



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS FAKULTETAS  
BIOCHEMIJOS IR MOLEKULINĖS BIOLOGIJOS KATEDRA

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė

Katažyna MILTO

---

AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ ILGĖJIMO KINETIKA IR  
TERMODINAMIKA

---

BAKALAURO DARBAS

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

VILNIUS, 2014

BAKALAURO DARBAS

---

AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ ILGĖJIMO KINETIKA IR  
TERMODINAMIKA

---

Darbas atliktas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto  
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje

Studentas:

Katažyna MILTO

\_\_\_\_\_

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

\_\_\_\_\_

VILNIUS, 2014

# Turinys

<b>Santrumpos</b>	<b>3</b>
<b>Įvadas</b>	<b>4</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b>	<b>5</b>
1.1. Amiloidai	5
1.1.1. Amiloidų formavimasis	8
1.1.2. Insulinas – modelinis baltymas	10
1.1.3. Priono baltymai (PrP)	11
1.1.4. Baltyminis infektyvumas	13
1.2. Fibrilių formavimasis <i>in vivo</i> ir <i>in vitro</i>	13
1.2.1. Aminorūgščių seka	14
1.2.2. Įvairių veiksnių įtaka amiloidinių fibrilių susidarymui	14
1.2.3. Amiloidinių fibrilių ilgėjimo termodinamika	15
1.3. Tioflavino T fluorescencija	15
<b>2. Medžiagos ir metodai</b>	<b>18</b>
2.1. Medžiagos	18
2.2. Metodai	18
2.2.1. Fluorescencijos matavimas	18
2.2.2. Sėklos gaminimas	19
2.2.3. Sėkla inicijuota insulino agregacija	19
2.2.4. Priono baltymo fibrilių ilgėjimo kinetikos tyrimai	19
2.2.5. Mėginių paruošimas elektronei mikroskopijai	19
2.2.6. Baltymo denatūracijos tyrimai	20
2.2.7. PrP fibrilių stabilumo tyrimai	20
2.2.8. Duomenų apdorojimas	20
<b>3. Eksperimentų rezultatai ir jų aptarimas</b>	<b>23</b>
3.1. Michaelio-Menten modelio pritaikymas amiloidinių fibrilių ilgėjimui aprašyti	23
3.1.1. Ultragarso dezintegratoriaus panaudojimas eksperimentuose su insulinu	23
3.1.2. Insulino fibrilių ilgėjimo kinetiniai tyrimai	24
3.2. Aplinkos veiksnių įtaka priono fibrilių ilgėjimui	26
3.2.1. Ultragarso dezintegratoriaus panaudojimas eksperimentuose su pelės priono baltymu	26
3.2.2. Temperatūros ir denatūracijos koncentracijos įtaka fibrilių ilgėjimo kinetikai	27

4. Išvados	32
Santrauka	33
Summary	34
Mokslinių darbų sąrašas	35
Literatūros sąrašas	39
Priedai	40

## Santrumpos

aps./min	Apsisukimai per minutę
BMR	Branduolių magnetinis rezonansas
CD	Cirkuliarinis dichroizmas
CDJ	Creutzfeldt-Jakob liga
GPI	Glikozilfosfatidilinozitolis
GuHCl	Guanidino hidrochloridas
PB	Fosfatinis buferis
PrP	Priono baltymas
PrP <sup>C</sup>	Natvus priono baltymas (angl. <i>cellular</i> )
PrP <sup>Sc</sup>	Infektyvi priono baltymo forma (angl. <i>scrapie</i> )
rMoPrP89-230	Rekombinantinis pelės priono baltymas (C galinė seka)
ThT	Tioflavinas T

## Įvadas

Baltymų agregacija siejama su daugeliu neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono ir kitomis, o taip pat II tipo diabetu ir kempinlige. Nors kiekvienos ligos atveju joje dalyvauja skirtingi baltymai (su Alzheimerio liga siejamas  $\beta$ -amiloidas ir tau baltymas, su Parkinsono liga –  $\alpha$ -sinukleinas, su Hantingtono liga – hantingtinas), juos vienija aptinkamų agregatų panašumai, tokie kaip pasikartojančios  $\beta$ -klostės, išsidėsčiusios statmenai fibrilės ašiai, fibrilinė agregatų forma ir savybė jungtis su amiloidinei struktūrai specifiskais dažais.

Baltyminis infektyvumas taip pat siejamas su amiloidogene agregacija. Manoma, kad amiloidinių fibrilių ilgėjimas pamėgdžioja priono baltymo dauginimosi mechanizmą, kai prionai, patekę į organizmą, pakeičia jame esančių natyvių ląstelių priono baltymų struktūrą ir paverčia juos lygiai tokiais pačiais infekciniais vienetais.

Amiloidinių fibrilių ilgėjimo tyrimai svarbūs siekiant suprasti baltyminį infektyvumą ir pačius amiloidus.

Šio baigiamojo darbo tyrimo objektai yra fibrilinius agregatus formuojantys baltymai: rekombinantinis žmogaus insulinas ir rekombinantinis pelės priono baltymas. Insulinas lengvai suformuoja amiloidines fibriles *in vitro*, todėl naudojamas kaip modelinis baltymas agregacijos tyrimuose. Priono baltymas naudojamas siekiant suprasti prioninių ligų mechanizmą.

**Šio darbo tikslas** – ištirti amiloidinių fibrilių ilgėjimo kinetiką ir termodinamiką.

### **Darbo uždaviniai:**

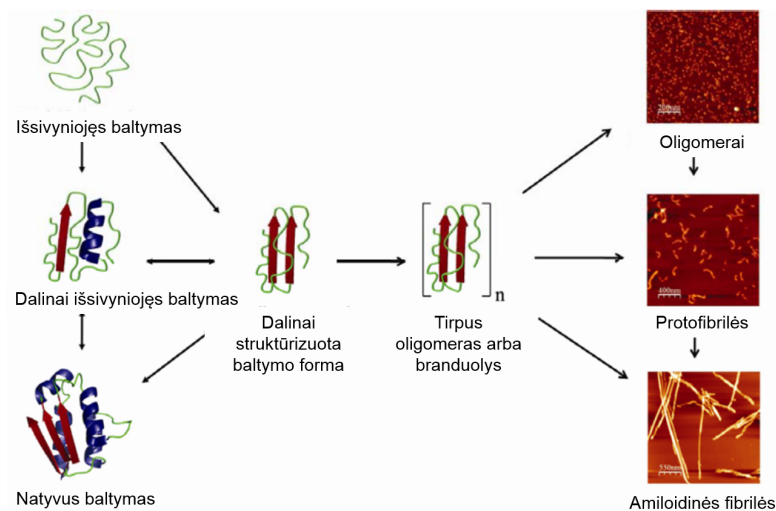
1. Ištirti fibrilių ilgėjimo kinetikos priklausomybę nuo ardymo ultragarsu laiko.
2. Nustatyti, kiek gerai Michaelio-Menten modelis aprašo fibrilių ilgėjimo kinetiką, įvertinant kinetinius parametrus: Michaelio konstantą  $K_M$  ir maksimalų reakcijos greitį  $v_{max}$ .
3. Ištirti temperatūros ir denatūrantų įtaką fibrilių ilgėjimui, apskaičiuoti fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energiją  $E_a$ .
4. Įvertinti susidariusių fibrilių stabilumą.

# 1. Literatūros apžvalga

## 1.1. Amiloidai

Terminą „amiloidas“ botanikos srityje pirmą kartą paminėjo vokiečių mokslininkas Matthias Jakob Schleiden 1838 metais. Šiuo žodžiu jis apibūdino augaluose esantį krakmolą primenantį komponentą (angl. *amylaceous constituent*) (Kyle, 2001). Rudolph Virchow 1854 metais šį terminą pavartojo medicinos literatūroje aprašydamas iš smegenų išskirtų darinių reakciją su jodo tirpalu ir sieros rūgštimi: abiem atvejais mėginiai nusidažydavo mėlynai-violetine spalva. Šios į celiuliozę panašios struktūros buvo pavadintos amiloidais [gr. amylon, lot. amyllum – krakmolos] (Maji et al., 2009; Sipe and Cohen, 2000). 1859 metais Friedreich ir Kekule iš organų išskirtuose amiloiduose pademonstravo didelį azoto kiekį, o tai privertė tyrinėti amiloidus kaip baltymus (linkusius formuoti fibriles), o ne angliavandenius, kaip manyta anksčiau (Sipe and Cohen, 2000).

Potencialiai visi baltymai ir peptidai esant tam tikroms sąlygoms galėtų agreguotis į skirtingas struktūras, nuo visiškai netvarkingų amorfinių agregatų iki labai tvarkingų formų (1.1 pav.) (Chiti and Dobson, 2006; Ecroyd and Carver, 2008).



**1.1 pav.** Konformaciniai virsmai baltymo molekulėje, dėl kurių formuojasi amiloidinės fibrilės (pritaikyta iš Kumar and Udgaonkar 2010).

Su tvarkingomis baltymų sancaupomis ląstelių viduje arba už ląstelės ribų siejama daugelis ligų. 1.1 lentelėje pateikiami susirgimai, susiję su tokia agregacija. Šalia taip pat nurodyti baltymai, kurie ligos atveju randami sancaupose. Amiloidozės galima suskirstyti į tris grupes:

- neurodegeneracinės ligos – agregacija pasireiškia smegenyse;
- lokalizuotos amiloidozės: sergant šiomis ligomis, agregatų sancaupos randamos tam tikro tipo audiniuose, bet ne smegenyse;

- sisteminės amiloidozės – agregacija pasireiškia daugelyje audinių.

**1.1 lentelė.** Žmogaus ligos, susijusios su baltymų agregacija (pritaikyta iš [Chiti and Dobson 2006](#)).

Liga	Agreguojantis baltymas arba peptidas
<b>Neurodegeneracinės ligos</b>	
Alzheimerio liga <sup>a</sup>	Amyloido $\beta$ peptidas
Spongiforminės encefalopatijos <sup>a,b</sup>	Priono baltymas arba jo fragmentas
Parkinsono liga <sup>a</sup>	$\alpha$ -sinukleinas
Demencija su Lewy kūneliais <sup>a</sup>	$\alpha$ -sinukleinas
Frontotemporalinė demencija su parkinsoniniu sindromu <sup>a</sup>	Tau
Amiotropinė lateralinė sklerozė <sup>a</sup>	Superoksido dismutazė 1
Hantingtono liga <sup>c</sup>	Hantingtinis su poliglutamino seka
Spinocerebralinė ataksija <sup>c</sup>	Ataksinas su poliglutamino seka
Spinocerebralinė ataksija 17 <sup>c</sup>	Prie TATA dėžutės prisijungiantis baltymas su poliglutamino seka
Bulbo-spinalinė raumenų atrofija <sup>c</sup>	Androgenų receptorius su poliglutamino seka
<b>Sisteminės amiloidozės</b>	
AL amiloidozė <sup>a</sup>	Imunoglobulino lengvosios grandinės arba jų fragmentai
AA amiloidozė <sup>a</sup>	Serumo amiloido A baltymo fragmentai
Paveldimoji Viduržemio jūros liga <sup>a</sup>	Serumo amiloido A baltymo fragmentai
Senatvinė sisteminė amiloidozė <sup>a</sup>	Laukinio tipo transtiretinas
Paveldimoji amiloidotinė polineuropatija <sup>c</sup>	Transtiretino mutantai
Su hemodialize susijusi amiloidozė <sup>a</sup>	$\beta$ 2-mikroglobulinas
ApoAI amiloidozė <sup>c</sup>	Apolipoproteino AI N galinis fragmentas
ApoAII amiloidozė <sup>c</sup>	Apolipoproteino AII N galinis fragmentas
ApoAIV amiloidozė <sup>c</sup>	Apolipoproteino AIV N galinis fragmentas
Lizocimo amiloidozė <sup>c</sup>	Lizocimo mutantai
Fibrinogeno amiloidozė <sup>c</sup>	Fibrinogeno $\alpha$ grandinės variantai
<b>Lokaluotos amiloidozės</b>	
II tipo diabetas <sup>a</sup>	Amilinas, dar žinomas kaip kasos amiloido polipeptidas
Medulinė skydliaukės karcinoma <sup>a</sup>	Kalcitoninas
Prieširdžių amiloidozė <sup>a</sup>	Prieširdžio natriuretinis faktorius
Paveldima cerebralinė hemoragija su amiloidoze <sup>c</sup>	Amiloido $\beta$ peptido mutantai
Hipofizės prolaktinoma	Prolaktinas
Katarakta <sup>a</sup>	$\gamma$ -kristalinai

<sup>a</sup> Daugiausia savaiminės, nors užregistruoti keli paveldimos ligos atvejai, kai susirgimas siejamas su specifinėmis mutacijomis.

<sup>b</sup> Perduodamos ligos atvejai.

<sup>c</sup> Daugiausia paveldimos, tačiau užregistruoti keli atvejai, kai liga atsirado savaime.



Keli iš susirgimų daugiausia atsiranda savaime (1.1 lentelėje pažymėti <sup>a</sup>), nors užregistruotos ir jų paveldimos formos. Kitos ligos yra tik paveldimos (atsiranda dėl mutacijų) (1.1 lentelėje pažymėtos <sup>c</sup>). Spongiforminės encefalopatijos gali būti pernešamos tarp žmonių, o taip pat ir kitų žinduolių. Teigiama, jog aplinkoje, kurioje gausu amiloidinių fibrilių, susirgimo rizikos faktorius yra didesnis. Panašiai, susidariusių fibrilių iš rekombinantinio pelės priono baltymo injekcija sukelia ligą, jei pelėje yra priono baltymo raiška (Chiti and Dobson, 2006).

