



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS  
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS  
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Arūnas Maisaitis

**KATIJONŲ ĮTAKA INSULINO AMILOIDINIŲ  
FIBRILIŲ FORMAVIMUISI**  
**INFLUENCE OF CATIONS TO INSULIN AMYLOID-LIKE  
FIBRILS FORMATION**

Baigiamasis bakalauro darbas

**Bioinžinerijos** studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2013

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS  
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS  
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

\_\_\_\_\_  
(Parašas)

Juozas Kulys

\_\_\_\_\_  
(Vardas, pavardė)

\_\_\_\_\_  
(Data)

Arūnas Maisaitis

**KATIJONŲ ĮTAKA INSULINO AMILOIDINIŲ  
FIBRILIŲ FORMAVIMUISI**  
**INFLUENCE OF CATIONS TO INSULIN AMYLOID-LIKE  
FIBRILS FORMATION**

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

**Vadovas** dr. Vytautas Smirnovas

\_\_\_\_\_  
(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

\_\_\_\_\_  
(Parašas)

\_\_\_\_\_  
(Data)

**Konsultantas** Ričardas Mališauskas

\_\_\_\_\_  
(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

\_\_\_\_\_  
(Parašas)

\_\_\_\_\_  
(Data)

Vilnius, 2013

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS  
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS  
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Bioinžinerijos studijų kryptis

Bioinžinerijos programa, valstybinis kodas 61205T201

TVIRTINU

Katedros vedėjas

\_\_\_\_\_  
(Parašas)

**Juozas Kulys**

\_\_\_\_\_  
(Vardas, pavardė)

\_\_\_\_\_  
(Data)

**BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO UŽDUOTIS**

.....Nr. ....

Vilnius

Studentui

**Arūnui Maisaičiui**

Baigiamojo darbo tema:

**KATIJONŲ ĮTAKA INSULINO AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ FORMAVIMUISI**

patvirtinta 2013 m. spalio 25 d. dekanų potvarkiu Nr. 383 fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2013m. birželio 11 d.

**BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:**

Ištirti katijonų įtaką insulino amiloidinių fibrilių susidarymui. Patikrinti ar poveikis priklauso tik nuo tirpalo joninės jėgos, ar taip pat ir nuo katijono prigimties.

Baigiamojo bakalauro darbo konsultantai:

Ričardas Mališauskas

Vadovas

.....  
(Parašas)

Dr. Vytautas Smirnovas

Užduotį gavau

.....  
(Parašas)

Arūnas Maisaitis

.....  
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų,  
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo  
organizavimo tvarkos aprašo 2011-2012 m. m.

**VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS**

Arūnas Maisaitis, 20092152

---

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

---

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIf-09

---

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO  
SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

2013 m. gegužės 29 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Katijonų įtaka insulino amiloidinių fibrilių formavimuisi“ patvirtintas 2012 m. spalio 25 d. dekanų potvarkiu Nr. 383fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

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

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

\_\_\_\_\_  
(Parašas)

Arūnas Maisaitis

---

(Vardas ir pavardė)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas  
Fundamentinių mokslų fakultetas  
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

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

Pirmosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas 3  
Pavadinimas **Katijonų įtaka insulino amiloidinių fibrilių formavimuisi**  
Autorius **Arūnas Maisaitis**

**Kalba**

lietuvių

užsienio (anglų)

### **Anotacija**

Peptidų ar baltymų nenatyvios struktūros siejamos su plačiu spektru ligų. Šios ligos yra vadinamos klaidingo baltymų susilankstymo ligomis. Vienas iš klaidingo susilankstymo atvejų yra amiloidinių fibrilių formavimasis. Yra žinių, kad kai kurie katijonai gali įtakoti amiloidinių fibrilių susidarymą.

Šiame darbe buvo tirama katijonų įtaka amiloidinių fibrilių susidarymo kinetikai, naudojant insuliną kaip modelinį baltymą. Buvo pasirinkta 15 katijonų, kurie skirtingomis koncentracijomis buvo maišomi su insulino tirpalu ir ThT fluorescencinės spektrofotometrijos metodu buvo stebima insulino agregacijos kinetika.

Gauos kreivės aprašytos sigmoidinės funkcijos lygtimi. Iš jų buvo gauti tokie parametrai: branduolių formavimosi laikas ir fibrilių augimo greitis. Pastebėta, kad didžiausią įtaką agregacijos kinetikai daro ne pačių katijonų prigimtis, o tirpalo joninė jėga.

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

Darbo apimtis – 38 p. teksto be priedų, 24 iliustr., 4 lent., 20 bibliografinių šaltinių.

**Prasminiai žodžiai:** agregacija, amiloidas, fluorescencija, insulinas, katijonai, spektrofotometrija, tioflavinas T.

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

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

Bachelor Degree Studies **Bioengineering** study programme Final Thesis 3  
Title                    **Influence of ions to insulin amyloid-like fibrils formation**  
Author                 **Arūnas Maisaitis**  
Academic supervisor **dr. Vytautas Smirnovas**

**Thesis language**

Lithuanian

Foreign (English)

**Annotation**

A broad range of diseases arises from the failure of peptides or proteins to adopt native structure. One of the protein misfolding examples is formation of amyloidogenic fibrils. It is known that some of cations can influence formation of amyloidogenic fibrils.

In this work was investigated the kinetics of amyloidogenic fibrils, using insulin as a model peptide. 15 cations were chosen, which in different concentrations were mixed with a solution of insulin, and aggregation kinetics of insulin was observed by fluorescent spectroscopy method.

Obtained curves were fitted with equation of sigmoidal function. It was derived parameters: time of nucleus formation and rate of fibrils growth. Was noticed, that biggest influence on kinetics of aggregation is not made by cations itself, but because of ionic strength of a solution.

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

Thesis consists of: 38 p. of text without appendixes, 24 pictures, 4 tables, and 20 bibliographical entries.

**Keywords:** aggregation, amyloid, cation, fluorescence, insulin, spectrophotometry, thioflavine T.

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS  
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS  
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Bioinžinerijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

**Pažyma**

**APIE BAIGIAMĄJĮ BAKALAURO DARBĄ**

.....Nr. ....

Vilnius

Studentas **Arūnas Maisaitis**

Studento studijų svertinis įvertinimų vidurkis.....balo.

Baigiamojo darbo tema: **Katijonų įtaka insulino amiloidinių fibrilių formavimuisi.**

Baigiamasis darbas peržiūrėtas ir studentui Arūnui Maisaičiui leidžiama ginti šį baigiamąjį darbą bakalauro laipsnio suteikimo komisijoje.

Katedros vedėjas

..... Prof. habil. dr. Juozas Kulys  
(Parašas)

**Vadovo atsiliepimas**

**APIE BAIGIAMĄJĮ BAKALAURO DARBĄ**

2013 gegužės 31 d.

Studentas Arūnas Maisaitis baigiamojo darbo metu tyrė katijonų įtaką insulino amiloidinių fibrilių susidarymui. Fluorescencinės spektrometrijos metodu buvo stebima insulino fibrilizacijos kinetika pridėjus ivairias penkiolikos skirtingų metalų chloridų koncentracijas. Užrašytas kreives „sufitinus“ naudojant sigmoidinę funkciją, gautos agregacijos kinetiką aprašantys parametrai – branduolių susidarymo laikas ir fibrilių augimo greičio konstanta. Gauti įdomūs fibrilizacijos priklausomybės nuo joninės jėgos rezultatai, nustatyti keli katijonai specifiškai įtakoiantys insulino fibrilizaciją. Kadangi darbas pradėtas vėlokai, jis nėra išbaigtas – reikėtų pakartoti kai kuriuos eksperimentus bei padaryti ilgesnės seriją koncentracijų bent vienos druskos atveju. Nepaisant to, manau, kad darbas pakankamai geras ir tinkamas gynimui.

Baigiamojo darbo įvertinimas: 8-9

Vadovas

..... dr. Vytautas Smirnovas  
(Parašas)

## TURINYS

ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	11
1.1. Amiloidai.....	11
1.1.1. Kas yra amiloidai.....	11
1.1.2. Insulinas kaip amiloidų susidarymo modelis .....	13
1.1.3. Metalų jonų įtaka amiloidinių fibrilių formavimuisi.....	16
1.2. Tioflavino T fluorescencija .....	18
2. MEDŽIAGOS, METODAI, APROKSIMAVIMAS.....	21
2.1. Aparatūra, medžiagos.....	21
2.1.1. Aparatūra .....	21
2.1.2. Medžiagos (gamintojas) .....	21
2.2. Metodai.....	21
2.2.1. HCl tirpalo paruošimas.....	21
2.2.2. Druskų tirpalų paruošimas.....	22
2.2.3. Insulino tirpalo paruošimas .....	22
2.2.4. Reakcijos tirpalų paruošimas.....	23
2.2.5. Insulino agregacijos kinetikos tyrimas .....	23
2.3. Duomenų apdorojimas .....	24
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	26
IŠVADOS .....	36
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	37



## SANTRUMŲ SĄRAŠAS

A $\beta$  – amiloidas  $\beta$

A $\beta$ 11-28 – peptidas, sudarytas iš amiloido  $\beta$  polipeptidinės grandinės nuo 11 iki 28 amino rūgšties

Asp – asparaginas

iAPP – liaukų amiloido polipeptidas

Glu – glutaminas

I – tarpinė forma

k<sub>aaP</sub> – tikroji greičio konstanta

M – monomeras

ThT – tioflavinas T

t<sub>lag</sub> – lag laikas

## IVADAS

Peptidų ar baltymų nenatyvios struktūros siejamos su plačiu spektru ligų (Chiti and Dobson 2006). Šios ligos yra vadinamos klaidingo baltymų susilankstymo (angl. *proteine misfolding*) ligomis. Pastarosios pasižymi patologine būseną, kai sumažėja baltymo susilankstymo efektyvumas, kuris įtakoja sumažėjusį baltymų, galinčių atlikti normalias funkcijas, kiekį. Šis natyvių baltymų kiekio sumažėjimas gali atsirasti dėl vieno iš keleto potransliacinių procesų, tokių kaip endoplazminio tinklo įtakotos degradacijos ar netinkamo baltymų transportavimo (Amaral 2003). Bet visgi didžiausią klaidingo susilankstymo ligų dalį sudaro ligos, kai baltymas ar peptidas, esantis tirpioje, funkcionalioje būsenoje, transformuojasi į labai organizuotus netirpius ir nešakotus fibrilinius agregatus - amiloidus (Chiti and Dobson 2006; Sawaya et al. 2007). Žinomi daugiau nei 25 skirtingi fiziologiniai baltymai formuojantys amiloidinius darinius *in vivo* (Yumlu et al. 2009). Būdami agreguotoje formoje baltymai ne tik gali neatlikti biologinių funkcijų, bet ir būti žalingi organizmui, sukeldami tokias ligas kaip Alzheimerio ar Parkinsono (Jimenez et al. 2002; Smirnovas and Winter 2008).

Pacientams sergantiems diabetu reikia leisti insulino injekcijas. Yra buvę atvejų, kai ilgalaikis insulino švirkštimas sukėlė poodines sankaupas, kurios didžiąja dalimi buvo sudarytos iš insulino amiloidinių agregatų (Yumlu et al. 2009; Shikama et al. 2010). Tai iliustruoja insulino, kaip amiloidus sudarančio baltymo, tyrimų svarbą žmonėms, sergantiems diabetu. Dabar insulino amiloidogenezė jau neblogai ištyrinėta, taip pat šis baltymas dažnai naudojamas kaip modelis amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmų tyrimams (Lee et al. 2007). Esant skirtingoms sąlygoms, tokioms kaip koncentracija, temperatūra ar slėgis, agregacija gali vykti skirtingais keliais ir susidaryti skirtingos struktūros fibrilės (Smirnovas and Winter 2008). Yra parodyta, kad 100 mM NaCl paspartina insulino amiloidinių fibrilių susidarymą ((A) Nielsen et al. 2001), tačiau nėra duomenų apie kitų jonų įtaką. Todėl galima išbandyti įvairius jonus ir išsiaiškinti ar jie pakeis insulino fibrilizacijos kinetiką.

