetoksi- α -naftooflavonas	D-432	Kaempferolis, 3,5,7,4'-Tetrahidroksiflavonas	K-102
3',4'-Dimetoksi- β -naftooflavonas	D-433	Luteolinas, 5,7,3',4'-Tetrahidroksiflavonas	L-101
3,3'-Dihidroksiflavonas	D-602	5,7,3',4'-Tetrametoksiflavonas	L-102
2',3'-Dimetoksiflavonas	D-603	2'-metoksiflavonas	M-012
3',4'-Dimetoksiflavonas, 3-hidroksi-3',4'-Dimetoksiflavonas	D-604	4'-metoksiflavonas	M-013
Fisetinas, 3,7,3',4'-Tetrahidroksiflavonas	F-002	5-metoksiflavonas	M-014
Flavonas	F-003	6-metoksiflavonas	M-015
3-hidroksiflavonas	F-004	7-metoksiflavonas	M-016
Gardeninas, 5-hidroksi-3',4',5',6,7,8-Heksametoksiflavonas	G-001	6-metilflavonas	M-022
Gosipinas, 3,3',4',5,7,8-Heksahidroksiflavonas-8-glucoside	G-002	3,5,7-Trihidroksi-3',4',5'-trimetoksiflavonas	M-116
Gosipetinas, 3,5,7,8,3',4'-Heksahidroksiflavonas	G-500	4'-metoksi- α -naftooflavonas	M-251
5-hidroksiflavonas	H-025	4'-metoksi- β -naftooflavonas	M-252
6-hidroksiflavonas	H-026	4'-hidroksi-5-metoksiflavonas	M-401
7-hidroksiflavonas	H-027	4'-hidroksi-6-metoksiflavonas	M-402
5-hidroksi-7-metoksiflavonas	H-110	4'-hidroksi-7-metoksiflavonas	M-403
3'-hidroksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavonas	H-114	2'-metoksi- α -naftooflavonas	M-404
3-hidroksi-2'-metoksiflavonas	H-252	2'-metoksi- β -naftooflavonas	M-405
3-hidroksi-4'-metoksiflavonas	H-253	8-metilflavonas	M-406
2'-hidroksiflavonas	H-409	3-hidroksi-6-metilflavonas	M-407
3'-hidroksiflavonas	H-410	4'-metoksiflavonol, 4'-metoksi-3-hidroksiflavonas	M-408
4'-hidroksiflavonas	H-411	4'-metoksi-6-metilflavonas	M-409
3-hidroksi-3'-metoksiflavonas	H-415	4'-metoksi-8-metilflavonas	M-410
3-hidroksi-5-metoksiflavonas	H-416	3'-metoksiflavonas	M-601
3-hidroksi-6-metoksiflavonas	H-417	Kuercetinas, 3,5,7,3',4'-Pentahidroksiflavonas	P-102
3-hidroksi-7-metoksiflavonas	H-418	3,7,3',4',5'-Pentahidroksiflavonas	P-103
4'-hidroksi-3'-metoksiflavonas	H-419	5,6,7,3',4'-Pentametoksiflavonas	P-201
5-hidroksi-3'-metoksiflavonas	H-421	5,7,3',4',5'-Pentametoksiflavonas	P-202
6-hidroksi-2'-metoksiflavonas	H-423	3',5'-Dimetoksi-3,5,7,4'-tetrahidroksiflavonas	S-105
6-hidroksi-3'-metoksiflavonas	H-424	3,4'-Dimetoksi-5,7,3'-trihidroksiflavonas	T-110
7-hidroksi-2'-metoksiflavonas	H-425	7,8,3',4'-Tetrahidroksiflavonas	T-201
7-hidroksi-3'-metoksiflavonas	H-426	7,8,3',4'-Tetrametoksiflavonas	T-202
7-hidroksi-4'-metoksiflavonas	H-427	7,3',4'-Trimetoksiflavonas	T-204
3,7,4'-Trihidroksiflavonas	T-251	7,8,2'-Trihidroksiflavonas	T-410

3,6,4'-Trihidroksiflavonas	T-405	7,8,3'-Trihidroksiflavonas	T-411
5,3',4'-Trihidroksiflavonas	T-406	7,8,4'-Trihidroksiflavonas	T-412
5,7,2'-Trihidroksiflavonas	T-407	7,3',4'-Trihidroksiflavonas	T-414
6,3',4'-Trihidroksiflavonas	T-408	3,3',4'-Trihidroksiflavonas	T-601

6 lentelė. Mitybinių terpių kaina

1 litras ZYM-5052			1 litras Luria Broth + IPTG		
Sudėtis	Kiekis, g	Kaina, Eur	Sudėtis	Kiekis, g	Kaina, Eur
Triptonas	10	1,70	LB	25	2,64
Mielių ekstraktas	5	0,50	IPTG	0,238	2,08
Na ₂ HPO ₄	3,55	0,71	Viso:		4,72
KH ₂ PO ₄	3,40	0,18			
NH ₄ Cl	2,67	0,11			
Na ₂ SO ₄	0,70	0,01			
MgSO ₄	0,49	0,02			
Glicerolis	5	0,18			
Gliukozė	0,50	0,01			
Laktozė	2	0,05			
Viso:		3,47			