1.1 lentelėje išvardyti baltymai yra labai skirtingi (išimtis – baltymai su poliglutamino seka): skiriasi jų ilgis, hidrofobiškumas, antrinė struktūra. Juos vienija tik suformuoti tvarkingi, labai stabilūs baltyminiai dariniai (Harrison et al., 2007).

Ne visi baltymai sukelia ligas. Gyvieji organizmai, nuo prokariotų iki žmogaus, fiziologinėmis sąlygomis kai kuriuos baltymus verčia amiloidinėmis fibrilėmis, atliekančiomis tam tikras funkcijas (Kumar and Udgaonkar, 2010). Tokių baltymų pavyzdžiai pateikti 1.2 lentelėje. Taigi tam tikrų baltymų agregacija yra būtina kai kuriems ląstelės mechanizams (Chiti and Dobson, 2006).

**1.2 lentelė.** Baltymai formuojantys nepatogeninius amiloidus su specifinėmis funkcijomis (pritaikyta iš Chiti and Dobson 2006; Harrison et al. 2007).

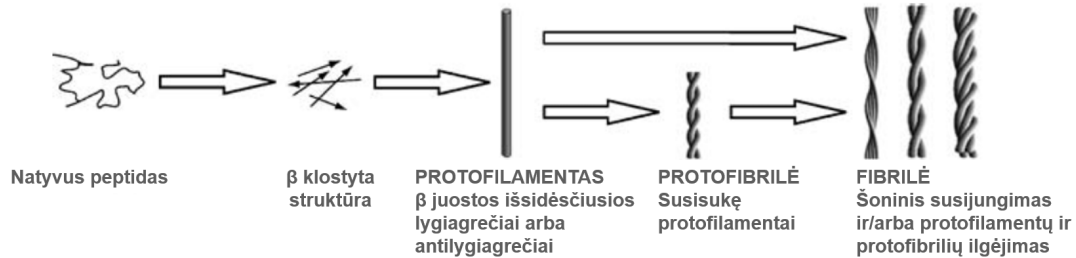
Baltymas	Organizmas	Amiloidų funkcija
Kurlinai	<i>Escherichia coli</i>	Padedą kolonizuotis ir formuoti bioplėveles
Čaplinai	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Naudojami prisitvirtinimui prie hidrofobinių paviršių ir leidžia vystytis hifams
Hidrofobinai	<i>Neurospora crassa</i>	Naudojami prisitvirtinimui prie hidrofobinių paviršių ir leidžia vystytis hifams
Spidroinai	<i>Nephila edulis</i>	Dalyvauja voratinklio šilkinųjų pluoštų formavimesi
Pmel17*	<i>Homo sapiens</i>	Melanosomų viduje sudaro pluoštus, ant kurių formuojasi melanino granulės
Ure2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Skatina neturtingų azoto šaltinių įsisavinimą
Sup35p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Suteikia naują fenotipą ([PSI+]) transliacijos metu skaitydamas per stop kodoną
Rnq1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Funkcija nėra gerai žinoma
HET-s	<i>Podospora anserina</i>	Sukelia programuotą ląstelės žūtį (heterokarionų nesuderinamumas)

\* vidinis membraninio baltymo Pmel17 domenas.

Tikėtina, kad ateityje bus atrasta daugiau baltymų, fiziologinėmis sąlygomis formuojančių amiloidus. Tai patvirtina RAGE (glikozilinimo produktų receptorių) – amiloidų receptoriaus atradimas bei peptidazių, tokių kaip katepsinai, sugebėjimas skaidyti baltymus amiloidų sancaupose (Harrison et al., 2007).

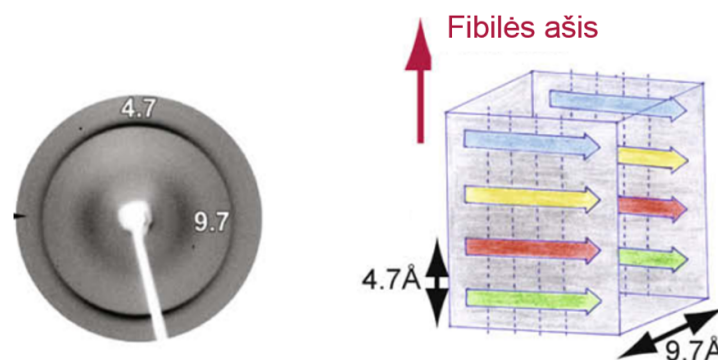
### 1.1.1. Amiloidų formavimasis

Tam, kad baltymas agreguotų į amiloidinę fibrilę, jis turi pereiti keletą pakopų, kurių metu susidaro skirtingos tarpinės būsenos (1.2 pav.).



1.2 pav. Amiloidinių fibrilių formavimosi hierarchija (pritaikyta iš Harrison et al. 2007).

Amiloidinės fibrilės yra  $\sim 10$  nm skersmens ir dažniausiai formuojamos iš 2-6 protofilamentų (Ecroyd and Carver, 2008; Kumar and Udgaonkar, 2010). Šie sąveikauja per elektrostatinę ir hidrofobinę sąveikas (Harrison et al., 2007). Suformuotos fibrilės dažniausiai yra nešakotos, labai stabilios ir atsparios denatūrantų arba proteazių poveikiui. Dėl šių savybių ląstelėms ne visada pavyksta pašalinti susidariusius agregatus (Ecroyd and Carver, 2008). Visi amiloidinių agregatų rentgeno spindulių difrakcijos vaizdai atrodo panašiai (1.3 pav.). Matomi skersinei  $\beta$  struktūrai būdingi difrakcijos signalai: ties pusiauju  $10\text{-}11$  Å, meridianu  $4,8$  Å. Signalas ties pusiauju atitinka atstumą tarp lakštų, o ties meridianu parodo atstumą tarp juostų  $\beta$ -klostėse (Biancalana and Koide, 2010; Ecroyd and Carver, 2008; Maji et al., 2009). Buvo parodyta, kad bent jau fiziologinėmis sąlygomis amiloidiniai agregatai termodinamiškai labiau stabilūs negu natyvūs jų baltymai (Buell et al., 2012).



1.3 pav. Amiloidinių fibrilių rentgeno difrakcijos vaizdas, būdingas  $\beta$ -klostytam struktūriniam motyvui (pritaikyta iš Maji et al. 2009).

Amiloidinių fibrilių formavimasis aiškinamas dviejų etapų mechanizmu: lag fazės metu susidaro branduoliai, eksponentinės fazės metu ilgėja fibrilės. (Hortschansky et al., 2005; Nielsen et al., 2001b). Branduolių susidarymas laikomas atsitiktine, reakcijos greitį limituojančia stadija (Foderà et al., 2008; Hortschansky et al., 2005). Pradinių branduolių susirinkimui svarbiausia yra hidrofobinė sąveika (Nielsen et al., 2001a). Pirmajam

aktyviajam vienetui susiformuoti reikia tam tikros baltymo koncentracijos: lag fazė ilgėja mažėjant baltymo koncentracijai, kol pasiekus kritinę koncentracijos vertę agregacija nevyksta (Kumar and Udgaonkar, 2010). Agregatiniam centrui susiformavus prasideda ilgėjimo stadija, kai baltymo monomero molekulės arba oligomerai jungiasi prie fibrilės galų. Fibrilių ilgėjimas yra daug greitesnis procesas, galintis vykti sąlygomis, nepalankiomis branduolių susidarymui, dėl to amiloidų formavimosi varomoji jėga laikomas būtent fibrilių augimas (Milto et al., 2013).

Reakcijos mechanizmui aprašyti pasiūlyta keletas matematinių modelių. Sigmoidinė funkcija naudojama charakterizuoti dviejų etapų mechanizmą, aprašytą anksčiau (Nielsen et al., 2001b), eksponentinė fazė dažnai apibūdinama pirmo laipsnio kinetika (Esler et al., 1996; Naiki and Gejyo, 1999). Yra ir sudėtingų modelių, atsižvelgiančių į papildomus vyksmus, tokius kaip antrinė nukleacija (fibrilių šakojimasis arba fragmentacija) (Jeong et al., 2013; Knowles et al., 2009). Antrinės nukleacijos metu iš egzistuojančių filamentų formuojasi papildomi agregatiniai centrai: fibrilėms lūžtant susidaro daugiau aktyvių galų, be to, fibrilės paviršius galėtų katalizuoti naujų branduolių susidarymą (Knowles et al., 2009).

Tačiau ne visada modelis gerai koreliuoja su eksperimentiniais duomenimis. Tam, kad aproksimacija pagal bet kurį iš modelių gerai atitiktų gautuosius rezultatus, agregacijos procesas turi būti griežtai kontroliuojamas, kad neatsirastų modelyje neaprašytų procesų. Vienintelis vyksmas, kuris gali būti atskirtas nuo kitų, yra fibrilių ilgėjimas. Procesą galima inicijuoti pridėjus paruoštų agregatų į baltymo monomero tirpalą (Dzwolak et al., 2004). Tokioje sistemoje bendras fibrilių skaičius per visą reakcijos laiką išlieka nepakitęs ir lygus pridėtam (Cohen et al., 2012). Reakcijos sąlygas ir baltymo koncentraciją galima parinkti taip, kad nevyktų pirminė nukleacija. Vengiant maišymo galima minimalizuoti antrinę nukleaciją (Milto et al., 2013).

Buvo pastebėta, kad fibrilių ilgėjimas yra labai panašus į fermentinę reakciją. Procesą net bandyta analizuoti naudojant Michaelio-Menten lygtį, kai reakcijoje dalyvauja du reagentai: fibrilės ir tirpios baltymo molekulės. Tuomet fibrilių galai atlieka fermento aktyviojo centro vaidmenį (fibrilėms ilgėjant galų skaičius lieka nepakitęs), o monomerai ir oligomerai – substrato vaidmenį (Scheibel et al., 2004). Michaelio-Menten fermentinės kinetikos modelio schema:



kur E yra fermentas, S – substratas, ES – fermento-substrato kompleksas ir P – produktas. Fibrilių ilgėjimas gali būti užrašomas taip:



kur F – fibrilė, M – monomeras (negalima atmesti galimybės, kad fibrilės ilgėja prijungda-

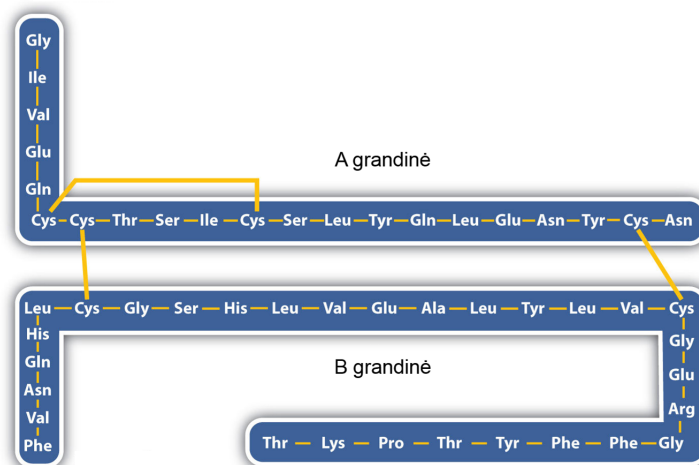
mos oligomerus, tačiau tam, kad modelis būtų kuo paprastesnis, naudojama  $M$ ), o FM – trumpą laiką egzistuojantis kompleksas (nuo monomero prisijungimo prie fibrilės iki jo pavirto fibrilės dalimi). Fibrilių ilgėjimo greitis galėtų būti aprašomas Michaelio-Menten lygtimi:

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

kur  $M$  yra monomero koncentracija,  $v_{max}$  – didžiausias reakcijos greitis ( $v_{max} = k_{+2}F_g$ ,  $k_{+2}$  – FM komplekso brendimo iki ilgesnių fibrilių reakcijos greičio konstanta ir  $F_g$  – fibrilių galų koncentracija),  $K_M$  – Michaelio konstanta ( $K_M = (k_{+2} + k_{-1})/k_{+1}$ ,  $k_{+1}$  – monomero prisijungimo prie fibrilės reakcijos greičio konstanta ir  $k_{-1}$  – FM komplekso disociacijos reakcijos greičio konstanta) (Milto et al., 2013).

### 1.1.2. Insulinas – modelinis baltymas

Insulinas – kasos  $\beta$  ląstelių gaminamas baltymas. Tai vienas iš pagrindinių hormonų, valdančių gliukozės metabolizmą. Baltymą (5,8 kDa) sudaro 2 polipeptidinės grandinės: viena (A) susideda iš 21 aminorūgšties, kita (B) iš 30 aminorūgščių (1.4 pav.) (Nelson and Cox, 2004).



**1.4 pav.** Žmogaus insulino aminorūgščių seka. Polipeptidinės grandinės sujungtos disulfidiniiais ryšiais (pritaikyta iš Hill et al. 2011).

Nors šis baltymas nesiejamas su patalogine agregacija *in vivo*, tačiau jis lengvai formuoja amiloidus *in vitro*. Dėl daugelio biocheminių ir struktūrinių duomenų insulinas tapo puikiu amiloidų tyrimų modeliu (Dzwolak et al., 2004).

Tirpale insulinas egzistuoja kaip skirtingų formų: monomerų, dimerų, tetramerų, heksamerų mišinys, priklausomai nuo baltymo koncentracijos, pH, metalų jonų buvimo, joniškos jėgos ir tirpiklio (Foderà et al., 2008; Nielsen et al., 2001a,b). Fiziologiškai vyraujanti forma –  $Zn^{2+}$  koordinuotas heksameras, kurį asocijuodami suformuoja trys dimerai, stabilizuojami nuo dviejų iki keturių  $Zn^{2+}$  jonų. Esant pH 2-8 ir mažai baltymo koncentracijai,

insulinas yra dimeras. Kai koncentracija yra didesnė negu 1,5 mg/ml, insulinas yra tetrameras (Nielsen et al., 2001a,b). Monomeru būna 20% acto rūgštyje (Foderà et al., 2008; Nielsen et al., 2001a,b).