Šio darbo tikslas yra eksperimentiškai ištirti katijonų poveikį insulino agregacijai. Tad keliami tokie uždaviniai:

1. naudojantis literatūra išsiaiškinti,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{CsCl}$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ , ir  $\text{ZnCl}_2$  tirpumą vandenyje;
2. naudojant Qiagen Rotor-gene 6000 padaryti seriją insulino agregacijos eksperimentų esant skirtingoms katijonų koncentracijoms;
3. apdoroti gautus duomenis ir apskaičiuoti fibrilių susidarymo kinetinius parametrus.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Amiloidai

### 1.1.1. Kas yra amiloidai

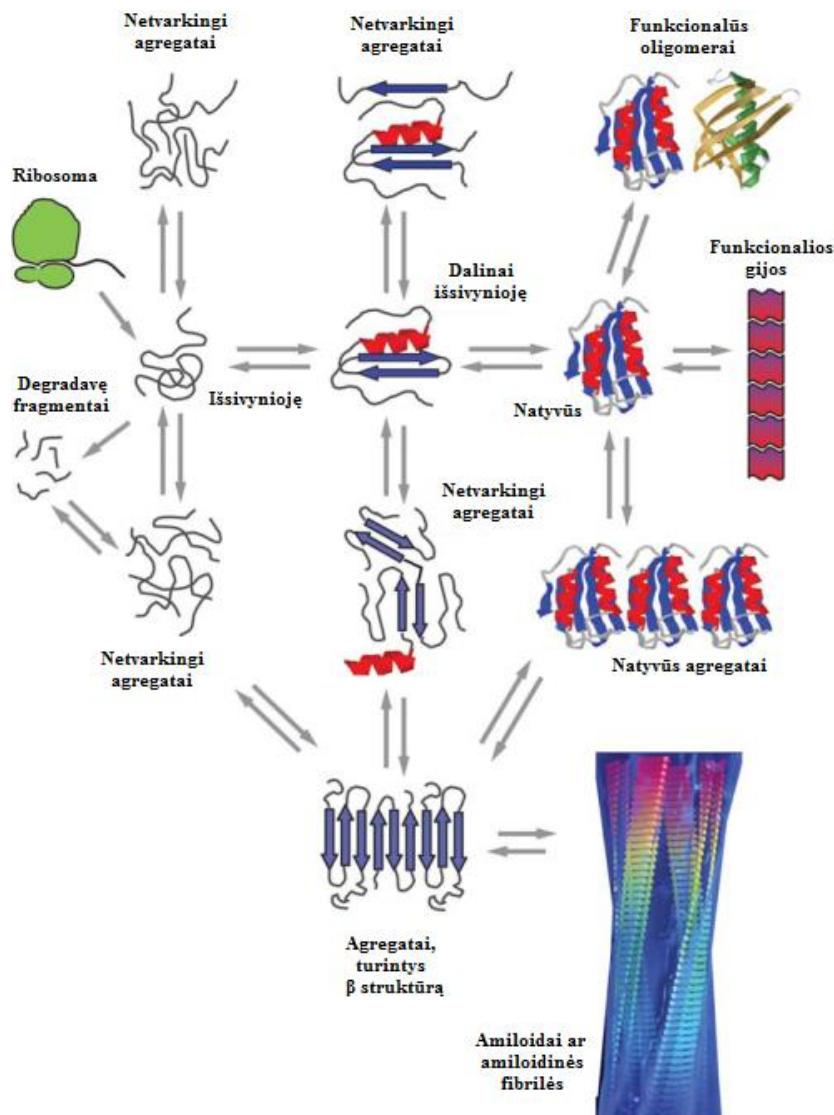
Terminas amiloidas buvo pristatytas 1854 m. vokiečių gydytojo mokslininko Rudolfo Virchovo. Naudodamasis geriausiai to meto moksliniais metodais ir medicinos žiniomis, Virchovas naudojo jodą žymėti iš smegenų išskirtiems dariniams. Pastebėjęs, kad tuos darinius paveikus jodu jie nusidažo blyškia mėlyna spalva, o paveikus sulfatu – violetine, Virchovas padarė išvadą, jog darinys yra sudarytas iš celiuliozės ir davė jam pavadinimą amiloidas. Šis žodis yra kilęs iš lotynų kalbos žodžio *amylum* ir graikų kalbos žodžio *amylon* – kurie reiškia krakmolą. Tuo metu nebuvo žinoma, kad krakmolai ir celiuliozė yra augalų karalystės angliavandeniai, o ne gyvūnų. Vėliau Virchovas nusprendė, kad amiloidinė masė turėtų būti krakmolai. Kai 1859 m. Fridreichas ir Kekulė pademonstravo, kad amiloidai sudaryti iš baltyminės masės, o karbohidratų ten visai nėra, buvo pradėta į amiloidus žiūrėti kaip į baltymus, o vėliau ir kaip į baltymų klasę, kuri yra linkusi virsti fibrilėmis (Sipe and Cohen 2000).

Per 19 a. ir 20 a. pradžią amiloidų kilmės tyrimai peraugo nuo makroskopinių Virchovo ir jo amžininkų stebėjimų iki klinikinių simptomų klasifikacijos. Terminas amiloidas buvo naudojamas apibūdinti specifines makroskopines anomalijas, buvusias organuose ar audiniuose, kuriuos išpjaudavo autopsijos metu. Pacientai turėjo įvairius klinikinius sindromus kurie buvo klasifikuojami kaip idiopatiniai ar susiję su mieloma, paveldimi ar endokrininiai. Nors termino amiloidas vartojimas nėra vienas iš gerai žinomų Virchovo atradimų, bet tai ir padėjo praplėsti biomedicinos tyrimų lauką (Sipe and Cohen 2000).

Manoma, kad beveik visi baltymai ir peptidai gali agreguotis į skirtingas struktūras, nuo pilnai netvarkingų amorfinių agregatų iki labai tvarkingų kristalinių formų (1 paveikslas) (Chiti and Dobson, 2006). Amiloidai turi tvarkingą struktūrą arba bent jau dalį jos, bet ji nekristalinė. Jie yra suformuoti iš maždaug 10 nm diametro fibrilių, kurios gali būti iki kelių šimtų  $\mu\text{m}$  ilgio (Alies et al. 2013). Dėl to jie dar yra vadinami amiloidinėmis fibrilėmis.

Amiloidų fibrilių formavimasis – tai procesas, kai natyvūs, tirpūs baltymai netaisyklingai susilanksto į netirpias fibriles, sudarydami  $\beta$  klostes (Lee et al. 2007). Manoma, kad amiloidinės fibriliės formuojasi branduolių susidarymo būdu (4 paveikslas) (Chiti and Dobson, 2006). Remiantis dažo tioflavino T fluorescencijos matavimų duomenimis, peptidų ar baltymų virtimo fibrilėmis laikas yra sudarytas iš lag fazės, kurios metu, manoma, susidaro branduoliai, ir

eksponentinio augimo fazės. Kai tik susiformuoja branduoliai, prasideda greitas fibrilių augimas, prisijungiant monomerus arba oligomerus (Chiti and Dobson, 2006). Šiame mechanizme branduoliai turi didžiausią energiją. Kadangi pastarųjų susidarymas iš monomerų yra energetiškai nepalankus, tai jis vyksta lėtai ir yra greitį ribojantis faktorius. (Alies et al. 2013).



**1 pav.** Kelių iš daugelio komformacinių stadijų, kurias gali įgauti polipeptidinės grandinės, schema (adaptuota iš Chiti and Dobson, 2006).

Kad susiformuotų amiloidai, monomeriniai peptidai turi pakeisti savo struktūrą į  $\beta$  klostes. Jei peptidas yra atsitiktinai susivyniojęs, netaisyklingai susilankstęs, jis gali transformuotis į amiloidą per branduolių susidarymo stadiją. O baltymai su aiškia trimate struktūra pirmiausia turi išsilankstyti, kad galėtų sudaryti  $\beta$  klosčių amiloidinę struktūrą ir toliau formuotis į amiloidus. Manoma, kad į šį mechanizmą dar įeina: fragmentavimasis, tai yra amiloidų skilimas,

kuris lemia didesnę susidariusių branduolių skaičių, ir papildomi konformaciniai pokyčiai, kai branduoliai formuojasi tiesiogiai iš pirminės baltymo formos (Alies et al. 2013). Šiuo atveju konformaciniai pokyčiai riboja reakcijos greitį (Alies et al. 2013).

Amiloidų formavimosi procesas priklauso nuo koncentracijos. Žemiau kritinės koncentracijos nesusiformuos branduoliai ir agregacija neįvyks. Virš kritinės koncentracijos agregacija vyks spontaniškai, bet kai kuriais atvejais labai lėtai, dėl branduolių formavimosi. Tai gali būti pagreitinta įdėjus jau susiformavusių amiloidų (Alies et al. 2013).

Kadangi smiloidus sudaro  $\beta$  klostės, tai reikalauja klasikinės  $\beta$  klostės sudarančios sąveikos, pavyzdžiui vandenilinių jungčių, susidarančių tarp polipeptidinės grandinės amidinių grupių, ir  $\beta$  klostės sujungiančios sąveikos, tarp šoninių grandinių. Pastaroji susidaro dėl druskos tiltelių, vandenilinių jungčių ir/arba hidrofobinės sąveikos. Vidutinis atstumas tarp  $\beta$  klostių yra apie 11 Å (Alies et al. 2013).

Nestruktūrizuotiems peptidams amiloidų formavimasis priklauso tik nuo peptido ilgio ir šoninių grandinių tipo, bei pozicijos. Rūgščių pozicija sekoje yra labai svarbi, nes ji turi atitikti ir sąveikauti su amino rūgštimis, esančiomis kitoje klostėje. Pavyzdžiui, poli argininas neįgaus stabilios amiloidinės struktūros (neutraliame pH), nes šoninės grandinės stums viena kitą dėl stiprios elektrosstatinės stūmos. Palyginimui poli glutaminas gali suformuoti amiloidus (amiloidai susidarę iš poli glutamino sukelia Huntingtono ligą.), nes dvi kaimyninės glutamino šoninės grandinės gali tarpusavyje suformuoti vandenilinius ryšius (Alies et al. 2013).

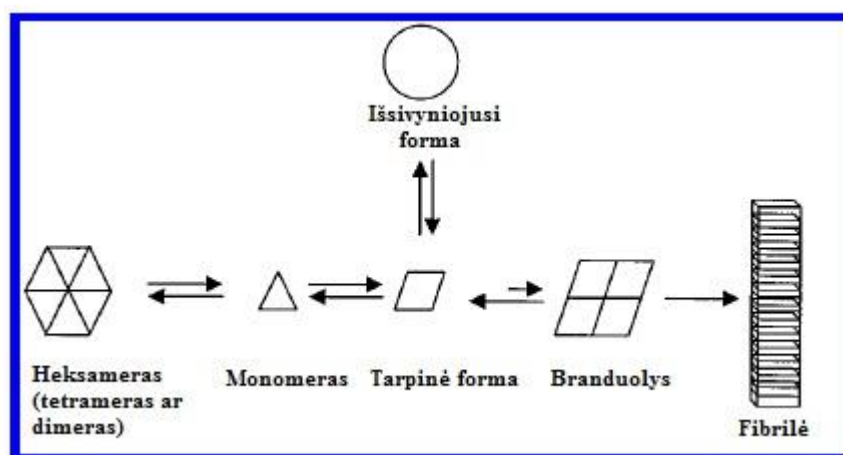
### **1.1.2. Insulinas kaip amiloidų susidarymo modelis**

Yra manoma, kad insulino fibrilių formavimosi procese dalyvauja keturios pagrindinės struktūros: heksameras (pagrindinė struktūra), monomeras, branduolys ir fibrilė (Lee et al. 2007). Tačiau esant pH 2, bei insulino koncentracijai didesnei nei 1,5 mg/mL, jis dažniausiai būna tetrameras, o pH 2 ir koncentracijai esant mažesnei negu 1,5 mg/mL, insulinas yra dimeras. ((B) Nielsen et al. 2001). Monomeras yra sudarytas iš dviejų polipeptidinių grandinių (A ir B, atitinkamai susidedančių iš 21 ir 30 amino rūgščių), sujungtų disulfidiniais ryšiais (2 paveikslas). Originalus heksameras yra susijungęs iš šešių monomerų, kurio struktūrą stabilizuoja du  $Zn^{2+}$  (3 paveikslas) (Lee et al. 2007).

Manoma, kad griežtesnėmis sąlygomis, tokiomis kaip žemas pH ir aukšta temperatūra, insulino fibrilių susidarymo pradinėse stadijose vyksta natyvių insulino oligomerų (heksamerų, tetramerų ir dimerų) disociacija į natyvius monomeras ((A) Nielsen et al. 2001). Veikiant temperatūrai monomerai dalinai išsivynioja. Dalinai išsivynioję monomerai turi didelį polinkį oligomerizuotis ir, esant kritinei koncentracijai, neišvengiamai virsta branduoliais. Manoma, kad



Kai tik susiformuoja branduoliai, prie jų pradeda jungtis monomerai arba oligomerai ir susiformuoja fibrilės. Pastarųjų galai tarnauja kaip reakcijos centrai ir vykdo save katalizuojančias reakcijas, nuolatos ilginančias fibriles ((A) Nielsen et al. 2001). Tai yra pagrindžiama faktu, kad papildomai pridėjus fibrilių, beveik pasinaikina lag fazė. Papildomas fibrilių pridėjimas į reakcijos tirpalą yra charakteristika, įrodanti, kad fibrilių ilgėjimo mechanizmas priklauso nuo branduolių. Nustatyta atvirkštinė linijinė koreliacija tarp insulino koncentracijos logaritmo ir lag fazės laiko, turėtų atspindėti esminius kinetinius mechanizmus, susijusius su branduolių formavimusi ((A) Nielsen et al. 2001).