Manoma, kad insulino fibrilių formavimasis prasideda nuo monomerinės baltymo formos: kai keli baltymo monomerai susirenka ir suformuoja branduolį – fibrilių formavimosi pirmtaką. Tai patvirtina ir faktas, kad žemėjant pH, kai dauguma baltymo molekulių yra monomerai arba dimerai, didėja galimybės susidaryti insulino fibrilėms (Nielsen et al., 2001a).

### 1.1.3. Priono baltymai (PrP)

Prionai (ang. *proteinaceous infectious particle*) – iš baltymų sudarytos infekcinės dalelės, kurios sukelia mirtinas neurodegeneracines ligas (žmonėms – Creutzfeldt-Jakob liga (CJD), kuru, mirtina nemiga; galvijams – jaučių spongiforminė encefalopatija; avims – scrapie) vadinamas prioninėmis ligomis. Už prionų hipotezę ir tyrimus 1997 metais Stanley B. Prusiner gavo Nobelio premiją.

Priono baltymai gali įgyti dvi formas: PrP<sup>C</sup> – normaliai ląstelėje lokalizuotą izoformą ir PrP<sup>Sc</sup> – infekcinę izoformą. Viena forma nuo kitos skiriasi tik konformacija, aminorūgščių sąstatas abiem atvejais yra vienodas. PrP<sup>C</sup> erdvinė struktūra sudaryta daugiausia iš  $\alpha$ -spiralių ir nedidelio kiekio  $\beta$ -klosčių, o PrP<sup>Sc</sup> priešingai, turi daug  $\beta$ -klosčių ir mažai  $\alpha$ -spiralių (Prusiner, 1998) arba visai jų neturi (Smirnovas et al., 2011). Neseniai vandenilio-deuterio mainų analizė kartu su masių spektrometrija suteikė duomenų apie iš smegenų išskirtų prionų struktūrą, patvirtinančių hipotezę, kad  $\alpha$ -spiralių joje nėra (Diaz-Espinoza and Soto, 2012; Smirnovas et al., 2011). Izoformų savybės žymiai skiriasi. PrP<sup>C</sup> yra monomerinė, proteazėms jautri ir tirpi nejoninėse detergentuose forma. Tuo metu PrP<sup>Sc</sup> forma yra netirpi ir dalinai atspari Proteinizės K poveikiui (Cobb and Surewicz, 2009).

PrP<sup>Sc</sup> paveikus proteazėmis, nuo molekulės N galo nuskeliama  $\sim 67$  aminorūgščių seka susidarant 27-30 kDa fragmentui, žinomam kaip PrP 27-30 (dėl matomo monomero dydžio Western blot tyrimo metu). Tai proteazėms atspari molekulė, sudaryta maždaug iš 142 aminorūgščių. (Cobb and Surewicz, 2009; Colby and Prusiner, 2011; Riesner, 2003). Teigiama, jog N galinis PrP regionas nėra būtinas savarankiškam dauginimuisi (Diaz-Espinoza and Soto, 2012).

Ląstelinė prioninio baltymo forma (susidedanti iš 253 aminorūgščių) koduojama žmogaus 20 chromosomoje (Brown and Mastrianni, 2010; Mehrpour and Codogno, 2010). Baltymo sintezės endoplazminiame tinkle metu atjungiamas 22 aminorūgščių signalinė seka nuo N galo, o prijungiant glikozilfosfatidilinozitolio (GPI) inkarą (per kurį priono baltymas jungiasi prie plazminės membranos išorinio paviršiaus) prie C galo, nuskeliamas 23 aminorūgščių signalinis peptidas (Brown and Mastrianni, 2010). Po visų modifikacijų baltymas sudarytas iš 208 aminorūgščių, žymimas 23-231 (Moore et al., 2009). Vienu metu

ląstelėje galima rasti neglikozilintą, taip pat mono- ir diglikozilintą PrP<sup>C</sup> formas (Mehrpour and Codogno, 2010). Didžiausia baltymo raiška yra neuronuose, tačiau širdyje, plaučiuose, inkstuose, kasoje, sėklidėse, baltuosiuose kraujo kūneliuose ir trombocituose prioninio baltymo raiška taip pat užfiksuota (Brown and Mastrianni, 2010).

Prioninio baltymo funkcija nėra žinoma. PrP<sup>C</sup> priskiriamos funkcijos: atsakingas už sinapsių formavimąsi ir funkcionalumą, suriša ir pateikia ląstelėms varį, veikia kaip apsauga prieš oksidacinį stresą, dalyvauja ląstelių adhezijoje, susijęs su ląstelių žūtimi ir išlikimu (Brown and Mastrianni, 2010; Cobb and Surewicz, 2009; Mehrpour and Codogno, 2010).

Pirminis PrP<sup>C</sup> virtimas patologiniu PrP<sup>Sc</sup> gali vykti spontaniškai, dėl mutacijų arba dėl kontakto su prioniniu infekciniu baltymu. Infekciniam vienetui (branduoliui) susidarius, prasideda grandininė reakcija, kuomet per baltymo-baltymo sąveiką susidaro daugiau patogeninių prioninių baltymų (Brown and Mastrianni, 2010). Laikoma, kad PrP<sup>Sc</sup> yra modelis, pagal kurį PrP<sup>C</sup> virsta PrP<sup>Sc</sup>. Jei infekcinėje izoformoje nėra  $\alpha$ -spiralių, PrP konversija apima viso priono baltymo struktūros persitvarkymą ir naujai pavirtęs baltymas neišsaugo jokio PrP<sup>C</sup> struktūrinio motyvo (Diaz-Espinoza and Soto, 2012).

Rekombinantinio PrP iš daugelio skirtingų rūšių branduolių magnetinio rezonanso (BMR) išspręstos struktūros yra panašios. Visos susideda iš trijų  $\alpha$ -spiralių ir dviejų trumpų antilygiagrečių  $\beta$  klostytų lakštų (1.5 pav.) (Colby and Prusiner, 2011; Moore et al., 2009). Posttransliacinių modifikacijų (glikozilinimo ir GPI) trūkumas yra bendras rekombinantinių priono baltymų bruožas (Cobb and Surewicz, 2009; Colby and Prusiner, 2011). Tačiau lyginant iš smegenų gautų PrP<sup>C</sup> ir rekombinantinių baltymų struktūras, antrinė ir tretinė yra identiškios (Cobb and Surewicz, 2009; Moore et al., 2009).



**1.5 pav.** BMR nustatyta erdvinė pelės prioninio baltymo (121-230) struktūra. 3  $\alpha$ -spiralės nuspalvintos rožine spalva, 2  $\beta$ -klostės – geltonai. Mėlyna spalva pažymėtas disulfidinis tiltelis (PDB ID: 1AG2).

Buvo parodyta, kad priono baltymai sugeba formuoti amiloidines fibriles. Tačiau amiloidinės sankaupos nėra privaloma prioninių ligų ypatybė (Colby and Prusiner, 2011; Legname et al., 2004). Rekombinantinio PrP amiloidinės fibrilės ir PrP<sup>Sc</sup> turi tokių bendrų

savybių, kaip struktūra ir dauginimosi pobūdis prijungiant natyvias prioninio baltymo molekules. Tačiau PrP<sup>Sc</sup> turi ilgesnę proteazėms atsparią dalį (Cobb and Surewicz, 2009).

Rekombinantinio PrP amiloidinės fibrilės susidaro sąlygomis, kurios destabilizuoja ir/arba dalinai išvynioja natyvų PrP, t. y. esant nedideliame denatūrantų kiekiui arba lengvai rūgštiniame pH. Tačiau fibrilės, suformuotos esant 2 M GuHCl, yra geriausiai charakterizuotos (Cobb et al., 2014).

#### 1.1.4. Baltyminis infektyvumas

Žmogus gali susirgti viena iš trijų spongiforminių encefalopatijų rūšių. Pirmiausia spontaniškos, labiausiai paplitusi rūšis, kurios pavyzdys yra CJD. Toliau paveldimos ligos, kurios susijusios su mutacijomis priono baltymo gene ir galiausiai – įgytos ligos, kurios atsiranda užkrėstai medžiagai patekus į organizmą. Kuru (pirmą kartą liga užregistruota 1954 metais Naujojoje Gvinėjoje: sirgo kanibalizmą praktikuojantys žmonės, o tai lėmė ligos plitimą (Diaz-Espinoza and Soto, 2012)) ir variacinė CJD (angl. *variant Creutzfeldt-Jakob disease*) (liga siejama su galvijų spongiformine encefalopatija, užkrėtimas vyksta per kraują) yra tipiniai įgytų prioninių ligų pavyzdžiai (Moore et al., 2009).

Nors dauguma prioninių ligų yra savaiminės, būtent jų infektyvumas sukėlė didelį mokslininkų susidomėjimą (Cobb and Surewicz, 2009). Baltymų infektyvumo hipotezę patvirtino *in vitro* iš rekombinantinio priono baltymo gauta infektyvumu pasižyminti PrP konformacija (Cobb et al., 2014; Colby and Prusiner, 2011; Diaz-Espinoza and Soto, 2012; Wang et al., 2010). PrP<sup>Sc</sup> formavimuisi buvo būtinas ne tik rekombinantinis PrP, bet ir sintetiniai lipidai bei iš pelės kepenų išgryninta RNR. Kofaktorių vaidmuo prionų replikacijoje nėra iki galo žinomas (Diaz-Espinoza and Soto, 2012; Wang et al., 2010). Manoma, kad potencialus infektyvumas būdingas ne tik prionams. Kiti amiloidogeniniai baltymų agregatai gali daugintis tokiu pačiu būdu (Brundin et al., 2010; Kraus et al., 2013; Moore et al., 2009). Eksperimentiškai parodytas kai kurių, su baltymų agregacija susijusių ligų, užkrėtimo mechanizmas PrP pagrindu (Diaz-Espinoza and Soto, 2012; Kraus et al., 2013).

### 1.2. Fibrilių formavimasis *in vivo* ir *in vitro*

Amiloidinių fibrilių susidarymas priklauso nuo skirtingų veiksnių, tokių kaip amino-rūgščių sąstatas ir jų seka, peptido ilgis, baltymo koncentracija ir aplinkos sąlygų: temperatūros, maišymo, pH, joninės jėgos (Harrison et al., 2007) sėklos buvimo ir apdorojimo ultragarsu.

### 1.2.1. Aminorūgščių seka

Daugelis eksperimentinių duomenų rodo, kad aminorūgščių seka arba joje įvykę pakeitimai atsakingi už agregacijos pradžia. Mutagenizės tyrimai atskleidė, kad yra aminorūgščių liekanų, kurios valdo agregaciją. Atrastos netgi specifinės baltymų arba peptidų sritys, kurios linkusios agreguotis. Mokslininkai šiuos regionus apibūdina kaip agregacijai jautrius arba linkusius agreguotis (angl. *aggregation-prone*, *aggregation-susceptible*). Šie atradimai leidžia nuspėti amiloidogeninius baltymus remiantis jų pirmine struktūra (Harrison et al., 2007).

Pirmasis motyvas, vienareikšmiškai vadinamas amiloidogeniniu – tai poliglutamino seka. Hantingtono liga yra geriausiai žinoma tarp kitų susirgimų, susijusių su padidėjusiu CAG trinukleotidų skaičiumi (CAG koduoja glutaminą). Išsivysčius ligai, hantingtono baltymo N gale galima identifikuoti skirtingo ilgio poliglutamino sekas. Manoma, kad įvairios poliaminorūgščių sekos yra linkusios agreguotis (Harrison et al., 2007).

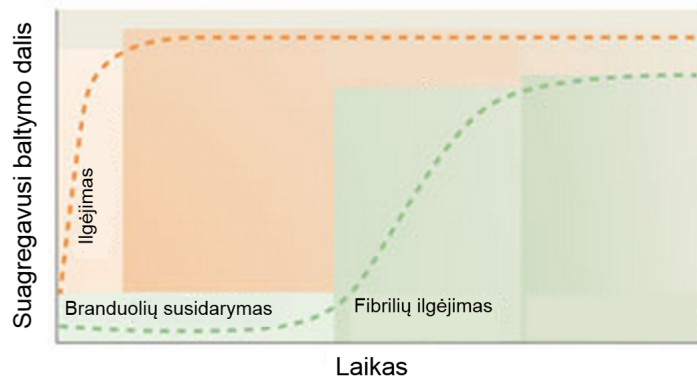
Aminorūgščių šoninių grandinių hidrofobiškumas – tai taip pat svarbus aspektas, kuriuo remiamasi spėjant, ar baltymas linkęs agreguotis, ar ne. Yra įrodymų, kad baltymų sekos evoliucionavo tokia kryptimi, kad būtų išvengta hidrofobinių klasterių (Chiti and Dobson, 2006). Dauguma žinomų amiloidogeninių baltymų turi hidrofobinę sritį (pvz.:  $\alpha$ -sinukleino 71-82 aminorūgštys,  $\beta$ -amiloido 17-21 aminorūgštys). Vykstant mutacijoms baltymų agregacijai jautriose srityse, kurių metu hidrofobinės aminorūgštys keičiamos hidrofobinėmis, susidaro „lipnūs regionai”, kurie asocijuodami sukelia agregaciją (Harrison et al., 2007).