4 pav. Fibrilių augimo, paremto branduolių susidarymu, schema (adaptuota iš (A) Nielsen et al. 2001).

Manoma, kad insulino branduolių susidarymo mechanizme greitį lemianti stadija yra tarpinių formų susidarymas. Pastarieji yra kompetentingi sukelti agregacijos procesą. Jei tai yra tiesa, tuomet joninės jėgos padidėjimas ir didesnis anijonų kiekis gali įtakoti konformacinę tarpinės formos stabilumą arba susidarymo greitį. Ši hipotezė yra susijusi modeliu, kai esminė tarpinės formos konformacija, iš karto po susiformavimo, labai greitai oligomerizuojasi ir susiformuoja fibrilė ((A) Nielsen et al. 2001).

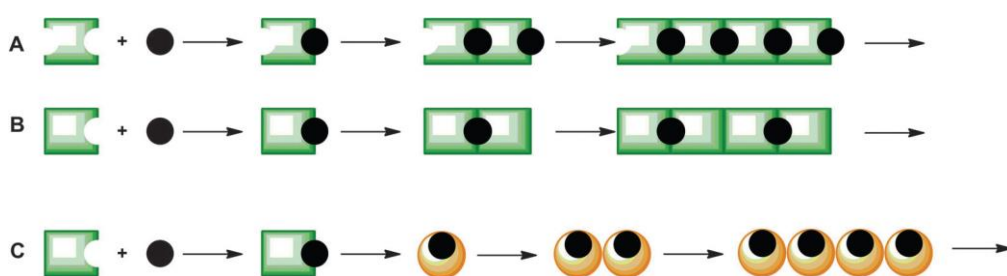
Fibrilių formavimosi proceso lag fazės laiko sumažėjimas, esant didesnei joninei jėgai, gali būti paaiškintas tuo, kad dėl joninės jėgos sumažėja stūmos jėga tarp reaguojančių insulino molekulių ir tai skatina fibrilių formavimąsi. Esant 1.6 pH reikšmei, insulino monomeras turi bendrą teigiamą krūvį. Pridėjus chlorido, sulfato ar fosfato anijonų, teigiamas krūvis bus panaikintas ir atsiras hidrofobinė sąveika reikalinga branduolių formavimuisi. Vadinasi, insulino branduolių susidarymo procesas priklauso nuo elektrostatinės ir hidrofobinės sąveikos ((A) Nielsen et al. 2001).

Nėra nustatyta koreliacijos tarp fibrilių ilgėjimo greičio ir joninės jėgos arba rūgšties koncentracijos, tačiau žymiai lėtesni fibrilių ilgėjimo greičiai, esant didelei joninei jėgai arba didelei rūgšties koncentracijai, rodo, kad didėjanti anijonų koncentracija lėtina fibrilių elongaciją ((A) Nielsen et al. 2001).

Insulino kinetinis modelis yra tinkamas ir kitų baltymų fibrilių susidarymui aprašyti, kadangi skirtingų amiloidinių fibrilių susidarymo eksperimentų sąlygos ir gauti rezultatai yra panašūs (Lee et al. 2007) Tai iliustruoja charakteringa insulino ThT fluorescencijos sigmoidinė kreivė, kuri buvo pastebėta ir  $\beta$  amiloido, ir daugybės kitų amiloidų agregacijoje ((A) Nielsen et al. 2001).

### 1.1.3. Metalų jonų įtaka amiloidinių fibrilių formavimuisi

Metalų jonai gali įtakoti agregaciją sujungdami du peptidus (5 paveikslas, B schema), pakeisdami konformaciją į labiau linkusią agreguotis (5 paveikslas, C schema) arba sumažindami bendrą krūvį. Nepaisant to metalų jonai gali trukdyti agregacijos procesui indukuodami ar stabilizuodami mažiau agreguotis linkusias konformacijas, padidindami bendrą krūvį (Alies et al. 2013).



**5 pav.** Principinės fibrilių formavimosi schemas. (A) Metalo jonas susijungia su peptidu ir taip inicijuojama agregacija sujungiant peptidų ir metalo jonų kompleksams. (B) Metalo jonas sujungia peptidus į dimerus, kas inicijuoja agregaciją. (C) Metalo jonas prisijungia prie peptido ir pakeičia jo konformaciją į agregacijai tinkamą (Alies et al. 2013).

Pereinamųjų metalų jonai prie peptidų dažniausiai jungiasi per šonines grupes, bet kartais gali jungtis ir prie peptidinės grandinės. Pagrindinės  $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ir  $\text{Zn}^{2+}$  jungimosi vietos yra šoninės histidino, cisteino grupės ir N galiniai aminorai. Asparto ir glutamo  $\text{COO}^-$  grupės taip pat jungiasi su metalais, kaip ir metionino šoninės grupės.  $\beta$  klosčių formavimuisi daro įtaką jungimasis prie šoninės grandinės arba jungimasis prie peptidinės grandinės (Alies et al. 2013).

Dažniausiai metalų jungimosi procese dalyvauja histidiniai, jie gali jungtis su daugeliu pereinamųjų metalų. Taip pat histidinas yra pats svarbiausias ligandas fiziologiškai svarbiuose



peptiduose, tokiuose kaip amiloidas  $\beta$ , prioniniai baltymai,  $\alpha$  sinukleinas, *etc.* Cisteinas dažniausiai stipriai sąveikauja su švelnesnių metalų jonais, bet oksidavus susidaro disulfidiniai ryšiai ir metalų jonai yra atjungiami. Kitaip tariant, eksperimentai turėtų būti atlikti anaerobinėmis sąlygomis. Kiti svarbūs ligandai, kurių afiniškumas dažnai būna žemesnis, yra karbohidratai (Asp, Glu, C galas) ir metioninas (švelnesniems metalų jonams) (Alies et al. 2013).

Netvarkingai susivyniojusių peptidų ar baltymų, agregacijos procese, dalyvaujant metalo jonams, pagrindinis parametras yra ligandų vieta sekoje. Baltymams ar peptidams, kurie yra tvarkingai susivynioję į tretinę struktūrą, prieš virstant amiloidais, reikia išsilankstyti. Metalų jungimasis gali stabilizuoti ar destabilizuoti pradinę neamiloidinę struktūrą, tai yra gali daryti įtaką amiloidų formavimuisi. Polipeptido/baltymo antrinė struktūra gali būti atsitiktinai susivyniojusių spiralių,  $\alpha$  spiralių ir  $\beta$  klosčių mišinys (Alies et al. 2013). Metalų jonų prisijungimas destabilizuoja  $\alpha$  spiralinę struktūrą, skatina  $\beta$  klosčių susidarymą ir amiloidų formavimąsi (Pagel et al. 2005).

Metalų jonai turi specifinę koordinacinę chemiją, kuri yra jautri ligandų skaičiui, prigimčiai ir geometrijai. Tokioje jautrioje sistemoje, kaip amiloidų formavimosi procese, kiekvienas metalo jonas gali turėti skirtingą įtaką kinetikai, susidariusių amiloidų kiekiui ir agregatų struktūroms. Vadinasi, agregacijos procesas priklauso nuo metalo jonų prigimties, t.y. nuo pastarųjų koordinacijos specifiškumo (Alies et al. 2013).

Labiausiai ištirti jonai,  $\text{Cu}^{2+}$  ir  $\text{Zn}^{2+}$ , yra pakankamai skirtingi. Skiriasi jų elektroninė struktūra,  $\text{Cu}^{2+}$  turi  $d^9$ , o  $\text{Zn}^{2+}$  turi  $d^{10}$ . Šis vieno elektrono skirtumas yra atsakingas už didelius pokyčius koordinacijoje.  $\text{Cu}^{2+}$  yra kvadrato formos, elektronai išsidėstę plokštumoje (su vienu ar dviem išsikišusiais ligandais), o  $\text{Zn}^{2+}$  yra labiau tetraedro, oktaedro formos. Kitas ryškus skirtumas yra tai, kad  $\text{Cu}^{2+}$  yra stipresnė Luiso rūgštis negu  $\text{Zn}^{2+}$ .  $\text{Cu}^{2+}$  yra pakankamai stiprus, kad galėtų prisijungti prie baltymo peptidinės grandinės, kas gali sukelti peptidinių ryšių amidų deprotonizavimą. Tyrimuose buvo pastebėti šių metalų jonų poveikio skirtumai.  $\text{Zn}^{2+}$  daro didesnę įtaką amiloidams, negu  $\text{Cu}^{2+}$  (Alies et al. 2013).  $\text{Zn}^{2+}$  inhibuoja peptido iAPP (angl. *islet amyloid polypeptide chain*) virtimą į fibriles. Yra nežinomos struktūrinių pokyčių priežastys, bet manoma, kad  $\alpha$  spiralinė struktūra yra stabilizuojama  $\text{Zn}^{2+}$ , kai jis jungiasi prie dviejų histidinių, esančių arti vienas kito  $\alpha$  spiralinėje struktūroje (Alies et al. 2013).  $\text{Cu}^{2+}$  jungiasi tikrai prie vieno histidino, vadinasi, nestabilizuoja  $\alpha$  spiralinės struktūros, bet manoma, kad gali stabilizuoti  $\beta$  klostes (Alies et al. 2013).

Bendras krūvis yra svarbus agregacijos parametras, nes agregacija yra greitesnė, kai bendras krūvis pasiekia 0. Metalų jungimasis gali pakeisti bendrą krūvį. Skaičiuojant bendrą krūvį reikia atkreipti dėmesį į du dalykus: metalų jonai turi krūvį, kurį reikia pridėti jonui

prisijungus prie peptido, ir metalų jonai jungdamiesi gali padidinti vandenilio jonų koncentraciją, kas taip pat įtakoja krūvį. Taigi turi būti atsižvelgta ir į bendrojo krūvio pasikeitimą, įtakotą metalų, nes esant skirtingiems metalų jonams, yra pašalinami protonai. Bet kol kas jokiais tyrimais nebuvo parodytas krūvio pasikeitimo poveikis peptido agregacijai. Be to, peptidų/baltymų, turinčių trimatę struktūrą, atveju protonizavimo pasikeitimai gali sukelti struktūrinius pokyčius, vadinasi gali sukelti agregaciją, pavyzdžiui, žemesnis pH destabilizuoja susilanksčiusius baltymus, kurie yra linę agreguotis į amiloidus (Alies et al. 2013).

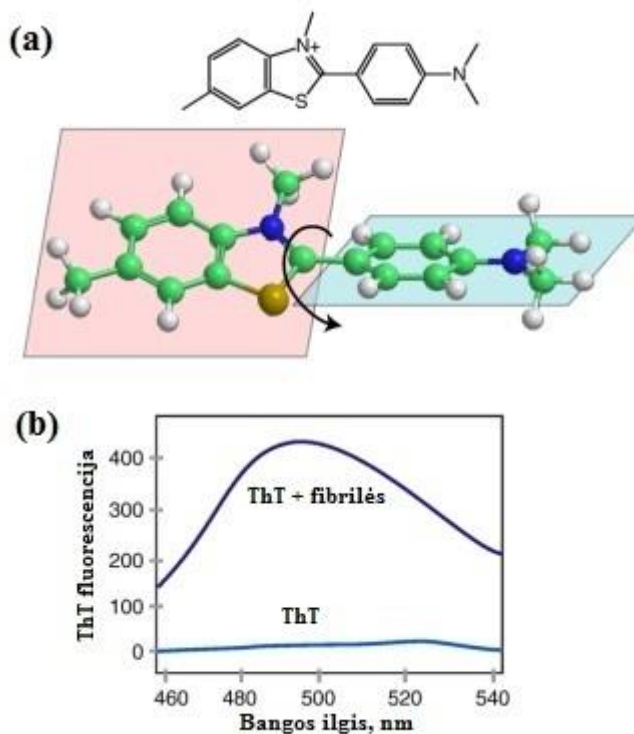
Metalų afiniškumas peptidams paklūsta Irvingo Viliamso eilei, vadinasi  $\text{Cu}^{2+}$  yra giminingesnis peptidams negu  $\text{Zn}^{2+}$ . Tyrimų metu buvo parodyta, kad peptido afiniškumas  $\text{Zn}^{2+}$  yra daug didesnis, kai peptidas yra  $\beta$  klosčių konformacijos. Taip yra todėl, kad  $\beta$  klosčių formavimasis peptide sukuria naujas  $\text{Zn}^{2+}$  jungimosi sritis (dėl netoli esančio histidino). Vadinasi, metalų jonų giminingumas peptidams ar baltymams gali būti modifikuotas agregacijos proceso (Alies et al. 2013).