### 1.2.2. Įvairių veiksnių įtaka amiloidinių fibrilių susidarymui

Bandymai su insulinu rodo, jog didėjant baltymo koncentracijai ir joninei jėgai lag fazė trumpėja, o fibrilės ilgėja greičiau. Insulino agregacijai palankūs veiksniai yra: maišymas, žemas pH (Nielsen et al., 2001b).

Amiloidinių fibrilių formavimąsi galima pagreitinti į reakcijos mišinį pridėjus susiformavusių agregatų (toliau sėklos) (1.6 pav.). Įmanoma netgi parinkti tokią sėklos koncentraciją, kad lag fazė visiškai išnyktų. Sėklos pridėjimas sutrumpina laiką, reikalingą branduoliui susidaryti (Ecroyd and Carver, 2008). Tokia agregacija vadinama inicijuota.





**1.6 pav.** Žalia kreivė vaizduoja fibrilių formavimąsi dviem etapais. Kai formuojamas branduolys pasiekia kritinį dydį, prasideda fibrilės ilgėjimas. Oranžinė kreivė vaizuoja lag fazės panaikinimą pridėjus sėklos (pritaikyta iš [Brundin et al. 2010](#)).

Pastebėta, kad sėklos apdorojimas ultragarsu padidina fibrilių galų skaičių, prie kurių galėtų jungtis baltymo monomero molekules, o taip pat homogenizuoja suagregavusį baltymą ([Chatani et al., 2009](#)).

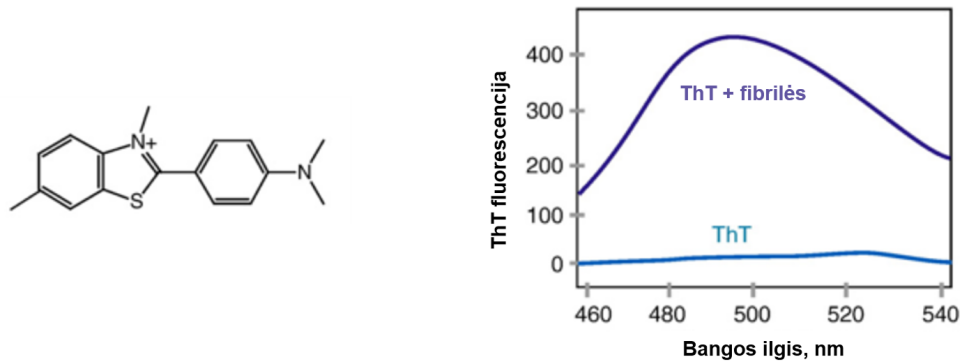
### 1.2.3. Amiloidinių fibrilių ilgėjimo termodinamika

Norint tirti energetinius barjerus, kurie skiria tirpius baltymus nuo fibrilinių jų formų, pirmiausia reikia ištirti temperatūros įtaką fibrilių ilgėjimo greičiui. Mokslininkų grupė iš Kembridžo išnagrinėjo fibrilių ilgėjimo entalpijas tirdama nemažai baltymų ir peptidų. Paaikškėjo, kad tirpaus baltymo virtimo į fibrilizuotą formą energijos barjeras priklauso nuo tretinės struktūros buvimo. Jai esant aktyvacijos entalpija aminorūgščių liekanai yra didesnė. Šią hipotezę patvirtina eksperimentai su žmogaus lizocimu: disulfidinio ryšio redukcija sumažina aktyvacijos entalpiją (daugiau nei 50%). Reikia pažymėti, kad baltymas praranda tretinę struktūrą, kai disulfidinis tiltelis yra suardomas ([Buell et al., 2012](#)).

## 1.3. Tioflavino T fluorescencija

Šiais laikais amiloidines fibriles įmanoma tirti skirtingais metodais, tokiais kaip tyrimas rentgeno spindulių difrakcija (pasikartojančiam  $\beta$ -klostytam motyvui analizuoti), cirkuliarinis dichroizmas (CD) ir Furjė transformacijos infraraudonoji spektroskopija (naudojami amiloidų  $\beta$ -klosčių kiekiui nustatyti), transmisinė elektroninė mikroskopija, atominės jėgos mikroskopija (fibrilių morfologijai nustatyti) bei tyrimas panaudojant fibrilių savybę prisijungti specifinius dažus: Kongo raudonąjį ir Tioflaviną T (ThT) ([Chiti and Dobson, 2006](#); [Maji et al., 2009](#)). Pastarasis tyrimo metodas apžvelgiamas detaliau.

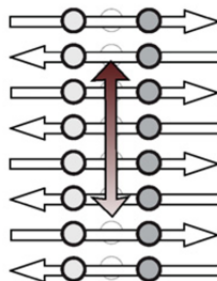
Benzotiazolo dažą Tioflaviną T kaip fluorescencinę žymę diagnozuojant amiloidines fibriles *ex vivo* ir *in vitro* pirmą kartą paminėjo Vassar ir Culling 1959 metais (1.7 pav.) ([Biancalana and Koide, 2010](#); [Khurana et al., 2005](#)).



**1.7 pav.** Kairėje pusėje pateikta ThT cheminė struktūra. Molekulę sudaro hidrofobinė dalis su dimetilamino grupe, kuri prijungta prie fenilo grupės. Ši dalis sujungta su labiau poline benzotiazolo grupe su dviem poliniais atomais: N ir S (Khurana et al., 2005). Dešinėje parodytas ThT fluorescencijos padidėjimas, jam susijungus su amiloidinėmis fibrilėmis (pritaikyta iš Biancalana and Koide 2010).

Junginio tirpumas ir vidutinis giminingumas fibrilėms suteikia privalumą, kurie panaudojami daugelyje eksperimentų (Biancalana and Koide, 2010). Prie fibrilių besijungiančio dažo fluorescencijos padidėjimas dažniausiai naudojamas kinetiniams amiloidų tyrimams.

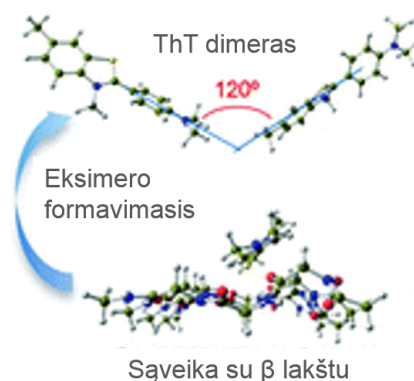
Skirtingų amiloidinių baltymų ir peptidų suformuotų fibrilių pagrindą sudaro antrinė  $\beta$  klostyta struktūra, prie kurios ir jungiasi ThT (Biancalana and Koide, 2010). Vienas iš mechanizmų, aiškinančių ThT sąveiką su amiloidinėmis fibrilėmis, aprašo, jog jungimasis vyksta aminorūgščių šoninių grupių, išsidėsčiusių lygiagrečiai fibrilės ašiai, suformuotų griovelių viduje (1.8 pav.). Laisvoje molekulėje, su maža fluorescencijos kvantine išeiga, kampas tarp benzotiazolo ir benzeno žiedo gali padidėti nuo  $37^\circ$  iki  $90^\circ$ . Būtent molekulėje vykstančio sukimosi apie C-C ryšį slopinimas išlaiko sužadintą būseną, kurios fluorescencija žymiai padidėja (Hudson et al., 2009). Kadangi jungimasis tarp dažo ir amiloidinių fibrilių yra stochiometrinis ir prisotinamas, po reakcijos gautas fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas susidariusių fibrilių kiekiui (Naiki and Gejyo, 1999).



**1.8 pav.** ThT sąveikos su amiloidinėmis fibrilėmis modelis. ThT žymi abipusę rodyklę,  $\beta$  juostas – vienpusės rodyklės, o aminorūgščių šonines grupes – apskritimai (pritaikyta iš Biancalana and Koide 2010).

Neseniai literatūroje atsirado nauja ThT su amiloidais sąveikos hipotezė. Eksperimen-

tinius duomenis derindami su teoriniais skaičiavimais, mokslininkai suformulavo teiginį, kad dažo fluorescencijos pokytį lemia eksimero formavimasis (1.9 pav.). ThT molekulių



**1.9 pav.** Manoma, kad ThT molekulės, formuojančios eksimerus, orientuotos tarpusavyje taip, kad sudaro  $120^\circ$  kampą (pritaikyta iš Sabate et al. 2013).

suformuotų dimerų giminingumas amilodinėms fibrilėms yra 70 kartų didesnis. Dimerai taip pat skatina fluorescencijos padidėjimą. Remiantis sujungtų osciliatorių teorija, dviejų ar daugiau chromoforų artima sąveika sukuria naują molekulę (eksimerą), kuri įgauna naujų savybių: naują energiją ir intensyvumą (Sabate et al., 2013).

## 2. Medžiagos ir metodai

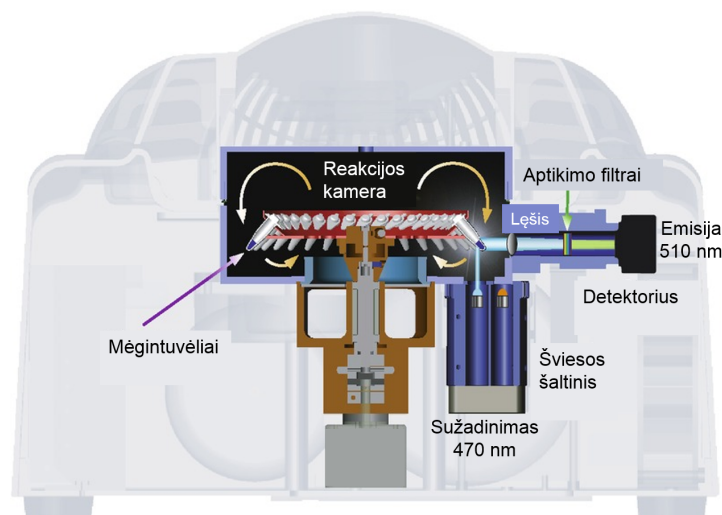
### 2.1. Medžiagos

- Carl Roth:  $\text{CuHCl}$  (99,7%);
- Fisher Scientific:  $\text{NaCl}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$ , uranilacetatas;
- Sigma-Aldrich: rekombinantinis žmogaus insulinas, ThT;
- rMoPrP89-230 gamintas Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Institute. Plazmidės gautos iš prof. W. Surewicz laboratorijos, Case Western Reserve Universitetas, Klyvlendas, JAV.

### 2.2. Metodai

#### 2.2.1. Fluorescencijos matavimas

ThT fluorescencijos priklausomybė nuo laiko buvo stebima naudojant realaus laiko PGR aparatą „Qiagen Rotor-Gene Q“ (2.1 pav.). Sužadinimo bangos ilgis 470 nm, o emisija – 510 nm. Techninės specifikacijos suteikė galimybę prietaisą naudoti ne pagal paskirtį, o būtent agregacijos tyrimams. Eksperimento metu į rotorių patalpinti 36 mėgintuvėliai sukasi 400 aps./min greičiu. Toks greitis reakcijos mišiniui neleidžia garuoti ir palaiko jį mėgintuvėlių apačioje, kur ir matuojama fluorescencija. Šviesos diodas  $470 \pm 10$  nm bangos ilgio šviesa apšviečia mišinį ir detektorius matuoja  $510 \pm 5$  nm bangos ilgio šviesą (Qiagen žiūrėta 2014 03 03). Viso proceso metu palaikoma pastovi temperatūra.



**2.1 pav.** „Qiagen Rotor-Gene Q“ skersinis pjūvis. Įrenginys detektuoja visus 36 mėgintuvėlius per 150 ms.

### 2.2.2. Sėklos gaminimas

Kiekvieno baltymo fibrilės buvo gaminamos skirtingomis sąlygomis.

Insulino amiloidinės fibrilės buvo gaminamos tirpinant 5 mg/ml insuliną 100 mM pH 2 fosfatiniame buferyje (PB) ir inkubuojant MHR 23 termomikseryje 24 valandas esant 60°C temperatūrai ir 300 aps./min.

Pelės priono baltymo amiloidinės fibrilės buvo paruoštos inkubuojant 0,5 mg/ml baltymo tirpalą, pagamintą 50 mM pH 6 PB su 2 M GuHCl. Inkubacija buvo vykdoma IKA KS 4000i purtyklėje 37°C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu 3 dienas.

Norint homogenizuoti suagregavusius baltymus ir padidinti fibrilių galų skaičių, sėkla buvo apdorojama Bandelin Sonoplus 3100 ultragarsiniu homogenizatoriumi ledo vonelėje 10 min, kas 30 s darant 30 s pertrauką, esant 20% amplitudei rMoPrP89-230 amiloidinėms fibrilėms (naudojant MS 72 antgalį), 50% – insulino (naudojant MS 73 antgalį).

### 2.2.3. Sėkla inicijuota insulino agregacija

Į šviežiai paruoštą 5 mg/ml insulino monomero tirpalą (100 mM pH 2 PB su/be 100 mM NaCl) su 50 μM ThT buvo dedama 10% šviežiai homogenizuotos sėklos. Gauti reakcijos tirpalai išpilstomi į 36 mėgintuvėlius (200 μl talpos), po 20 μL į kiekvieną, ir stebima fluorescencija pastovioje 37°C temperatūroje. Kiekvienam atskirai pagamintam insulino fibrilių mėgintuvėliui (5) matavimai pakartoti po 18 kartų.

Kaip papildomas būdas kinetiniams parametrų  $K_M$  ir  $v_{max}$  nustatyti Lineweaver–Burk koordinatėse, buvo paruoštos 4 skirtingos insulino koncentracijos 100 mM pH 2 PB su 50 μM ThT: 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml. Į insulino monomero tirpalus, paruoštus eksperimento atlikimo dieną, buvo dedama 10% šviežiai ultragarsu suardytos sėklos ir stebima fluorescencija pastovioje 37°C temperatūroje. Eksperimentai pakartoti 5 kartus, kiekvieną kartą naudojant atskirai paruoštą sėklos mėgintuvėlį.

### 2.2.4. Priono baltymo fibrilių ilgėjimo kinetikos tyrimai

Buvo ruošiami 0,5 mg/ml rMoPrP89-230 monomero tirpalai 50 mM pH 6 PB su 50 μM ThT ir 5 skirtingomis GuHCl koncentracijomis: 0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M. Į 5 skirtingus tirpalus pridedama po 5% šviežiai ultragarsu suardytos sėklos ir stebima ilgėjimo kinetika skirtingose temperatūrose (40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C) matuojant ThT fluorescenciją. Kiekvienoje temperatūroje bandymai pakartoti po 18 kartų.

### 2.2.5. Mėginių paruošimas elektroninei mikroskopijai

Norint pademonstruoti, jog tikrai susidaro fibriliniai agregatai, 3 μl 20 kartų su dejonizuotu vandeniu praskiesto mėginio buvo užnešami ant anglimi dengtų vario tinklelių ir

30 s dažomi 3  $\mu$ l 2% uranilacetatu. Insulino ir rMoPrP89-230 agregatų vaizdai buvo gauti naudojant FEI Morgagni 268 elektroninį mikroskopą.

### 2.2.6. Baltymo denatūracijos tyrimai

Pelės priono baltymo denatūracija buvo tirta naudojant Jasco J-815 cirkuliarinio dichrozmo spektrometrą. Matavimai buvo atliekami su 2 mm storio kvarcine kiuvete. Eksperimento eigoje temperatūra buvo keliama kas 2,5°C, 1°C per minutę greičiu. Eksperimentai buvo atliekami su 0,05 mg/ml baltymo koncentracija 50 mM pH 6 PB ir įvairiais GuHCl kiekiais. Kiekvienai temperatūrai 10 CD spektrų prie 221-223 nm šviesos buvo vidurkinami.

Stebimi eksperimentinių duomenų vienetai buvo perskaičiuojami į molinio eliptiškumo vienetus:

$$[\theta] = \frac{\theta_s M}{10cln} \quad (4)$$

čia  $[\theta]$  yra apskaičiuoti molinio eliptiškumo vienetai ( $^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$ , angl. *deg-cm<sup>2</sup>/dmol*),  $\theta_s$  – stebimi CD vienetai (mililaipsniais, angl. *millidegrees*),  $M$  – baltymo molinė masė (g/mol),  $c$  – baltymo koncentracija (mg/ml),  $l$  – kiuvetės ilgis (cm),  $n$  – baltymą sudarančių aminorūgščių skaičius.

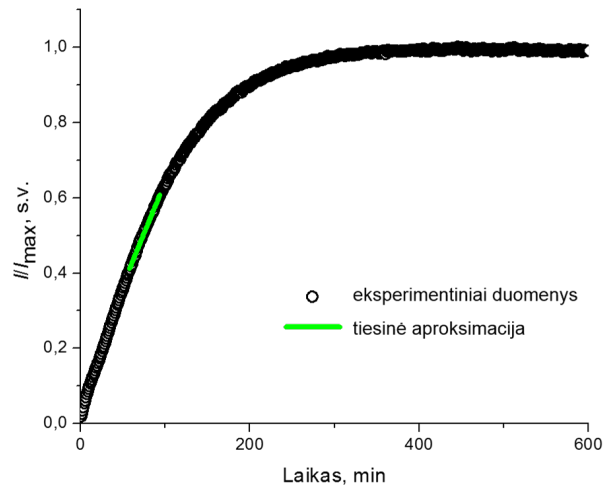
### 2.2.7. PrP fibrilių stabilumo tyrimai

0,5 mg/ml priono baltymo fibrilių mėginys centrifuguojamas 20 min 16000 x g naudojant Technico Maxi mikrocentrifugą. Atskyrus fibriles nuo buferio, kuriame jos susidarė, supernatantas pašalinamas, o fibrilės suspenduojamos 50 mM PB (pH 6) su 0,5 M GuHCl. Norint homogenizuoti gautą mišinį, fibrilės buvo apdorojamos ultragarsiniu homogenizatoriumi ledo vonelėje 10 min (30 s/30 s ultragarsinimo/poilsio ciklai ir 20% amplitudė) naudojant MS 72 antgalį. 1 tūris paruošto pavyzdžio buvo maišomas su 4 tūriais buferio su skirtinga GuHCl koncentracija, kad gautume eilę mėginių su galutine denatūrant koncentracija nuo 0,5 M iki 6,25 M. Gauti mėginiai buvo valandą inkubuojami 25°C arba 60°C temperatūroje. Toliau kiekvienas iš mėginių buvo maišomas su 50  $\mu$ M ThT tirpalu santykiu 1:20. Tiriamų bandinių ThT fluorescencija buvo matuojama 480 nm bangos ilgio šviesoje (sužadinimo bangos ilgis 440 nm). Tyrimai buvo atliekami su 1 cm storio kvarcine kiuvete naudojant Varian Cary Eclipse fluorescencijos spektrofotometrą. Bandymai pakartoti 12 kartų 25°C temperatūroje ir 8 kartus 60°C temperatūroje.

### 2.2.8. Duomenų apdorojimas

Gautos fluorescencijos kreivės buvo normalizuojamos kiekvieną tašką dalinant iš didžiausios intensyvumo reikšmės kreivėje.

Reakcijos su rMoPrP89-230 greičiai buvo nustatyti panaudojant tiesinę aproksimaciją tarp 0,4 ir 0,6 intensyvumo nuo kreivės maksimumo (2.2 pav.). 6 pakartojimų standartinės paklaidos buvo skaičiuojamos naudojant Stjudento t-skirstinį su 0,95 patikimumo lygmeniu.



**2.2 pav.** 0,5 mg/ml priono baltymo tirpalas 50 mM pH6 PB su 2 M GuHCl. Bandymas atliktas 50°C temperatūroje su 5% sėklos.

Fibrilių ilgėjimo aktyvacijos energijos buvo apskaičiuotos naudojant Arrhenius koordinatėse išdėstytus reakcijų greičius (reakcijos greičio konstanta tiesiškai priklauso nuo temperatūros). Aktyvacijos energiją galima gauti iš lygties:

$$E_a = -xR \quad (5)$$

kur  $x$  – tiesės nuolinkio koeficientas,  $E_a$  – reakcijos aktyvacijos energija ir  $R$  – universalioji dujų konstanta.

Duomenys, gauti tiriant PrP fibrilių stabilumą, buvo aproksimuojami naudojant dviejų būsenų depolimerizacijos modelį (angl. *a two state depolymerization model*). Pusiausvyros konstanta  $K$ , kai kiekviena baltymo molekulė egzistuoja arba monomero arba fibrilės būsenoje, išreiškiama:

$$K = \frac{1 - f_f}{f_f} \quad (6)$$

kur  $f_f$  yra fibrilių dalis. Jei depolimerizacijos laisvoji energija  $\Delta G_d$  tiesiškai priklauso nuo denatūrantų koncentracijos

$$\Delta G_d = \Delta G_{H_2O} + m[D] \quad (7)$$

tai naudojantis sąryšiu su pusiausvyros konstanta

$$\Delta G_d = -RT \ln K \quad (8)$$

įmanoma gauti fibrilių dalies priklausomybę nuo GuHCl koncentracijos

$$f_f = \frac{1}{e^{-(\Delta G_{H_2O} + m[D])/(RT)} + 1} \quad (9)$$

Pakartotų eksperimentų standartinės paklaidos buvo skaičiuojamos naudojant Stjudento t-skirstinį su 0,95 patikimumo lygmeniu (Milto et al., 2014).

Insulino kinetinės kreivės apdorotos darant prielaidą, jog ThT fluorescencijos kreivės atspindi fibrilių masės pokytį per tam tikrą laiką. Lygtis, pagal kurią buvo aproksimuoti matavimo duomenys, yra:

$$F_{t+i} = F_t + \frac{v_{max}(M_b - F_t)}{K_M + (M_b - F_t)}i \quad (10)$$

kur  $F_t$  yra fibrilizuoto baltymo koncentracija laike  $t$ ,  $F_{t+i}$  – fibrilizuoto baltymo koncentracija laike  $t + i$ ,  $i$  – iteracijos laiko intervalas ir  $M_b$  – bendra baltymo koncentracija.

4 konstantos ( $v_{max}$ ,  $K_M$ ,  $F_0$ ,  $M_b$ ) gali būti suskaičiuotos panaudojant mažiausių kvadratų metodą. Modelio panaudojimas pateikia konstantų išraiškas sutartiniuose vienetuose. Kadangi  $M_b$  yra žinoma (5 mg/ml), kitos konstantos gali būti suskaičiuotos panaudojant proporciją.

Papildomai  $K_M$  ir  $v_{max}$  reikšmės bandytos nustatyti kitu metodu – pritaikant Lineweaver–Burk koordinatas. Taip gaunama linijinė  $1/v$  priklausomybė nuo  $1/c$ . Abscisių ašyje tiesė susikerta taške, atitinkančiame  $-1/K_M$ , o ordinačių ašyje – taške  $1/v_{max}$ .

Visi gauti duomenys apdoroti naudojant Origin 8 programinę įrangą.

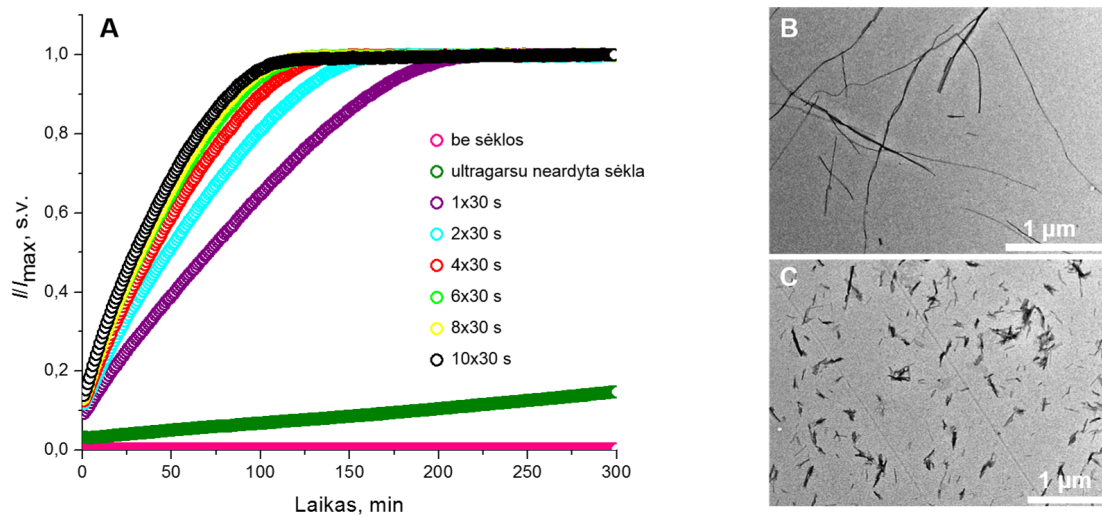


### 3. Eksperimentų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Michaelio-Menten modelio pritaikymas amiloidinių fibrilių ilgėjimui aprašyti

##### 3.1.1. Ultragarso dezintegratoriaus panaudojimas eksperimentuose su insulinu

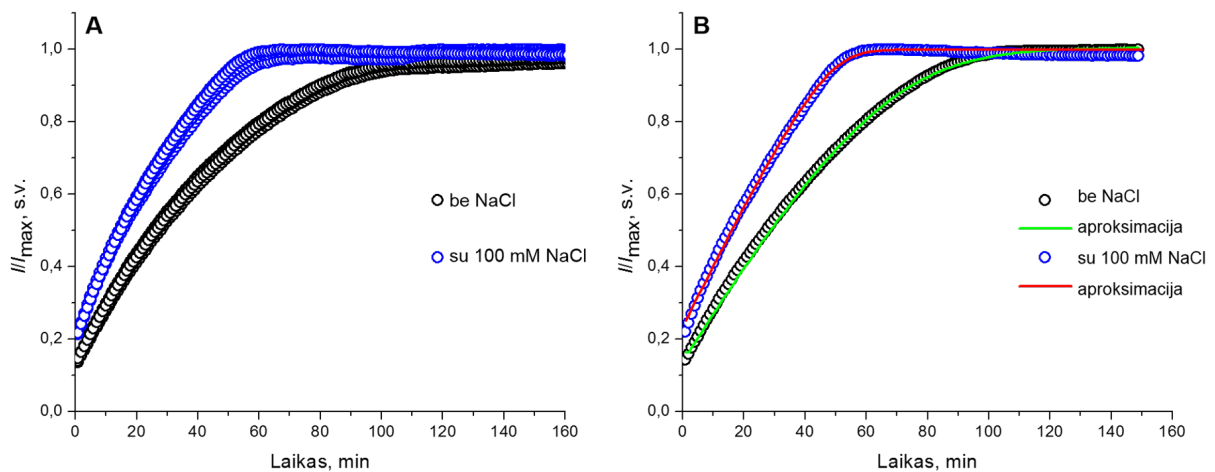
Darbo pradžioje ThT fluorescencijos matavimo metodu buvo ištirta ultragarso įtaka eksperimentams su rekombinantinio žmogaus insulino sėkla. Gauti rezultatai pateikti 3.1 paveiksle. Gautos insulino ThT fluorescencijos kreivės byloja, kad sėklos apdorojimas ultragarsu turi didelį poveikį fibrilių ilgėjimo greičiui. Pirmiausiai matyti, kad tokiomis sąlygomis nėra spontaninės agregacijos. Tai įrodo eksperimentas, kai į baltymo monomero tirpalą nebuvo pridėta fibrilių (3.1 pav. A grafiko rožinė kreivė). Gauti duomenys aiškiai parodo, kad naudojant ultragarsu nesuardytas fibriles kaip sėklą, agregacija vyksta lėčiau. Ardymo ultragarsu laikas taip pat svarbus reakcijos greičiui, tačiau kiekvienos papildomos 30 s yra mažiau efektyvios, galbūt dėl to, kad trumpesnės fibrilės yra mechaniškai stabilesnės. Tolimesniems eksperimentams su insulinu nuspręsta naudoti po 10 trisdešimties sekundžių ciklą.