Yra žinoma, kad  $\text{Cu}^{2+}$  ir  $\text{Zn}^{2+}$  jungimasis su nestruktūrizuotais baltymais yra labai greitas ir dažnai difuzijos kontroliuojamas. Kitaip tariant, visiems peptidams susijungusiems su  $\text{Zn}^{2+}$  ir daugumai peptidų susijungusių su  $\text{Cu}^{2+}$  molekuliniai ryšiai su metalais yra gana nepastovūs ir metalų keitimasis yra gana greitas, bent jau greitesnis negu agregacija, vadinasi, gali ją įtakoti. Alies ir bendraautorių paskutiniai tyrimai pademonstravo, kad mažas  $\text{Zn}^{2+}$  kiekis dramatiškai padidina peptido A $\beta$ 11-28 agregaciją (Alies et al. 2013). Amiloidas  $\beta$  yra proteolizės produktas, gautas iš membranos baltymo amiloidinio polipeptido (APP) (angl. *amyloid polypeptide*) (Pallitto and Murphy 2001). Buvo iškelta hipotezė, kad  $\text{Zn}^{2+}$  gali greitai inicijuoti agregaciją, nes jis suformuoja dimerus, kurie skatina visų peptido formų agregaciją, arba dėl greito  $\text{Zn}^{2+}$  keitimosi tarp susiformavusių agregatų ir likusių monomerinių peptidų (5 paveikslas). Kitaip tariant, trumpas  $\text{Zn}^{2+}$  prisijungimas yra pakankama sąlyga, kad būtų paveikta A $\beta$ 11-28 agregacija. Faktas, kad trumpalaikio,  $\text{Zn}^{2+}$  jungimosi pakanka, kad sukeltų A $\beta$ 11-28 agregaciją, yra svarbus  $\text{Zn}^{2+}$ -A $\beta$  sąveikoje Alzheimerio ligoje, nes neuronuose  $\text{Zn}^{2+}$  yra trumpam paleidžiamas į sinapsės plyšį, kur gali būti amiloidas  $\beta$ . To gali pakakti, kad būtų pradėta tarpląstelinio amiloido  $\beta$  agregacija ar antrinės struktūros modifikacija (Alies et al. 2013).

## 1.2. Tioflavino T fluorescencija

Tioflavino T fluorescencijos padidėjimas, jam susijungus su fibrilėmis yra labiausiai charekterizuota ir kruopščiai ištirta ThT savybė. Šis metodas yra plačiai naudojamas amiloidinių fibrilių tyrimams *in vitro* realiame laike (Hudson et al. 2009). Yra manoma, kad didelis pokytis ThT fluorescencijoje atsiranda dėl ThT konformerų imobilizacijos (Biancalana and Koide 2010).

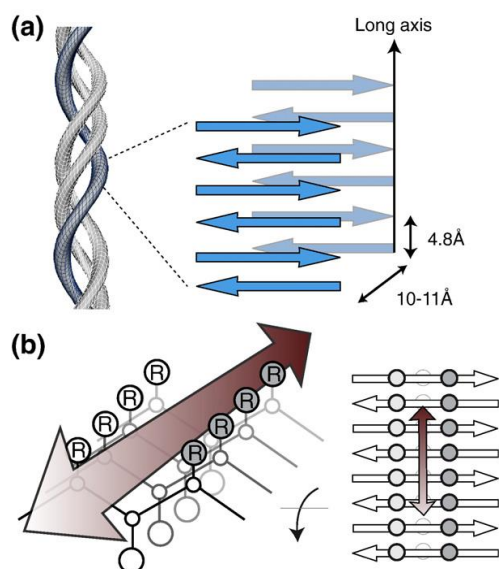
Remiantis dideliu eksperimentinių duomenų kiekiu ir kvantinės mechanikos spėjimais galima daryti prielaidą, kad ThT yra „molekulinis rotorius“ (Biancalana and Koide 2010). Tirpale žemas energijos barjeras leidžia ThT benzilamino ir benzatiolio žiedams laisvai sukintis apie bendrą anglis–anglis jungtį (6 paveikslas, a molekulė). Šis sukimasis greitai numalšina fotonų sužadintus atomus, kas lemia žemą laisvo ThT fluorescencinę emisiją (6 paveikslas, b grafikas). Imobilizavus rotacinę sritį nuo sukimosi, ThT sužadintos sritys gali fluorescuoti (6 paveikslas, b grafikas). Amiloidinės fibrilės susijungia su ThT ir neleidžia jam sukintis, kas įtakoja ThT fluorescencijos padidėjimą (Biancalana and Koide 2010).



**6 pav.** Įprasti ThT naudojimo metodai. (a) ThT struktūra (viršuje). Du planariniai ThT segmentai, kurių abipusis sukimasis charakterizuoja molekulės chiralškumą (apačioje). (b) Charakteringas ThT fluorescencijos padidėjimas, jam susijungus su amiloidinėmis fibrilėmis (adaptuota iš Biancalana and Koide 2010).

Didelis amiloidinių fibrilių struktūrų skaičius leidžia molekuliniam lygmenyje ieškoti ThT jungimosi būdų. ThT jungimasis prie skirtingų fibrilių, verčia daryti prielaidą, kad ThT atpažįsta bendrą daugeliui fibrilių struktūrą, nepaisant to, kad amino rūgštys skirtingose fibrilėse yra skirtingai išsidėsčiusios (Biancalana and Koide 2010). Kadangi amiloidai turi  $\beta$  klosčių architektūrą, tai yra manoma, kad  $\beta$  klosčių šoniniai paviršiai sudaro salygas jungtis ThT. Fibrilių  $\beta$  klosčių struktūra (7 paveikslas, a schema) duoda specifinę šoninių grupių išsidėstymą, vadinamą  $\beta$  klosčių kopėčiomis (angl. *cross-strand ladders*) (7 paveikslas, b schema).  $\beta$  klosčių

kopėčios susideda iš  $\beta$  klosčių šoninių grandinių, kurių išsidėstymas yra statmenas  $\beta$  klostėms. Trumpų fibriles formuojančių peptidų struktūros demonstruoja, kad lygiagrečios šoninių grandinių eilės susidaro nepaisant peptido sekos. Šios šoninės grupės suformuoja ilgus „kanalo“ formos motyvus, nukreiptus į fibrilės išorę, kur gali jungtis linijinis dažas (7 paveikslas, b schema). Tokiu būdu ThT gali jungtis prie daugelio agregavusių peptidų „kanalų“ (Biancalana and Koide 2010).



**7 pav.** Bendra fibrilių struktūra ir struktūrinė fibrilių-ThT jungimosi schema. (a) amiloidinių fibrilių  $\beta$  klosčių struktūra, sudaryta iš viena ant kitos esančių  $\beta$  klosčių. (b) ThT jungimosi su fibrilėmis „kanalo“ modelis. Manoma, kad ThT jungiasi prie paviršiaus šoninių grandinių, kurios yra statmenos  $\beta$  klostėms (Biancalana and Koide 2010).

## 2. MEDŽIAGOS, METODAI, APROKSIMAVIMAS

### 2.1. Aparatūra, medžiagos

#### 2.1.1. Aparatūra

Realaus laiko PGR aparatas „Qiagen Rotor-gene 6000“ (8 paveikslas), pH–metras, svarstyklės, mėgintuvėlių maišytuvai, automatinės pipetės, sterilūs antgaliai, stiklinėlės, šaukšteliai.

#### 2.1.2. Medžiagos (gamintojas)

Tioflavinas T (SIGMA), insulinas (SIGMA), HCl (ROTH), dejonizuotas vanduo.

**Lentelė 1.** Druskų gamintojai ir jų tirpumai vandenyje kambario temperatūroje, mol/L (Vikipedija, žiūrėta 2013-05-29).

Druska	Gamintojas	Tirpumas vandenyje kambario temperatūroje, mol/L
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	SIGMA	3,43
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	COLUMBUS CHEMICAL INDUSTRIES	1,72
$\text{CaCl}_2$	SERVA	6,71
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	J. T. BAKER CHEMICAL	4,07
$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	REACHIM	3,69
$\text{CsCl}$	PHARMACIA	3,43
$\text{CuCl}_2$	FLUKA	5,41
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	REACHIM	5,65
$\text{KCl}$	REACHIM	4,59
$\text{LiCl}$	ROTH	19,65
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	MALLINCKRODT	5,75
$(\text{NH}_4)\text{Cl}$	COLUMBUS CHEMICAL INDUSTRIES	6,14
$\text{NaCl}$	SIGMA	6,95
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	SIGMA	5,14
$\text{ZnCl}_2$	REACHIM	30,15

### 2.2. Metodai

#### 2.2.1. HCl tirpalo paruošimas

HCl tirpalas buvo naudojamas 0,04 M koncentracijos, kaip parašyta Nielsen ir bendraautorių literatūroje ((A) Nielsen et al. 2001). 168  $\mu\text{L}$  koncentruotos (36,5 %,  $\rho = 1,19$

g/cm<sup>3</sup>) HCl skiedžiama 49,832 mL dejonizuoto vandens, patikrinamas rūgštingumas pH–metru (pH 1,464,).

### 2.2.2. Druskų tirpalų paruošimas

Visi druskų tirpalai ruošiami atsverus druską ir ją ištirpinus paruoštame HCl tirpale (1 lentelė). Gautų druskų tirpalų koncentracijos yra 400 mM. Po 100 µL kiekvieno tirpalo yra skiedžiama su 100 µL HCl, kad gauti 200 mM koncentraciją ir po 50 µL kiekvieno pradinio tirpalo yra skiedžiama su 150 µL HCl, kad gauti 100 mM koncentraciją.

**Lentelė 2.** Druskų ir HCl, skirtų paruošti druskų tirpalus, kiekiai.

Druska	Druskos kiekis tirpale, mg	HCl tirpalo tūris, mL
AlCl <sub>3</sub>	106,8	2
BaCl <sub>2</sub>	166,6	2
CaCl <sub>2</sub>	90,5	2,03
CoCl <sub>2</sub>	229,3	2,419
CrCl <sub>3</sub>	233,7	2,192
CsCl	167,7	2,489
CuCl <sub>2</sub>	102,7	1,909
FeCl <sub>3</sub>	258,7	2,391
KCl	70,7	2,369
LiCl	53,2	3,129
MgCl <sub>2</sub>	161,6	1,997
Na Cl	58,2	2,489
(NH <sub>4</sub> )Cl	50,8	2
NiCl <sub>2</sub>	204,3	2,15
ZnCl <sub>2</sub>	397,4	3,666

### 2.2.3. Insulino tirpalo paruošimas

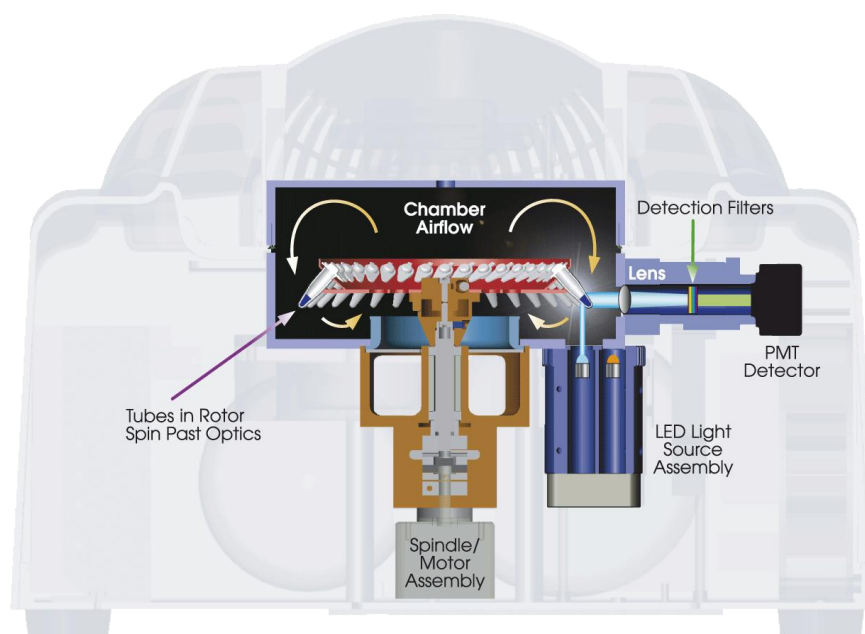
Į mėgintuvėlį atsveriamas 8,4 mg insulino, įpilama 420 µL 0,04 M HCl ir maišant mėgintuvėlių maišytuvu ištirpinama. Įpilama 16,8 µL 5 mM ThT ir išmaišoma. Gaunama 20 mg/mL insulino, 100 mM ThT koncentracijos.

#### 2.2.4. Reakcijos tirpalų paruošimas

Insulino tirpalas išpilstomas į 4 mėgintuvėlius po 100  $\mu\text{L}$ . Į vieną įpilama 100  $\mu\text{L}$  HCl, tai yra kontrolinis bandymas be druskos, į kitus tris po 100  $\mu\text{L}$  100 mM, 200 mM ir 400 mM tos pačios druskos tirpalų, bei išmaišoma. Gama 10 mg/mL insulino, 50 mM ThT ir 0, 50, 100 ir 200 mM druskų koncentracijos.

#### 2.2.5. Insulino agregacijos kinetikos tyrimas

Gauti reakcijos tirpalai išpilstomi į 36 mėgintuvėlius (200  $\mu\text{L}$  talpos), po 20  $\mu\text{L}$  į kiekvieną, po 9 mėgintuvėlius kiekvienam reakcijos tirpalui. Jie yra sudedami į „Qiagen Rotor-gene 6000“ ir paleidžiami eksperimentai kiekvienai druskai. Reakcijos vyksta 60  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, 15 valandų.



**8 pav.** „Qiagen Rotor-gene 6000“ skersinis pjūvis. Visi 36 mėgintuvėliai prasisuka pro detektavimo įrenginį per 150 ms. Prietaisas turi vieną LED šviesos šaltinį, 6 skirtingus šviesos detektavimo filtrus ir labai jautrų detektorių (Qiagen žiūrėta 2013-05-29).

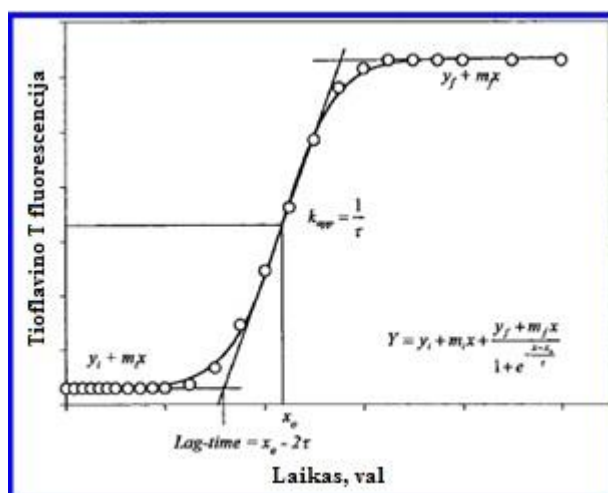
„Qiagen Rotor-gene 6000“ yra realaus laiko PGR prietaisas. Aparatas yra naudojamas ne pagal paskirtį, bet puikiai tinka agregacijos tyrimams. Prietaisas talpina 36 mėgintuvėlius. Jie statomi į rotorių, kuris eksperimento metu sukasi 400 apsisukimų per minutę greičiu, taip reakcijos mišinys, dėl išcentrinės jėgos, yra palaikomas mėgintuvėlio apatinėje dalyje, ten kur matuojama fluorescencija. Mišinys iš LED šviesos šaltinio yra apšviečiamas  $470 \pm 10$  nm bangos ilgio šviesa ir detektorius matuoja  $510 \pm 5$  nm bangos ilgio šviesą. Proceso metu

palaikoma reikiama temperatūra. Mišinyje esantis ThT, kaip minėta aukščiau, pradeda fluorescuoti tik susijungęs su fibrilėmis. Fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas susidariusių fibrilių kiekiui.

### 2.3. Duomenų apdorojimas

Bandymų duomenims apdoroti buvo naudojamos standartinės Microsoft Excel programos ir „OriginLab“ Origin programa. Duomenys buvo aproksimuoti matematinei išraiškai gauti su „OriginLab“ Origin programa. Grafinis rezultatų vaizdavimas, taip pat matematiniai veiksmai buvo, atliekama naudojantis šiomis programomis.

Insulino fibrilių formavimosi kinetika gali būti aprašyta kaip sigmoidinė kreivė, sudaryta iš pradinės lag stadijos, kai nėra fiksuojama jokio ThT fluorescencijos intensyvumo, sekančios augimo stadijos, kada didėja ThT fluorescencija, ir paskutinės nusistovėjusios pusiausvyros stadijos, kai ThT fluorescencija pasiekia aukščiausią reikšmę ir fibrilių susidarymo procesas baigiasi (9 paveikslas) ((A) Nielsen et al. 2001).



**9 pav.** Insulino fibrilių formavimosi sigmoidinės kreivės schematinė iliustracija. Duomenys buvo gauti naudojant  $M \Leftrightarrow I \Leftrightarrow \text{branduoliai} \rightarrow \text{fibrilės}$  schemą ir matematiškai prigretinti prie sigmoidės naudojantis 1 lygtimi (Adaptuota iš (A) Nielsen et al. 2001).

Fibrilių susidarymo mechanizmas vyksta pagal šią kinetinę schemą:



kur M – mononeras, o I – tarpinė forma. Simuliuota kinetinė schema duoda sigmoidines kreives, kaip parodyta 5 paveiksle. ThT fluorescencijos kitimas yra išreiškiamas kaip funkcija nuo laiko ir matematiškai prilyginamas sigmoidinei kreivei, kurios lygtis yra:



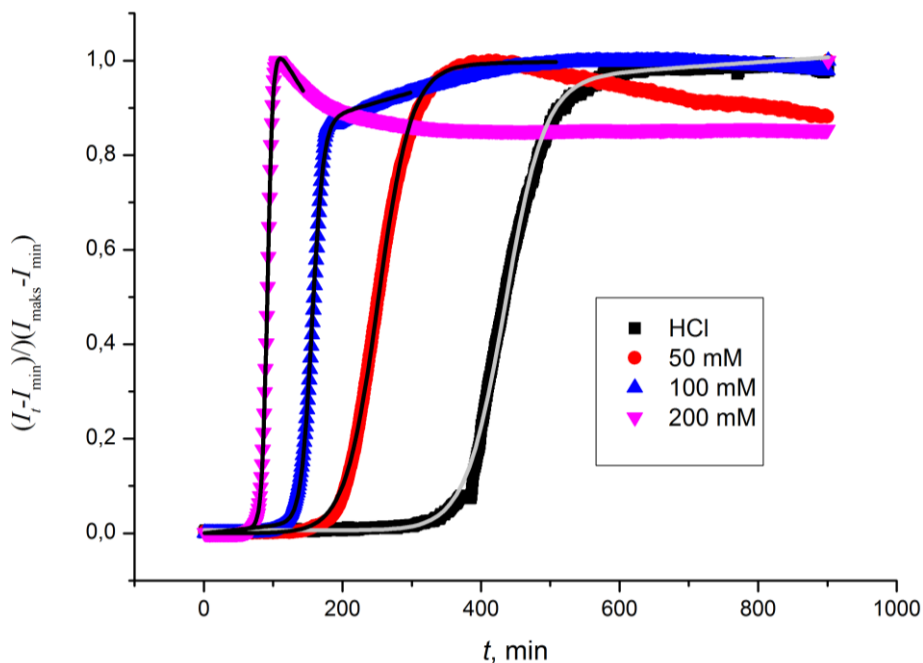
$$Y = y_i + m_i x + \frac{y_f + m_f x}{1 + e^{-(x-x_0)/\tau}} \quad (1)$$

kur  $Y$  yra fluorescencijos intensyvumas,  $x$  – laikas ir  $x_0$  – laikas, kai yra pasiekama 50 % maksimalios fluorescencijos ((A) Nielsen et al. 2001).

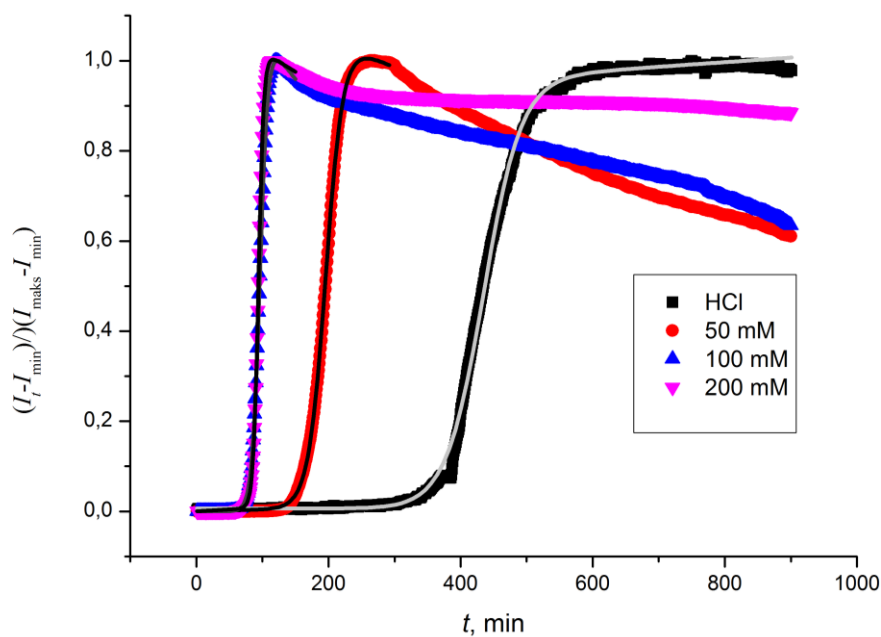
Insulino fibrilių formavimosi kinetika buvo charakterizuota dviem nepriklausomais vienas nuo kito faktoriais: lag laiku, susijusiu su fibrilių branduolių formavimosi greičiu, ir fibrilių ilgėjimo greičiu. Taigi, iš (1) lygties gaunama, kad lag fazės laikas,  $t_{lag}$  yra  $x_0 - 2\tau$  ((A) Nielsen et al. 2001). Fibrilių augimo greitis išreiškiamas tikrąja greičio konstanta  $k_{app}$  (angl. *aparent rate constant* sutrumpinta į *app*), kuri yra  $1/\tau$ .  $k_{app}$  didėja tiesiškai, didėjant insulino koncentracijai. Kadangi, dėl didėjančios insulino koncentracijos didėja branduolių skaičius, tai įtakoja didėjančią fibrilių skaičių, kas leidžia spręsti apie fibrilių augimo kinetiką ((A) Nielsen et al. 2001).

### 3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Padaryta virš 500 bandymų su 0 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM skirtingų druskų koncentracijomis (kiekvienam atvejui padarius po 9 pakartojimus). Gautos insulino ThT fluorescencijos kreivės parodė, kad insulino agregacija yra atsitiktinis procesas (insulino agregacija tirpale be druskos vyksta labai nevienodai, branduolių susidarymo laikai ir fibrilių susidarymo greičiai kartojant eksperimentą tomis pačiomis sąlygomis labai skiriasi). Dėl šios



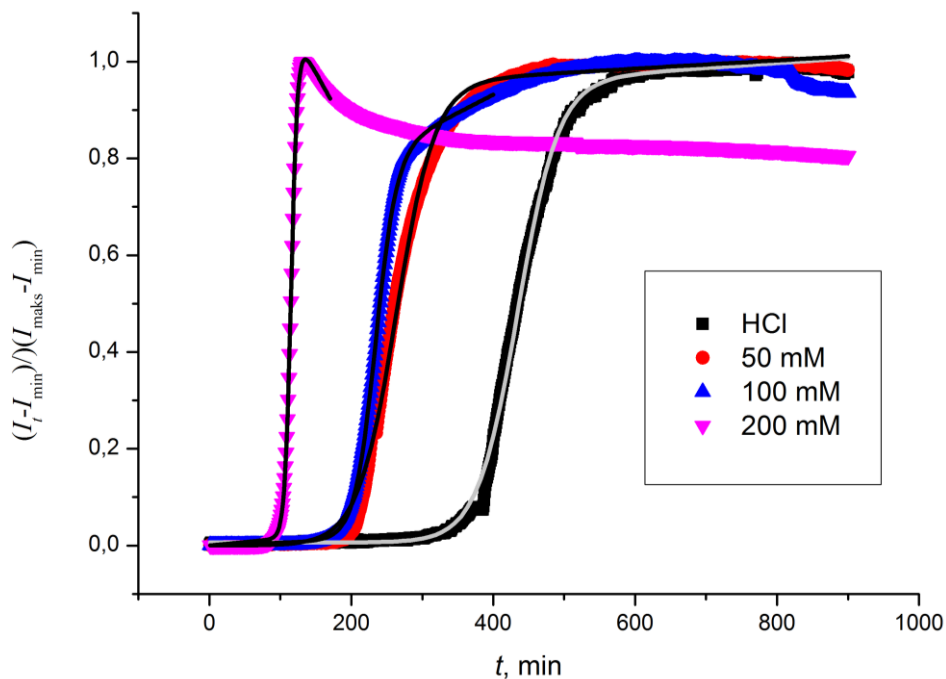
10 pav. CsCl įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.