**3.1 pav.** Ultragarso įtaka sėkla inicijuotai fibrilizacijai pateikta A grafike. Prieš paruoštų insulino fibrilių panaudojimą kaip sėklą buvo naudojami skirtingi 30 s pulsų kiekiai fibrilėms fragmentuoti. Fibrilių ilgėjimo kinetika stebima matuojant ThT fluorescenciją 37°C temperatūroje. Dešinėje pateiktos elektroniniu mikroskopu gautos nuotraukos: insulino fibrilės prieš (B) ir po (C) dešimties 30 s trukmės ultragarso pulso. Mastelis pažymėtas baltu brūkšneliu.

### 3.1.2. Insulino fibrilių ilgėjimo kinetiniai tyrimai

Eksperimentinių duomenų aproksimacijai pagal Michaelio-Menten modelį patikrinti sėkla inicijuota insulino agregacija buvo taip pat stebima matuojant ThT fluorescenciją. Pirmiausia buvo padaryta daug pakartojimų su atskirai paruoštais sėklų mėgintuvėliais. Yra žinoma, kad NaCl buvimas turi įtakos amiloidų kinetikai (Nielsen et al., 2001b). Tam, kad papildomai patikrintume, ar siūlomas modelis atitinka eksperimentinius duomenis, buvo leidžiama daug pakartojimų su sėkla, į monomero tirpalą pridėjus 100 mM NaCl. Normalizavus pirmines ThT fluorescencijos kreives, joms buvo pritaikyta (10) lygtis. 3.2 paveiksle esantys grafikai rodo, kad Michaelio-Menten modelis gerai atitinka gautąsias kreives. Nors eksperimentinės kreivės su NaCl buvo blogesnės kokybės (kai ThT fluorescencija jau nebekito, buvo matyti eksperimentinių taškų žemėjimas), gauta pakankamai geros kokybės aproksimacija. Koreliacijos stiprumą parodo taškų koreguotas determinacijos koeficientas  $\bar{R}^2 > 0,996$ . Palyginimui modelio ir eksperimentinių taškų be druskos  $\bar{R}^2 > 0,999$ . Iš gautų duomenų matyti, kad druskos buvimas paspartina procesą. A grafike pavaizduotų pakartojimų rezultatai rodo, kad duomenų išsibarstymas yra minimalus. Reikia pažymėti, kad grafike vaizduojami rezultatai naudojant vieną sėklos mėgintuvėlį.



**3.2 pav.** A grafike pateiktos vieno bandymo visos 36 kreivės: 18 pakartojimų be NaCl ir 18 pakartojimų su 100 mM NaCl. B grafike pavaizduotos abiejų atvejų – be ir su druska kreivės ir jų aproksimacija pagal Michaelio-Menten modelį.

Abiem atvejais – kai insulino monomero baltymo molekulės ištirpintos 100 mM fosfatiniame buferyje pH 2 ir tame pačiame buferyje su 100 mM NaCl – 5 bandymų  $K_M$  ir  $v_{max}$  vertės pateiktos 3.1 lentelėje. Nors kiekvieno bandymo pakartojimų kreivėms nepriklausomai buvo pritaikytas Michaelio-Menten modelis, čia pateikiami bandymų vidurkių rezultatai.

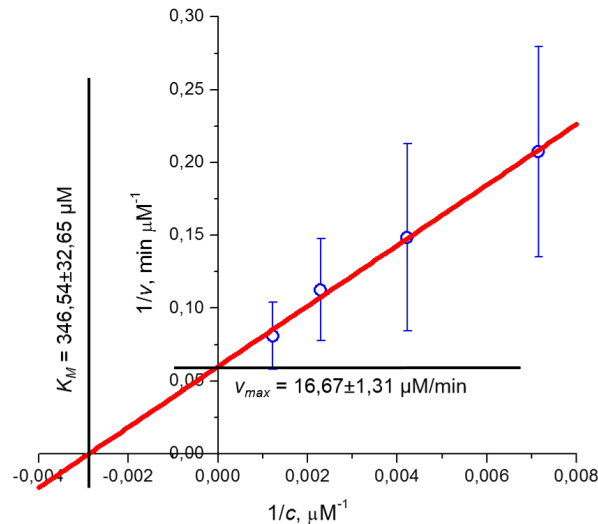
**3.1 lentelė.** Gautos  $K_M$  ir  $v_{max}$  reikšmės

bandymas	be NaCl		su 100 mM NaCl	
	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$v_{max}$ [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$v_{max}$ [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]
1	$327,19 \pm 4,83^a$	$21,99 \pm 0,22$	$97,12 \pm 4,63$	$19,96 \pm 0,34$
2	$256,90 \pm 13,55$	$11,54 \pm 0,23$	$58,39 \pm 1,65$	$12,97 \pm 0,19$
3	$246,20 \pm 7,22$	$15,71 \pm 0,24$	$58,09 \pm 4,44$	$14,71 \pm 0,14$
4	$432,09 \pm 21,98$	$20,50 \pm 0,65$	$182,93 \pm 8,55$	$20,27 \pm 0,49$
5	$242,87 \pm 6,05$	$15,38 \pm 0,18$	$71,41 \pm 2,18$	$16,08 \pm 0,29$
vidurkis	$301,05 \pm 100,49$	$17,02 \pm 5,24$	$93,59 \pm 65,07$	$16,80 \pm 4,00$

<sup>a</sup> Lentelėje pateiktų duomenų standartinės paklaidos buvo skaičiuojamos naudojant Studento t-skirstinį su 0,95 patikimumo lygmeniu.

Reikia atkreipti dėmesį, kad skaičiavimuose buvo naudojama molinė insulino koncentracija (5 mg/ml atitinka 860,88  $\mu\text{M}$ ). Lyginant visus 5 bandymus su atskirai paruošta sėkla, matyti  $v_{max}$  verčių išsibarstymas. Tai galima paaiškinti nevienodų galų skaičiumi sėklos mėgintuvėliuose kiekvieno atskiro bandymo metu. Nors apdorojimas ultragarsu padeda homogenizuoti sėklos tirpalą, fibrilių ilgiai ir kiekiai gali skirtis. Be to, po ardymo fibrilės linkusios artėti viena prie kitos (3.1 pav.), o tai gali būti papildomas veiksnys, lemiantis skirtumus tarp pakartojimų.  $K_M$  verčių barstymąsi paaiškinti daug sunkiau. Rezultatai demonstruoja, kad druskos buvimas tirpale neturi įtakos  $v_{max}$  lyginant su greičiais, kai buferyje druskos nebuvo. Tai reiškia, kad joninė jėga visiškai neveikia FM komplekso virtimo į ilgesnes fibriles greičio. Tirpale esant 100 mM NaCl, pusiausvyra pastumta FM komplekso formavimosi kryptimi. Apie tai byloja  $\sim 3$  kartus sumažėjusi  $K_M$ . Žemame pH insulinas egzistuoja kaip teigiamai įkrautos molekulės. Tokia būseną nėra palanki sąveikai monomeras-fibrilė. Didinant joninę jėgą mažinama krūvio įtaka ir monomero-fibrilės asociacijos dažnis padidėja.

Norint papildomai nustatyti  $K_M$  ir  $v_{max}$  reikšmes, toks pat sėklos kiekis buvo įdėtas į 4 skirtingas insulino monomero koncentracijas. Bandymo metu gauti taškai buvo pažymėti Lineweaver-Burk koordinatėse (3.3 pav.), per juos nubraižyta tiesė, kertanti koordinatinių ašis. Iš tiesės susikirtimo su X ir Y ašimis vietų atitinkamai apskaičiuojamos  $K_M$  ir  $v_{max}$  reikšmės. Šiuo metodu gauti kinetiniai parametrai yra labai panašūs į parametrus, gautus aproksimuojant kreives pagal Michaelio-Menten modelį.

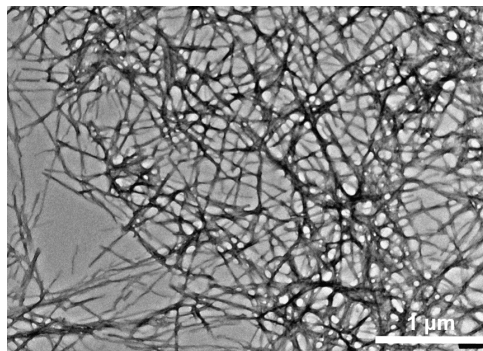


**3.3 pav.** Fibrilių ilgėjimo greičio priklausomybė nuo insulino koncentracijos Lineweaver–Burk koordinatėse.  $\bar{R}^2=0,992$ . Eksperimento metu gauti taškai pažymėti mėlyna spalva, tiesinė taškų aproksimacija – raudona spalva.

## 3.2. Aplinkos veiksnių įtaka priono fibrilių ilgėjimui

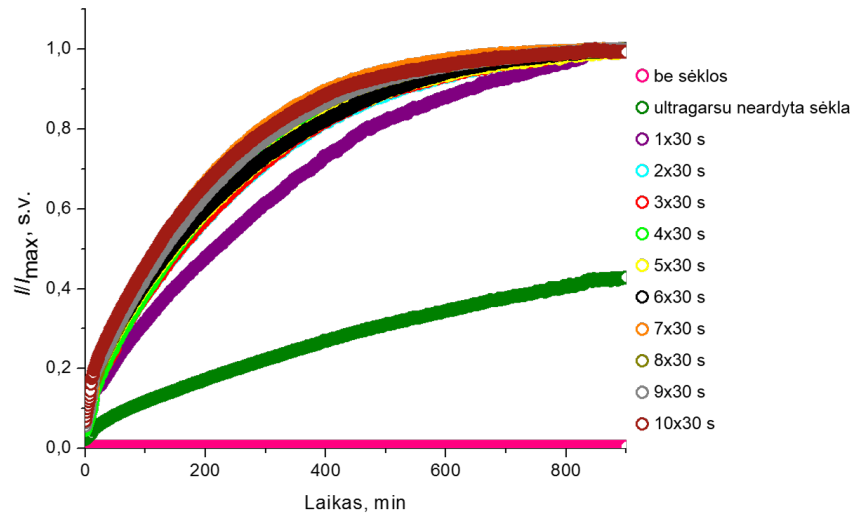
### 3.2.1. Ultragarso dezintegratoriaus panaudojimas eksperimentuose su pelės priono baltymu

Darbo pradžioje rMoPrP89-230 fibrilių buvimas buvo įrodytas padarius nuotrauką elektroniniu mikroskopu (3.4 pav.).



**3.4 pav.** Pelės priono baltymo suformuotų fibrilių TEM vaizdas. Baltas brūkšnelis žymi mastelį.

Toliau ThT fluorescencijos matavimo metodu, kaip ir insulino atveju (3.1.1), buvo iširta ultragarso įtaka eksperimentams su sėkla (3.5 pav.). Insulino amiloidinėms fibrilėms ardyti naudotus parametrus bandyta optimizuoti ir priono baltymų fibrilėms ardyti. Nustatyta, jog prionų fibrilėms suardyti reikia mažiau energijos nei insulino fibrilėms (energijos kiekis perduodamas prionų fibrilėms per ciklą  $\sim 0,36$  kJ, o insulino fibrilėms  $\sim 0,56$  kJ).