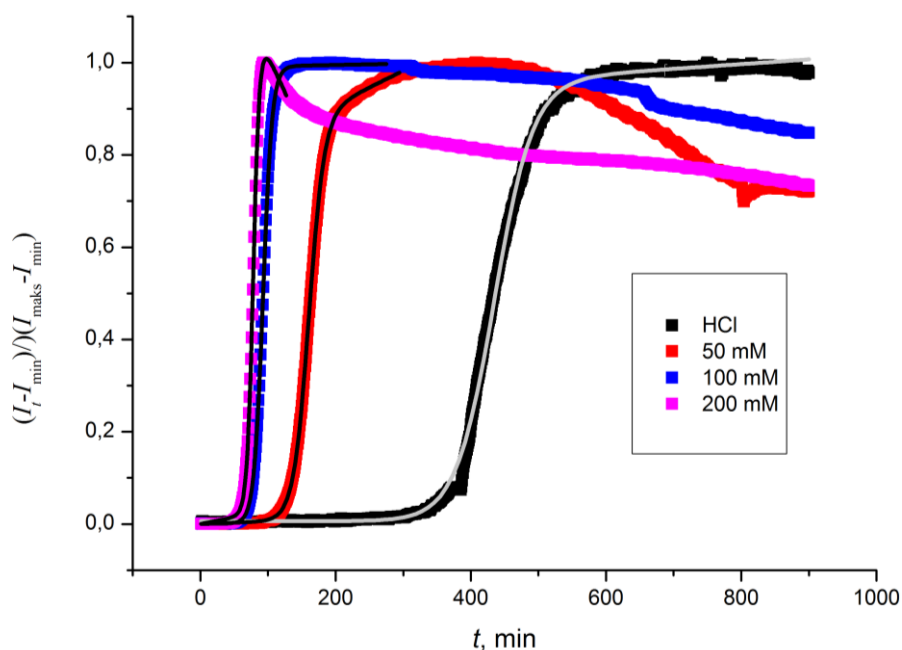
11 pav. KCl įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

priežasties, buvo skaičiuojamos vidutinės  $t_{lag}$  ir  $k_{app}$  reikšmės, gautos visų bandymų metu ir nurodomos paklaidos (1 ir 2 lentelės).

Vienvalečiai katijonai greitina agregaciją, didėjant koncentracijai. Nustatyta, kad didėjanti CsCl (10 paveikslas), NaCl (13 paveikslas) ir NH<sub>4</sub>Cl (14 paveikslas) druskų koncentracija tirpale, greitina branduolių susidarymą ir fibrilių augimą. Esant NaCl (13 paveikslas) ir NH<sub>4</sub>Cl (14 paveikslas) 100 mM ir 200 mM koncentracijoms, agregacija vyksta

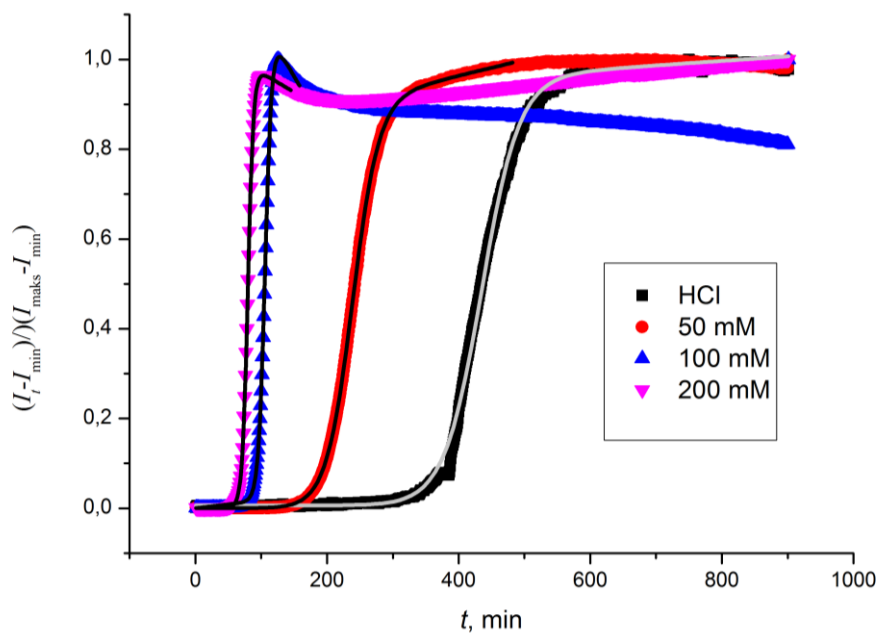


12 pav. LiCl įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

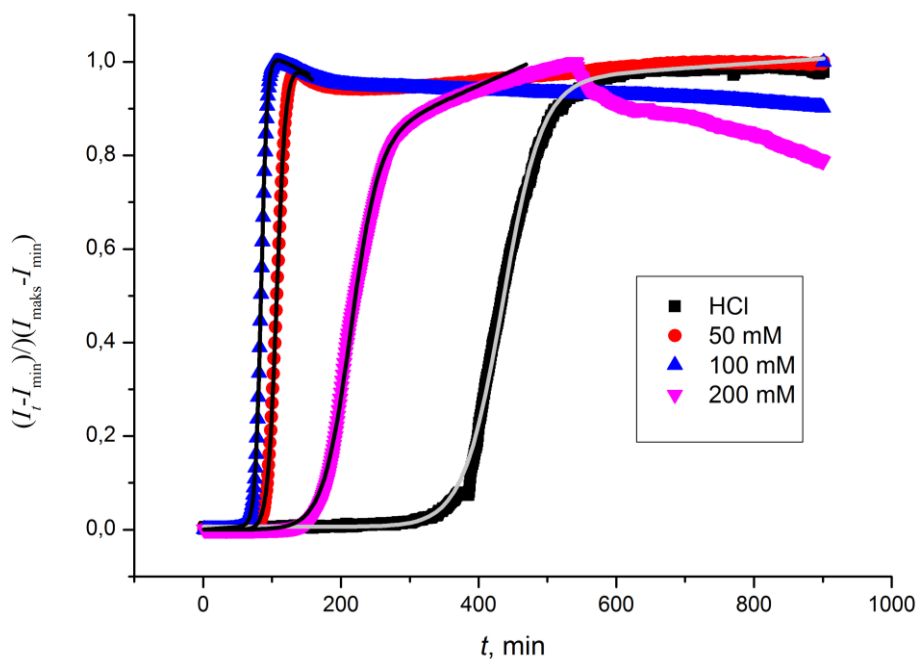


13 pav. NaCl įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

panašiai, 200 mM pasižymi trumpesniu  $t_{\text{lag}}$ . Esant KCl 100 mM ir 200 mM koncentracijomis agregacija vyksta panašiai, tiek branduolių susidarymo, tiek fibrilių augimo atžvilgiais, ir daug greičiau negu be druskos (11 paveikslas). Esant LiCl 50 mM ir 100 mM LiCl koncentracijoms, agregacija vyksta panašiai, bet 100 mM atveju branduoliai susiformuoja greičiau, bei agregacija vyksta sparčiau, negu 50 mM atveju (12 paveikslas). 50 mM LiCl ir  $\text{NH}_4\text{Cl}$  koncentracija beveik nepakeičia fibrilių formavimosi greičio (12 paveikslas).

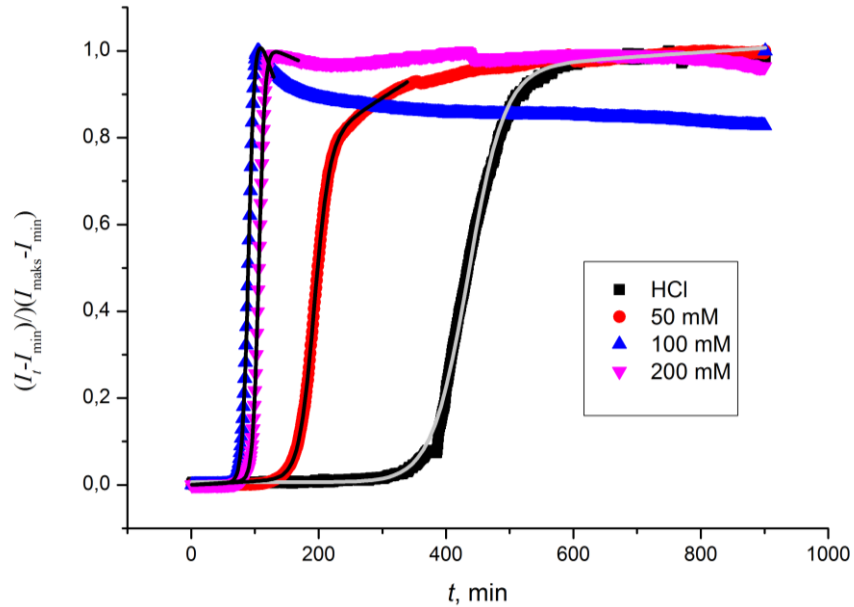


14 pav.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

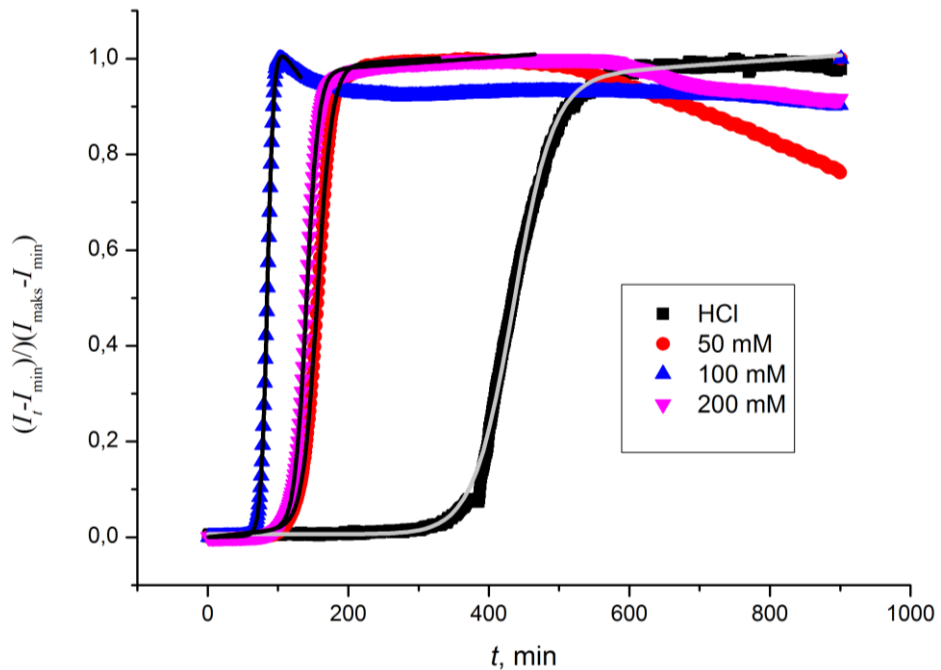


15 pav.  $\text{BaCl}_2$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

Nustatyta, kad divalenti metalų jonai sutrumpina  $t_{lag}$ , ir dauguma atvejų padidina  $k_{app}$ . Nustatyta, kad esant  $BaCl_2$  (15 paveikslas),  $MgCl_2$  (19 paveikslas),  $NiCl_2$  (20 paveikslas) ir  $ZnCl_2$  (21 paveikslas) 50 mM koncentracijai, branduolių susidarymas ir fibrilių augimas vyksta panašiu greičiu (15 paveikslas). Esant  $BaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $NiCl_2$  ir  $ZnCl_2$  100 mM koncentracijai rezultatai yra panašūs, tik agregacija vyksta sparčiau negu 50 mM koncentracijoje, tiek



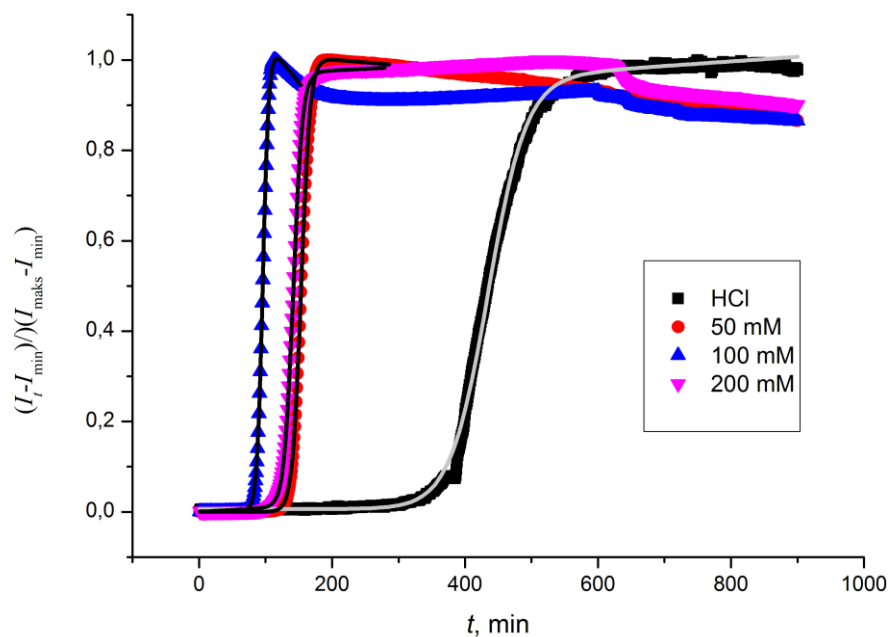
**16 pav.**  $CaCl_2$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.



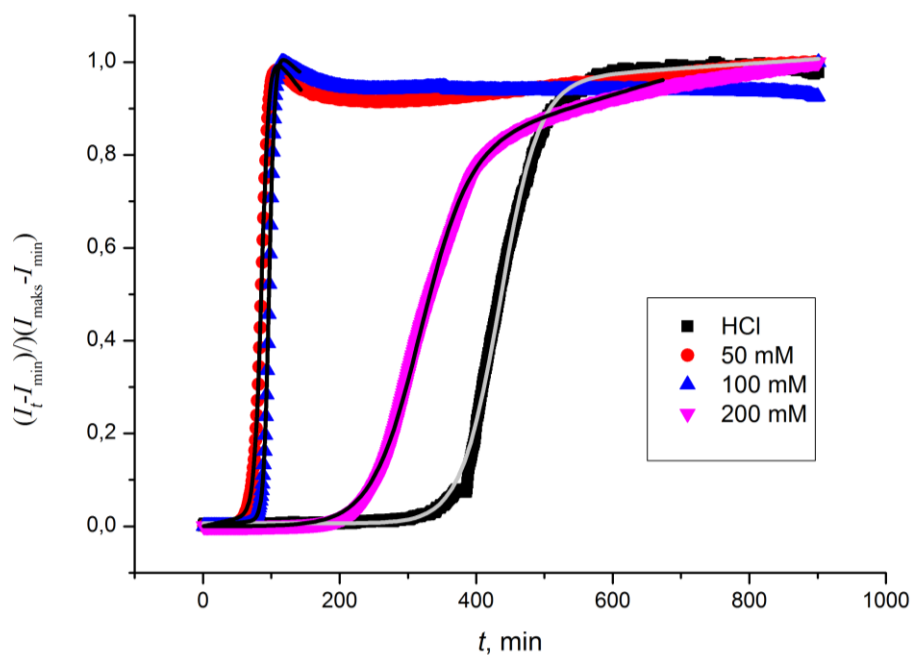
**17 pav.**  $CoCl_2$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

branduolių susidarymo, tiek fibrilių augimo prasmėmis (15 paveikslas, 19 paveikslas, 20 paveikslas, 21 paveikslas).  $\text{BaCl}_2$  (15 paveikslas) ir  $\text{NiCl}_2$  (20 paveikslas) 200 mM koncentracija sumažina  $t_{\text{lag}}$ , o  $k_{\text{app}}$  išlieka panašios. Esant  $\text{MgCl}_2$  ir  $\text{ZnCl}_2$  200 mM koncentracijai, sumažėja  $t_{\text{lag}}$ , bei  $k_{\text{app}}$  reikšmės (19 paveikslas, 21 paveikslas).

Esant 100 mM ir 200 mM  $\text{CaCl}_2$  koncentracijoms, branduolių susidarymas vyksta labai sparčiai ir fibrilės auga greitai, bet esant 50 mM koncentracijai, tiek branduolių susidarymas, tiek fibrilių augimas vyksta lėčiau negu esant 100 mM ir 200 mM  $\text{CaCl}_2$  (16 paveikslas).



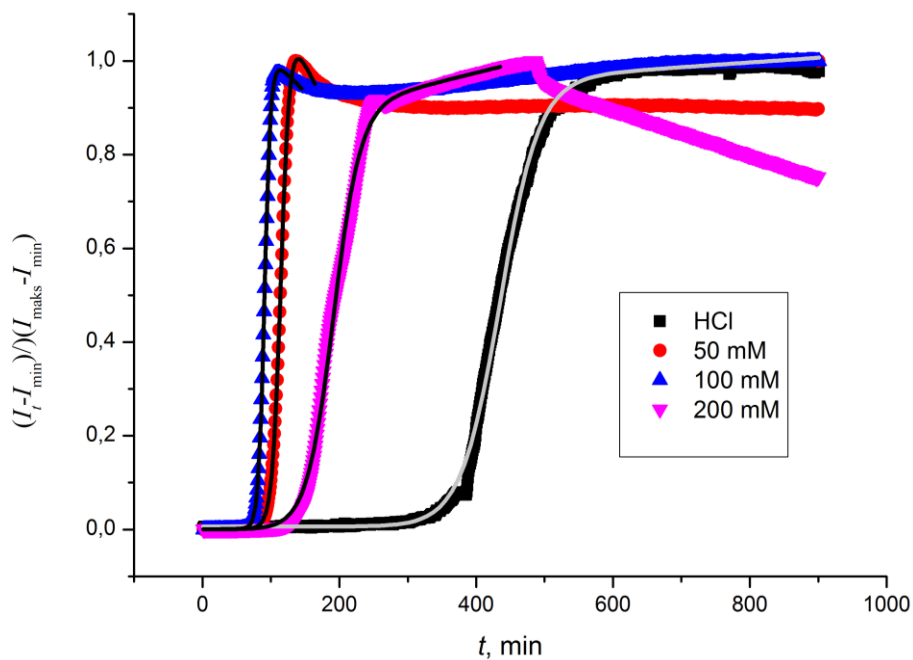
18 pav.  $\text{CuCl}_2$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.



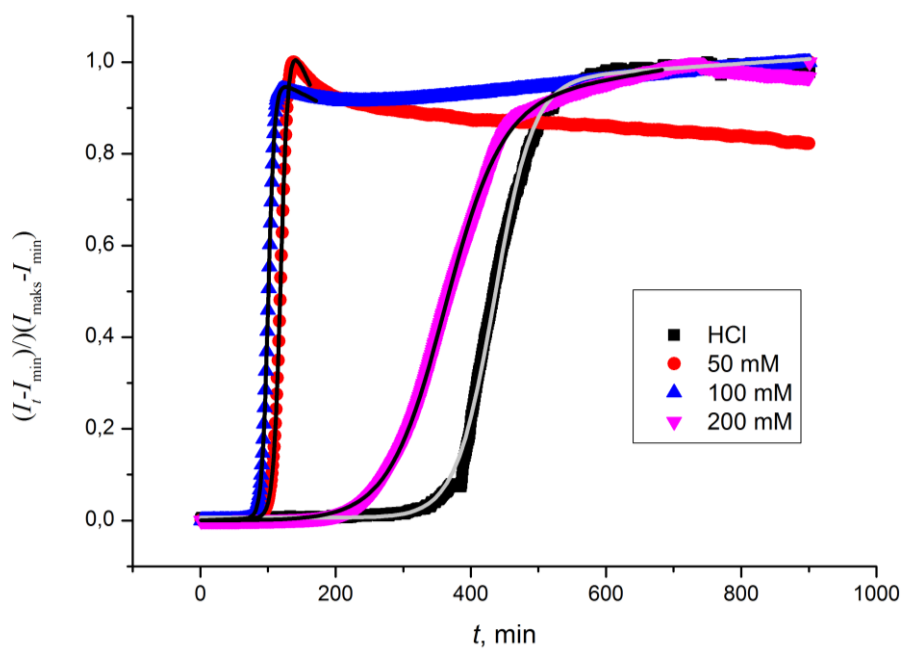
19 pav.  $\text{MgCl}_2$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

Esant  $\text{CoCl}_2$  (17 paveikslas) ir  $\text{CuCl}_2$  (18 paveikslas) 50 mM ir 200 mM koncentracijoms, yra panašūs branduolių susidarymo ir fibrilių augimo greičiai, bet esant 100 mM koncentracijai, branduolių susidarymas ir fibrilių augimas vyksta greičiau negu 50 mM ir 200 mM.

Su  $>50\text{mM}$   $\text{FeCl}_3$  insulino agregacija nevyko, todėl buvo padaryti eksperimentai su mažesnėmis koncentracijomis, t. y. 5 mM, 10 mM ir 25 mM. Tik esant 5 mM  $\text{FeCl}_3$  koncentracijai, atsirado agregacijos požymių, kas verčia manyti, kad  $\text{FeCl}_3$  smarkiai lėtina agregaciją.

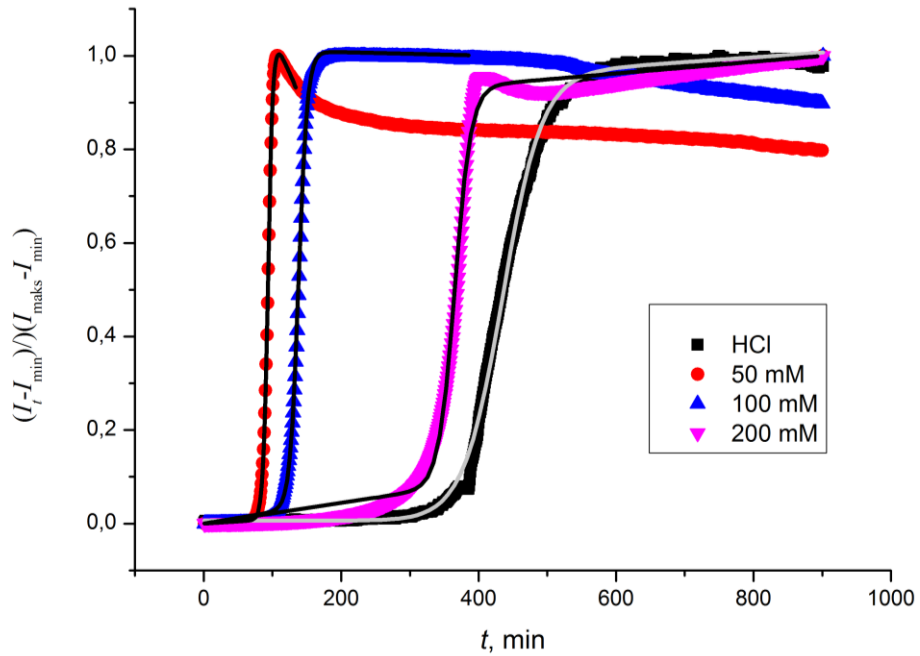


20 pav.  $\text{NiCl}_2$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

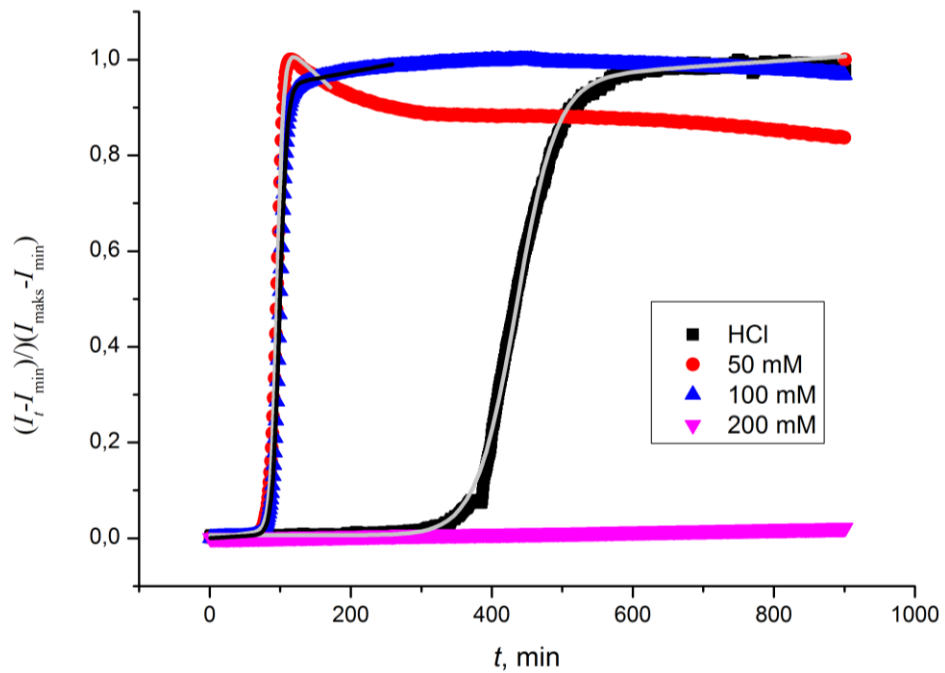


21 pav.  $\text{ZnCl}_2$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.

Nustatyta, kad  $\text{AlCl}_3$  50 mM, 100 mM ir 200 mM koncentracijos pagreitina agregaciją, tačiau labiausiai veikia 50 mM, o mažiausiai 200 mM koncentracijos (22 paveikslas). Didėjanti  $\text{CrCl}_3$  koncentracija greitina agregaciją. 200 mM atveju agregacijos pastebėti nepavyko (23 paveikslas). Gali būti, kad didelės chromo koncentracijos smarkiai sulėtina insulino agregaciją.



22 pav.  $\text{AlCl}_3$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.