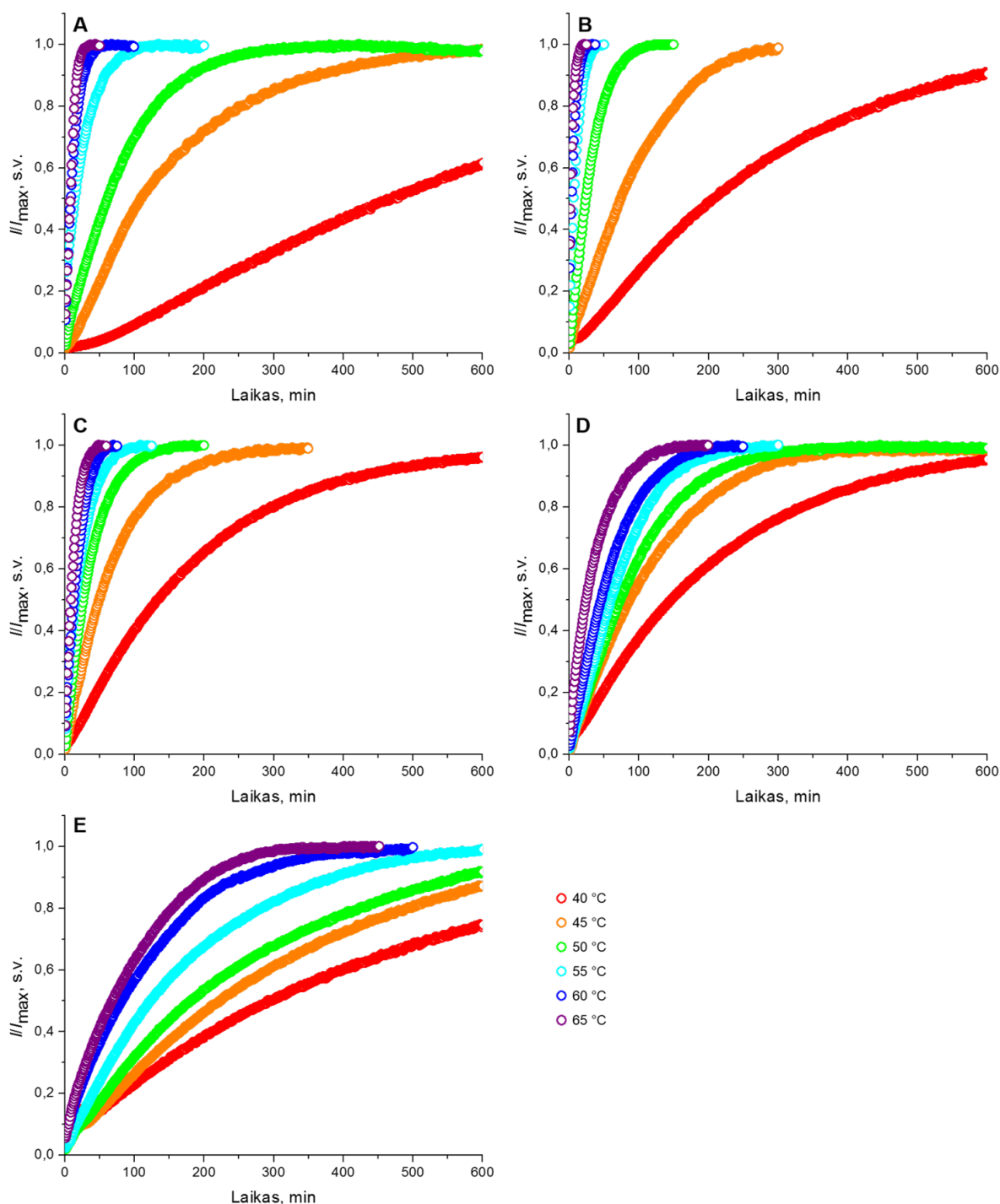


**3.5 pav.** rMoPrP89-230 fibrilių ilgėjimo kinetikos priklausomybė nuo apdorojimo ultragarsu laiko. Eksperimentas atliktas 37°C temperatūroje 50 mM pH 6 PB su 2 M GuHCl. Buvo pridėta 5% sėklos.

Iš 3.5 grafike pateiktų duomenų aiškiai matyti, kad į baltymo monomero tirpalą nepridėjus fibrilių agregacija nestebima. Tai rodo, kad, kaip ir insulino atveju, tokiomis sąlygomis spontaninė agregacija nevyksta. Suskaldytos fibrilės padidina reakcijos greitį, lyginant su ultragarsu neapdorotomis fibrilėmis. Agregacijos greitis šiek tiek priklauso nuo ardymo laiko, tačiau didinant ciklų skaičių priklausomybė mažėja. Ilgas (10 min) ultragarsinimas yra pats efektyviausias, o trumpos fibrilės yra geriausia sėkla. Visiems tolimesniems tyrimams su rMoPrP89-230 nuspręsta naudoti 10 min ultragarsinimą (30 s/30 s ultragarsinimo/poilsio ciklai). Ultragarsu apdoroti fibriliniai agregatai esant sąlygoms, kuriomis nestebimi antrinės nukleacijos procesai, suteikė galimybę stebėti ir tirti fibrilių ilgėjimo fazę.

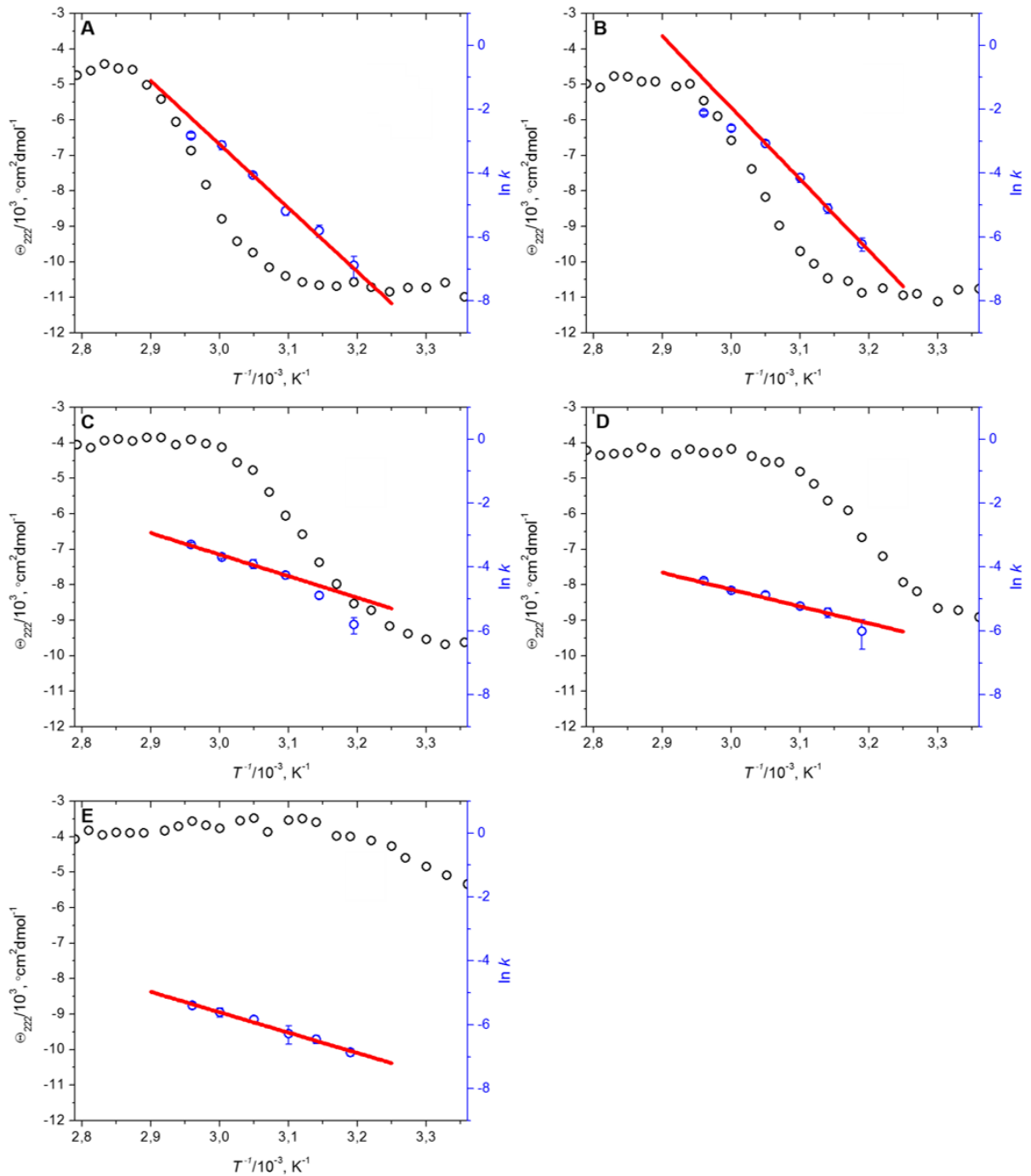
### 3.2.2. Temperatūros ir denatūrantų koncentracijos įtaka fibrilių ilgėjimo kinetikai

Aplinkos veiksnių (temperatūros, denatūrantų koncentracijos) poveikį fibrilių ilgėjimui iširti agregacijos kinetika buvo stebima skirtingose temperatūrose su 5 skirtingomis GuHCl koncentracijomis. 3.6 paveikslėlyje pateikti gauti rezultatai. Didinant temperatūrą, reakcija visais atvejais pagreitėja. Greičio priklausomybė nuo GuHCl koncentracijos yra sudėtingesnė. 65°C ir 60°C temperatūrose greičiai mažėja tirpale esant 1 M, 0,5 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M GuHCl atitinkamai. 55°C ir 50°C temperatūrose greičio mažėjimo tvarka esant skirtingai denatūrantų koncentracijai pasikeičia: 1 M, 1,5 M, 0,5 M, 2 M, 2,5 M GuHCl atitinkamai. Esant 45°C temperatūrai greičių išsidėstymas atrodo taip: 1,5 M, 1 M, 2 M, 0,5 M, 2,5 M GuHCl. Žemiausioje temperatūroje (40°C) reakcijos greičiai mažėja tokia tvarka: 1,5 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 2,5 M GuHCl. Nagrinėjant grafikus matyti, kad GuHCl koncentracija turi įtakos fibrilių ilgėjimo energetiniam barjerui.



**3.6 pav.** rMoPrP89-230 agregacijos kinetika skirtingose temperatūrose su skirtingomis GuHCl koncentracijomis: 0,5 M (A grafikas), 1 M (B grafikas), 1,5 M (C grafikas), 2 M (D grafikas), 2,5 M (E grafikas). Bandymai atlikti 50 mM pH 6 PB su 5% sėklos.

Procesų aktyvacijos energijai rasti iš eksperimentinių duomenų gauti reakcijų greičiai skirtingose temperatūrose esant skirtingai GuHCl koncentracijai atidedami Arrhenius koordinatėse. Šalia parodytos rMoPrP89-230 denatūracijos kreivės, gautos iš CD spektrų atitinkamose GuHCl koncentracijose (3.7 pav.).



**3.7 pav.** Reakcijų greičių Arrhenius koordinatėse (mėlyni apskritimai) palyginimas su denatūracijos kreivėmis (juodi apskritimai): 0,5 M (A grafikas), 1 M (B grafikas), 1,5 M (C grafikas), 2 M (D grafikas), 2,5 M (E grafikas) GuHCl. Raudona kreivė žymi tiesinę reakcijų greičių aproksimaciją.

Kai GuHCl koncentracija mėginiuose buvo mažiausia, t. y. 0,5 M (A grafikas), reakcijos greičiai nuo 40°C iki 60°C tiesiškai priklauso nuo temperatūros. Baltymo denatūracijos kreivė šiuo atveju rodo, kad 40°C-60°C temperatūros intervale daugiau negu pusė baltymo yra natyvioje būsenoje. Didėjant temperatūrai, dauguma baltymo yra išlankstytos formos, dėl to nėra tiesinės priklausomybės. Esant 1 M GuHCl (B grafikas), rMoPrP89-230

pradedama išsilankstyti žemesnėje temperatūroje, lyginant su A grafiku. Šiuo atveju tiesinė greičio priklausomybė nuo temperatūros yra nuo 40°C iki 55°C. Mėginiuose esant 1,5 M GuHCl, didžioji baltymo dalis yra praradusi erdvinę struktūrą 50°C-65°C temperatūros intervale ir būtent šiose temperatūrose matoma tiesinė greičių priklausomybė (C grafikas). D grafike tiesę pavyko gauti iš 5 temperatūros taškų. E grafike, kai denatūrantų koncentracija didžiausia (2,5 M), baltymas yra visiškai išsivyniojęs. Visi gauti reakcijos greičiai tiesiškai priklauso nuo tirtų temperatūrų.

Remiantis šiais duomenimis pavyko apskaičiuoti aktyvacijos energijas dviem skirtingiems procesams: fibrilių ilgėjimui prijungiant natyvias baltymo molekules ir fibrilizacijai panaudojant erdvinę struktūrą praradusį baltymą. Pirmą procesą aprašo 3.7 paveikslėlio A ir B grafikai, o antrąjį – C, D ir E grafikai.  $E_a$  buvo apskaičiuotos pagal 5 lygtį. Rezultatai pateikiami 3.2 lentelėje. Apibendrinant galima teigti, jog fibrilių ilgėjimo prijungiant natyvias PrP molekules energijos barjeras yra daug didesnis ( $\sim 170$  kJ/mol), lyginant su reakcija, kai fibrilės ilgėja prijungdamos išsivyniojusio baltymo molekules ( $\sim 50$  kJ/mol).

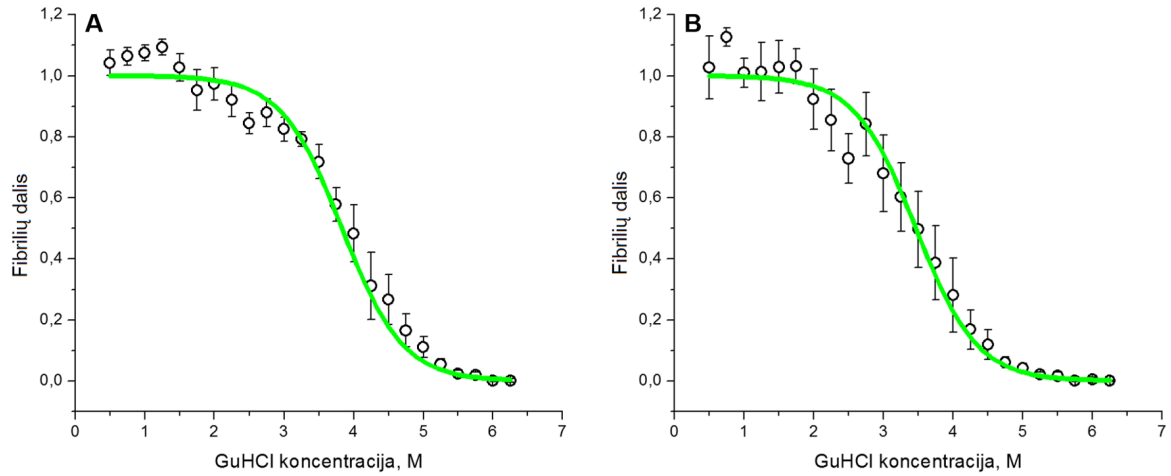
**3.2 lentelė.** Apskaičiuotos aktyvacijos energijos ( $E_a$ )

GuHCl, M	$E_a$ , kJ/mol	3.7 paveikslėlio grafikas (A-E)
0,5	165,8 ± 10,0	A
1	177,5 ± 3,3	B
1,5	58,3 ± 6,3	C
2	44,4 ± 4,9	D
2,5	51,4 ± 2,6	E

$E_a$  reikalingos fibrilių ilgėjimui prijungiant natyvias PrP molekules, arba nestruktūrizuotą baltymą pažymėtos atitinkamai **tamsiai raudona** ir **oranžine** spalvomis.