23 pav.  $\text{CrCl}_3$  įtaka insulino fibrilių formavimuisi. Linijos atitinka aproksimavimo rezultatus.



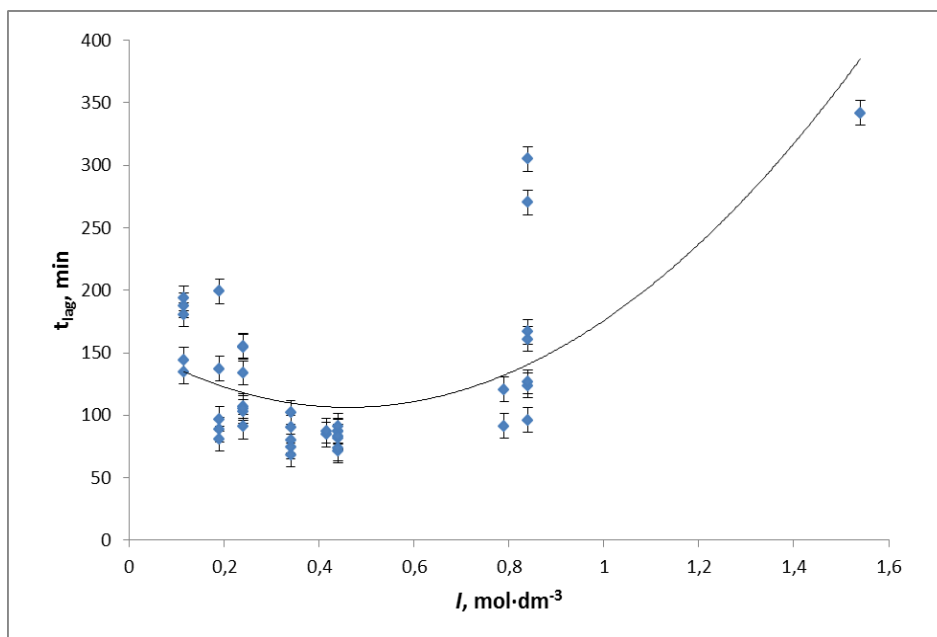
**Lentelė 3.** Gautos  $k_{app}$  reikšmės.

Be druskos		0,036 ± 0,002		
Druskos konc.:	50 mM	100 mM	200 mM	
Druskos				
AlCl <sub>3</sub>	0,268 ± 0,005	0,167 ± 0,007	0,066 ± 0,002	
BaCl <sub>2</sub>	0,140 ± 0,007	0,242 ± 0,006	0,057 ± 0,002	
CaCl <sub>2</sub>	0,086 ± 0,009	0,236 ± 0,007	0,210 ± 0,012	
CoCl <sub>2</sub>	0,104 ± 0,007	0,250 ± 0,008	0,143 ± 0,010	
CrCl <sub>3</sub>	0,231 ± 0,010	0,201 ± 0,005	-	
CsCl	0,061 ± 0,016	0,124 ± 0,005	0,220 ± 0,009	
CuCl <sub>2</sub>	0,112 ± 0,010	0,216 ± 0,008	0,171 ± 0,009	
KCl	0,080 ± 0,005	0,175 ± 0,004	0,263 ± 0,005	
LiCl	0,022 ± 0,004	0,078 ± 0,007	0,203 ± 0,009	
MgCl <sub>2</sub>	0,195 ± 0,011	0,220 ± 0,012	0,026 ± 0,001	
NaCl	0,085 ± 0,005	0,159 ± 0,006	0,221 ± 0,006	
(NH <sub>4</sub> )Cl	0,056 ± 0,003	0,194 ± 0,007	0,240 ± 0,007	
NiCl <sub>2</sub>	0,163 ± 0,007	0,236 ± 0,008	0,060 ± 0,007	
ZnCl <sub>2</sub>	0,174 ± 0,011	0,227 ± 0,007	0,023 ± 0,001	

**Lentelė 4.** Gautos  $t_{lag}$  reikšmės (min).

Be druskos		410,288 ± 79,740		
Druskos konc.:	50 mM	100 mM	200 mM	
Druskos				
AlCl <sub>3</sub>	84,481 ± 0,834	120,539 ± 1,430	341,940 ± 2,378	
BaCl <sub>2</sub>	90,928 ± 3,843	71,596 ± 2,781	160,980 ± 10,165	
CaCl <sub>2</sub>	154,545 ± 12,732	81,645 ± 0,779	96,109 ± 1,361	
CoCl <sub>2</sub>	133,745 ± 4,772	73,339 ± 0,939	123,802 ± 1,473	
CrCl <sub>3</sub>	87,422 ± 1,563	91,266 ± 0,859	-	
CsCl	144,475 ± 18,201	137,257 ± 3,121	79,890 ± 1,719	
CuCl <sub>2</sub>	155,284 ± 12,649	87,488 ± 4,308	126,724 ± 2,988	
KCl	180,490 ± 9,734	88,416 ± 1,938	90,355 ± 2,023	
LiCl	187,848 ± 17,905	199,057 ± 3,833	102,260 ± 3,182	
MgCl <sub>2</sub>	103,000 ± 8,371	87,061 ± 1,108	270,277 ± 6,621	
NaCl	134,571 ± 1,792	81,137 ± 1,082	68,102 ± 1,073	
(NH <sub>4</sub> )Cl	193,529 ± 6,359	96,873 ± 2,080	74,767 ± 1,592	
NiCl <sub>2</sub>	107,258 ± 3,323	83,037 ± 2,412	166,680 ± 5,064	
ZnCl <sub>2</sub>	105,665 ± 0,779	91,249 ± 0,613	305,211 ± 10,557	

Visos ištirtos druskos, išskyrus  $\text{FeCl}_3$ , sutrumpina lag laiką, vadinasi dėl druskų poveikio pagreitėja branduolių formavimosi greitis.



**24 pav.** Lag laiko ( $t_{lag}$ ) priklausomybė nuo joninės jėgos. Taškai – skirtingų druskų, skirtingų koncentracijų  $t_{lag}$ , linija – duomenys aproksimuoti kvadratine lygtimi.

Pažvelgus į  $t_{lag}$  priklausomybę nuo joninės jėgos (24 paveikslas) matyti, kad joninės jėgos reikšmei esant iki  $0,5 \text{ mol/dm}^3$  lag laikas trumpėja, nuo  $0,5 \text{ mol/dm}^3$  lag laikas ilgėja. Geriausiai  $t_{lag}$  priklausomybę nuo joninės jėgos aprašo kvadratinė lygtis (24 paveikslas). Labiausiai tikėtina, kad agregacija greitėja dėl chlorido jonų, esančių tirpale. Kadangi insulino pI yra 5,8, tai darytų eksperimentų sąlygomis, kai yra apie pH 1,5, jis yra teigiamai įkrautas, dėl šios priežasties insulino molekulės stumia viena kitą ir tai trukdo vykti agregacijos procesui (Novo Nordisk Company). Tirpale esant  $\text{Cl}^-$  jonų, insulinas sudaro kompleksus su  $\text{Cl}^-$  ir pašalinamas teigiamas krūvis, kas įtakoja geresnes sąlygas agregacijai. Taip galima paaiškinti kodėl pridėjus druskos insulino agregacija greitėja. Tačiau neaišku, kodėl didėjant joninei jėgai nuo  $0,5$  iki  $1,6 \text{ mol/dm}^3$  lag laikas ilgėja ir agregacija lėtėja. Taip pat matosi nedidelė priklausomybė nuo katijono prigimties.

Žvelgiant į 24 paveikslą matosi, kad didesnės  $\text{ZnCl}_2$  ir  $\text{MgCl}_2$  koncentracijos iškrenta iš bendro vaizdo. Jų lag laikai yra didesni ir jie labiau lėtina agregaciją, negu kiti jonai. Taip pat šiomis sąlygomis fibrilių augimo greitis mažesnis negu eksperimentuose visai be druskos. Žinant, kad insulino heksamerą stabilizuoja  $\text{Zn}^{2+}$ , galima manyti, kad esant didelėms  $\text{Zn}^{2+}$  koncentracijoms, galbūt netgi stipriai rūgštiniėje pH, atsiranda  $\text{Zn}^{2+}$  stabilizuoti insulino

heksamerai. Tokiu būdu sumažėja monomerų koncentracija, o tuo pačiu ir nuo jos priklausomas fibrilių susidarymo greitis. Kadangi  $Mg^{2+}$  veikia insulino agregaciją panašiai, kaip ir  $Zn^{2+}$ , galima manyti, kad ir magnio jonai gali stabilizuoti natyvius insulino oligomeras.

## IŠVADOS

1. Išsiaiškinti tirtų druskų tirpimai vandenyje, kambario temperatūroje. Visos druskos tirpsta reikiamomis sąlygomis.

2. Atlikta serija insulino agregacijos eksperimentų, esant skirtingoms katijonų koncentracijoms, gauti duomenys.

3. Apskaičiuoti fibrilių susidarymo kinetiniai parametrai:  $t_{lag}$  ir  $k_{aap}$ . Palyginus gautus agregacijos  $t_{lag}$ , pastebėta netiesinė priklausomybė nuo joninės jėgos. Atskirų jonų sąlygoti agregacijos kinetikos skirtumai nedideli, išskyrus  $Fe^{3+}$ , kuris arba labai sulėtina agregaciją arba išvis neleidžia jai prasidėti, bei  $Mg^{2+}$  ir  $Zn^{2+}$  kurie, esant didelėms koncentracijoms, sulėtina fibrilių formavimąsi.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Alies, B.; Hureau, C.; Faller, P. 2013. The role of metal ions in amyloid formation: general principles from model peptides, *Metallomics : integrated biometal science*, 5: 183–92.
- Amaral, M. D. 2004. CFTR and Chaperones, *Journal of Molecular Neuroscience* 23: 41–48.
- Biancalana, M.; Koide, S. 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochimica et Biophysica Acta* 1804: 1405–1412.
- Chemistry explained. [interaktyvus]. [žiūrėta 2013-05-29]. Prieiga per internetą: <http://www.chemistryexplained.com/Hy-Kr/Insulin.html>
- Chiti, F.; Dobson, C. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annual Review of Biochemistry* 75: 333–66.
- Hudson, S. A.; Ecroyd, H.; Kee, T. W.; Carver, J. A. 2009. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds, *The FEBS journal* 276: 5960–5972.
- Jiménez, J. L.; Nettleton, E. J.; Bouchard, M.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M.; Saibil, H. R. 2002. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9196–9201.
- Lee, CC.; Nayak, A.; Sethuraman, A. 2007. A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation, *Biophysical journal* 92: 3448–3458.
- (A) Nielsen, L.; Khurana, R.; Coats, A.; Frokjaer, S.; Brange, J.; Vyas, S.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism, *Biochemistry* 40: 6036–6046.
- (B) Nielsen, L.; Frokjaer, S.; Brange, J.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism, *Biochemistry* 40: 8397–8409.
- Novo Nordisk Company. [interaktyvus]. [žiūrėta 2013-05-29]. Prieiga per internetą: <http://www.fefchemicals.com/biopharm/data-about-insulin-human/origin-application/>.
- Pagel, K.; Vagt, T.; Kohajda, T.; Kokschi, B. 2005. From a-helix to b-sheet – a reversible metal ion induced peptide secondary structure switch, *Org. Biomol. Chem.* 3:2500–2502.

- Pallitto, M. M.; Murphy, R. M. 2001. A mathematical model of the kinetics of beta-amyloid fibril growth from the denatured state, *Biophysical Journal* 81: 1805–1822.
- Qiagen. [interaktyvus]. 2013. [žiūrėta 2013-05-29]. Prieiga per internetą:  
<http://b2b.qiagen.com/products/rotor-geneq.aspx#Tabs=t1>.
- Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J. W.; McFarlane, H. T.; Madsen, A. Ø.; Riek, C.; Eisenberg, D. 2007. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers, *Nature* 447: 453–457.
- Shikama, Y.; Katayama, J.; Yagihashi, N.; Uehara, O.; Murata, Y.; Yajima, N.; Wada, R.; Yagihashi, S. 2010. Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a diabetic patient, *Internal medicine Tokyo Japan* 49: 397–401.
- Sipe, J. D.; Cohen, A. S. 2000. Review: history of the amyloid fibril, *Journal of Structural Biology* 130: 88–98.
- Smirnovas, V.; Winter, R. 2008. Revealing different aggregation pathways of amyloidogenic proteins by ultrasound velocimetry, *Biophysical Journal* 94: 3241–3246.
- Vikipedija. [interaktyvus]. [žiūrėta 2013-05-29]. Prieiga per internetą:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Solubility\\_table](http://en.wikipedia.org/wiki/Solubility_table).
- Yumlu, S.; Barany, R.; Eriksson, M.; Röcken, C. 2009. Localized insulin-derived amyloidosis in patients with diabetes mellitus: a case report, *Human Pathology* 40: 1655–1660.