Buvo išmatuotas fibrilių stabilumas skirtingose temperatūrose ir esant skirtingoms denatūrantų koncentracijoms (3.8 pav.). Lyginant abiejose temperatūrose atliktus bandymus, 25°C temperatūroje (A grafikas) fibrilės yra stabilesnės. Tačiau net ir 60°C temperatūroje (B grafikas) fibrilėms esant iki 2 M GuHCl aplinkoje, jos išlieka pakankamai stabilios (esant 2 M GuHCl, ThT fluorescencija sumažėja mažiau nei 4%). Kadangi priemonių fibrilių ilgėjimas buvo stebimas esant 2,5 M GuHCl, stabilumas šioje denatūrantų koncentracijoje irgi svarbus. Iš grafikų matyti, kad esant šiai GuHCl koncentracijai, 25°C temperatūroje ThT fluorescencija sumažėja  $\sim 5\%$ , o 60°C temperatūroje  $\sim 11\%$ . Reiškia, greičio matavimo paklaidos aukštoje temperatūroje galėtų būti iki 11% didesnės, bet tai neturi įtakos išvadoms.





**3.8 pav.** rMoPrP89-230 amiloidinių fibrilių stabilumą palyginimas, esant skirtingai temperatūrai: A – 25°C, B – 60°C. Eksperimentinius taškus vaizduoja juodi rutuliukai, o dviejų būsenų depolimerizacijos modelį – žalia kreivė.

## 4. Išvados

1. Ištyrus fibrilių ilgėjimo kinetikos priklausomybę nuo ultragarsinio apdorojimo laiko nustatyta, kad reakcijos greitis priklauso nuo ardymo laiko, tačiau kiekvienas papildomas ardymo ciklas šią priklausomybę mažina.
2. Parodyta, kad Michaelio-Menten modelis, pagal kurį aproksimuoti eksperimentiniai duomenys (kai reakcijos metu nevyksta pirminė ir antrinė nukleacija), puikiai tinka insulino fibrilių ilgėjimui aprašyti.
3. Pavyko atskirti ir apskaičiuoti dviejų procesų aktyvacijos energijas. Priono baltymo fibrilės gali ilgėti prijungdamos struktūrizuotą arba išlankstytą PrP monomerą. Pastarosios reakcijos aktyvacijos energija yra daug mažesnė, lyginant su energija, reikalinga prijungti natyvias PrP molekules.
4. Iš fibrilių stabilumo tyrimų nustatyta, kad amiloidinės fibrilės yra stabilios, kai tirpale yra iki 2,5 M GuHCl. Temperatūra fibrilių stabilumui įtakos beveik neturi.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
CHEMIJOS FAKULTETAS  
BIOCHEMIJOS IR MOLEKULINĖS BIOLOGIJOS KATEDRA

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė  
Katažyna MILTO

BAIGIAMASIS BAKALAURO DARBAS

---

AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ ILGĖJIMO KINETIKA IR  
TERMODINAMIKA

---

SANTRAUKA

Amiloidų sankaupos siejamos su daugeliu neurodegeneracinių ligų. Tokių agregatų susidarymo pagrindas yra amiloidinių fibrilių ilgėjimas.

Šiame darbe buvo tiriamas dviejų baltymų: rekombinantinio žmogaus insulino ir rekombinantinio pelės priono baltymo amiloidinių fibrilių ilgėjimas. Sėkla inicijuotos agregacijos kinetika buvo stebima matuojant Thioflavino T fluorescenciją. Baltymo denatūracija buvo tirta naudojant cirkuliarinį dichroizmą.

Buvo parodyta, kad gautiems insulino fibrilių ilgėjimo eksperimentiniams duomenims aprašyti gali būti pritaikytas Michaelio-Menten fermentų kinetikos modelis. Priono baltymo fibrilių ilgėjimo tyrimų metu skirtingose temperatūrose su skirtinga denatūrantų koncentracija pastebėta, kad fibrilės gali ilgėti prijungdamos tiek išsivyniojusio, tiek struktūrizuoto PrP monomero molekules.

VILNIUS, 2014

VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF CHEMISTRY  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

IVth year student of Biochemistry BSc  
Katažyna MILTO

BACHELOR THESIS

---

KINETICS AND THERMODYNAMICS OF AMYLOID-LIKE  
FIBRIL ELONGATION

---

SUMMARY

Amyloid deposition is an event characteristic for a range of fatal neurodegenerative disorders. The main driving force of formation of such deposits is fibril elongation.

In this work the amyloid-like fibril elongation of two proteins (recombinant human insulin and recombinant murine prion protein) was studied. Seeded fibrillation kinetics at quiescent condition was followed using Thioflavin T fluorescence assay. Circular dichroism was used to monitor thermal denaturation curves.

It was demonstrated that obtained experimental data of insulin fibril elongation could be described by Michaelis-Menten enzyme kinetics. The study of prion fibril elongation at a range of temperature and different denaturant concentrations revealed that fibril growth could occur by unfolded and folded PrP monomers addition.

VILNIUS, 2014

## Mokslinių darbų sąrašas

### Mokslinės publikacijos:

1. Milto K, Botyriūtė A, Smirnovas V. Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics. *PLoS One*, 2013 8(7):e68684.
2. Milto K, Michailova K, Smirnovas V. Elongation of Mouse Prion Protein Amyloid-Like Fibrils: Effect of Temperature and Denaturant Concentration. *PLoS One*, 2014 9(4):e94469.

### Mokslinių pranešimų tezės:

1. 2012 *Birželis*. Žodinis pranešimas „Insulino agregacijos tarprūšinės pernašos tyrimas“, LMT STUDENTŲ MOKSLINIŲ TYRIMŲ KONFERENCIJA, Vilnius, Lietuva.
2. 2013 *Kovas*. Stendinis pranešimas „Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics“, TARPTAUTINĖ STUDENTŲ MOKSLINĖ KONFERENCIJA „OPEN READINGS“, Vilnius, Lietuva.
3. 2013 *Balandis*. Stendinio pranešimo bendraautorė „Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics“, PROTEIN MISFOLDING IN DISEASE: MOLECULAR PROCESSES AND TRANSLATIONAL RESEARCH TOWARD THERAPY, Roscoff, Prancūzija.
4. 2013 *Gegužė*. Žodinis pranešimas „Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics“, II INTERNATIONAL CONFERENCE OF BIOPHYSICS STUDENTS, Kraków, Lenkija.
5. 2013 *Birželis*. Stendinis pranešimas „Elongation thermodynamics of murine prion fibrils“, MOLECULAR MECHANISM AND PHYSIOLOGICAL CONSEQUENCES OF PROTEIN AGGREGATION, Big Sky, Montana, JAV.
6. 2013 *Lapkritis*. Stendinio pranešimo bendraautorė „Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics“, 4TH SCANDINAVIAN MEETING ON AMYLOID PROTEINS AND DISEASE, Lund, Švedija.
7. 2014 *Vasaris*. Stendinio pranešimo bendraautorė „Elongation of murine prion protein amyloid-like fibrils: effect of temperature and denaturant concentration“, BIOPHYSICAL SOCIETY 58TH ANNUAL MEETING, San Fransico, California, JAV.
8. 2014 *Kovas*. Stendinis pranešimas „Elongation of mouse prion protein amyloid-like fibrils: effect of temperature and denaturant concentration“, TARPTAUTINĖ STUDENTŲ MOKSLINĖ KONFERENCIJA „OPEN READINGS“, Vilnius, Lietuva.

## Literatūros sąrašas

- Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(7):1405–12.
- Brown K, Mastrianni JA. The prion diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010; 23(4):277–98.
- Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):301–7.
- Buell AK, Dhulesia A, White DA, Knowles TPJ, Dobson CM, Welland ME. Detailed analysis of the energy barriers for amyloid fibril growth. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(21):5247–51.
- Chatani E, Lee YH, Yagi H, Yoshimura Y, Naiki H, Goto Y. Ultrasonication-dependent production and breakdown lead to minimum-sized amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(27):11119–24.
- Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:333–66.
- Cobb NJ, Apostol MI, Chen S, Smirnovas V, Surewicz WK. Conformational stability of mammalian prion protein amyloid fibrils is dictated by a packing polymorphism within the core region. *J Biol Chem*. 2014;289(5):2643–50.
- Cobb NJ, Surewicz WK. Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry*. 2009;48(12):2574–85.
- Cohen SIA, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TPJ. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *J Mol Biol*. 2012;421(2-3):160–71.
- Colby DW, Prusiner SB. Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a006833.
- Diaz-Espinoza R, Soto C. High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(4):370–7.
- Dzwolak W, Smirnovas V, Jansen R, Winter R. Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner: an FT-IR spectroscopic study. *Protein Sci*. 2004;13(7):1927–32.
- Ecroyd H, Carver JA. Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding. *IUBMB Life*. 2008;60(12):769–74.
- Esler WP, Stimson ER, Ghilardi JR, Vinters HV, Lee JP, Mantyh PW, Maggio JE. In vitro growth of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques displays first-order kinetics. *Biochemistry*. 1996;35(3):749–57.

- Foderà V, Librizzi F, Groenning M, van de Weert M, Leone M. Secondary nucleation and accessible surface in insulin amyloid fibril formation. *J Phys Chem B*. 2008; 112(12):3853–8.
- Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2007;159:1–77.
- Hill JW, Scott RJ, Ball DW. *The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry*. Flat World Knowledge. 2011.
- Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomenighi G, Fändrich M. The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein Sci*. 2005;14(7):1753–9.
- Hudson SA, Ecroyd H, Kee TW, Carver JA. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS J*. 2009;276(20):5960–72.
- Jeong JS, Ansaloni A, Mezzenga R, Lashuel HA, Dietler G. Novel mechanistic insight into the molecular basis of amyloid polymorphism and secondary nucleation during amyloid formation. *J Mol Biol*. 2013;425(10):1765–81.
- Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, Grover RK, Roy R, Singh S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol*. 2005; 151(3):229–38.
- Knowles TPJ, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SIA, Aguzzi A, Vendruscolo M, Terentjev EM, Welland ME, Dobson CM. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science*. 2009;326(5959):1533–7.
- Kraus A, Groveman BR, Caughey B. Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:543–64.
- Kumar S, Udgaonkar JB. Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Curr Sci*. 2010;98:639–56.
- Kyle RA. Amyloidosis: a convoluted story. *Br J Haematol*. 2001;114(3):529–38.
- Legname G, Baskakov IV, Nguyen HOB, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Synthetic mammalian prions. *Science*. 2004;305(5684):673–6.
- Maji SK, Wang L, Greenwald J, Riek R. Structure-activity relationship of amyloid fibrils. *FEBS Lett*. 2009;583(16):2610–7.

- Mehrpour M, Codogno P. Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett.* 2010;290(1):1–23.
- Milto K, Botyriute A, Smirnovas V. Amyloid-like fibril elongation follows michaelis-menten kinetics. *PLoS One.* 2013;8(7):e68684.
- Milto K, Michailova K, Smirnovas V. Elongation of mouse prion protein amyloid-like fibrils: effect of temperature and denaturant concentration. *PLoS One.* 2014;9(4):e94469.
- Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. *Curr Opin Struct Biol.* 2009;19(1):14–22.
- Naiki H, Gejyo F. Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol.* 1999; 309:305–18.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry* 4 th edition. W.H. Freeman and Company. 2004.
- Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky VN, Fink AL. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry.* 2001a;40(28):8397–409.
- Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN, Fink AL. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry.* 2001b;40(20):6036–46.
- PDB. [duomenų bazė internete]. Protein data bank. [atnaujinta 2014 04 15; cituota 2014 04 16]. Adresas: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(23):13363–83.
- Qiagen. [internetinė svetainė]. Rotor-Gene Q product details. Sukurta 2013 [atnaujinta 2014; cituota 2014 03 03]. Adresas: <http://www.qiagen.com/>.
- Riesner D. Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br Med Bull.* 2003; 66:21–33.
- Sabate R, Rodriguez-Santiago L, Sodupe M, Saupe SJ, Ventura S. Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. *Chem Commun (Camb).* 2013; 49(51):5745–7.
- Scheibel T, Bloom J, Lindquist SL. The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(8):2287–92.
- Sipe JD, Cohen AS. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol.* 2000;130(2-3):88–98.



Smirnovas V, Baron GS, Offerdahl DK, Raymond GJ, Caughey B, Surewicz WK. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(4):504–6.

Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science.* 2010;327(5969):1132–5.

## Priedai

Prieduose pateikiamos bakalauro studijų metu išleistos mokslinės publikacijos.

Milto K, Botyriūtė A, Smirnovas V. Amyloid-like fibril elongation follows Michaelis-Menten kinetics. *PLoS One*, 2013 8(7):e68684.

Milto K, Michailova K, Smirnovas V. Elongation of Mouse Prion Protein Amyloid-Like Fibrils: Effect of Temperature and Denaturant Concentration. *PLoS One*, 2014 9(4):e94469.