



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Domantas Dargužis

**AMILOIDINIŲ INSULINO FIBRILIŲ SUSIDARYMAS, ANTRINĖS
STRUKTŪROS TYRIMAI**

**SECONDARY STRUCTURE CHANGES OF INSULIN AMYLOID-LIKE
FIBRILS**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

Domantas Dargužis

**AMILOIDINIŲ INSULINO FIBRILIŲ SUSIDARYMAS, ANTRINĖS
STRUKTŪROS TYRIMAI**
**SECONDARY STRUCTURE CHANGES OF INSULIN AMYLOID-LIKE
FIBRILS**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovai: Lekt. Ričardas Mališauskas _____

(vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Dr. Vytautas Smirnovas _____

(vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Bioinžinerijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO

UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentui: **Domantui Dargužiui**

Baigiamojo darbo (projekto) tema: **Amiloidinių insulino fibrilių susidarymas, antrinės struktūros tyrimai**

patvirtinta 2014 m. lapkričio mėn.03 d. dekanų potvarkiu Nr. 321fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2015 m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

Ištirti insulino amiloidinių fibrilių struktūrinius pokyčius skirtingame pH.

Vadovai Lekt. Ričardas Mališauskas

(Parašas)

..... Dr. Vytautas Smirnovas

(Parašas)

Užduotį gavau

.....

(Parašas)

Domantas Dargužis

.....

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

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

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

Pavadinimas **Amiloidinių insulino fibrilių susidarymas, antrinės struktūros tyrimai**

Autorius **Domantas Dargužis**

Vadovai **Lekt. Ričardas Mališauskas ir dr. Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Neteisingas baltymų susilankstymas ir agregacija vaidina didelį vaidmenį sukeldami rimtus žmogaus sveikatos sutrikimus. Natyvią formą praradę baltymai yra ląstelinio streso sukėlėjai. Jie gali turėti aiškių citotoksinių savybių, yra atsakingi už disfunkcijas ir ląstelių nefunkcionalumą pažeistuose organuose. Baltymai, kurie formuoja amiloidinius β -klosčių struktūros agregatus, sukelia didelį stresą ląstelėse, aktyvuoja imunitetą ir veda link neurodegeneracinių ligų.

In vitro baltymų agregacija gali būti sukeliama ekstremaliomis sąlygomis, tokiomis kaip aukšta temperatūra ar žemas pH. Šios sąlygos destabilizuoja natyvią baltymo struktūrą ir leidžia formuotis amiloidinėms fibrilėms.

Šiame darbe buvo tiriama pH įtaka susidarančių insulino amiloidinių fibrilių struktūros pokyčiams. Taip pat susidariusių agregatų struktūros perdavimą nepalankiose sąlygose. Nors insulinas nėra siejamas su konkrečia patologine agregacija, tačiau jis gerai išstudijuotas ir puikiai tinka, kaip amiloidinius agregatus formuojantis modelinis baltymas.

Darbo metu buvo atlikta skirtingose aplinkose spontaniškai susiformavusių fibrilių infraraudonoji spektroskopija. Atlikta fibrilių formavimosi kinetika įvairiose sąlygose. Ištirtas fibrilių sugebėjimas perduoti savo formą nepalankiose aplinkos sąlygose.

Nustatyta, kad fibrilės susidariusios pH 2 ir pH 2.4 rodo skirtingus spektrus amido I/I' regione. Fibrilės susidariusios sunkiame vandenyje skirtingus spektrus rodo pH* 1.6 ir pH* 2. Šie skirtingų tipų agregatai sugeba daugintis, išlaikydami savo struktūrą nepalankiomis sąlygomis. Kinetiniai tyrimai parodė, jog šių agregatų susidarymo greitis taip pat skiriasi. Insulinas pH 2.4 agreguoja greičiau nei pH 2 aplinkoje, o sunkiame vandenyje pH*2 greičiau nei pH* 1.6.

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

Darbo apimtis 35 p. teksto be priedų, 18 paveikslų, 4 lentelės, 19 bibliografinių šaltinių.

Prasminiai žodžiai: Agregacija, amiloidai, insulinas, fibrilės, FT-IR, tioflavinas T.

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

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

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

Title **Secondary Structure Changes of Insulin Amyloid-Like Fibrils**

Author **Domantas Dargužis**

Academic supervisors **Lect. Ričardas Mališauskas and dr. Vytautas Smirnovas**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Protein misfolding and aggregation plays a big role in causing serious human health problems. Loss of native form protein is a cellular stress agents. They may have clear cytotoxic properties, are responsible for the dysfunction and multifunctioning cell in damaged organs. Proteins that form the β -sheet aggregates assemblies is highly stressful to the cells and activate the immunity, leading to neurodegenerative diseases.

In vitro protein aggregation can be caused by extreme conditions such as high temperature or low pH. These conditions destabilize the native protein structure and provide the ability to form amyloid-like fibrils.

The influence of the pH on the structure of insulin amyloid fibrils was investigated in this work. Although insulin is not associated with a specific pathogenic aggregation, but it is well studied and widely used as a model protein in studies of amyloid-like aggregation.

Kinetics of spontaneous insulin amyloid-like fibril formation at different environments was followed using Thioflavin T (ThT) fluorescence assay. Secondary structures of amyloid-like fibrils were studied using infrared spectroscopy.

Fibrils formed at pH 2 and pH 2.4 in normal water showed different spectra at the amide I/I' region, however fibrils formed in heavy water showed different spectra at pH* 1.6 and pH* 2. These different types of aggregates were able to self-propagate maintaining its structure even under unfavorable conditions. Kinetic studies have shown that the rate of aggregate formation is also different. Insulin pH 2.4 aggregate rather than a pH 2 environment and in heavy water pH* 2 rather than in pH* 1.6.

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

Thesis consists of: 35 p. of text without appendixes, 18 pictures, 4 tables, and 19 bibliographical entries.

Keywords: Aggregation, amyloid, insulin, fibrils, FT-IR, thioflavin T.

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Domantas Dargužis, 20112322

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIf-11

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO
SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

2015 m. kovo 2 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Amiloidinių insulino fibrilių susidarymas, antrinės struktūros tyrimai“ patvirtintas 2014 m. lapkričio 3 d. dekanų potvarkiu Nr. 321fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Mano darbo vadovai Lekt. Ričardas Mališauskas ir dr. Vytautas Smirnovas.

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

(Parašas)

Domantas Dargužis

(Vardas ir pavardė)

VILNIUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY

Domantas Dargužis, 20112322

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

Faculty of Fundamental Sciences

(Faculty)

Bioengineering, BIf-11

(Study programme, academic group no.)

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

March 2, 2015

I declare that my Final Degree Paper entitled „Secondary structure changes of insulin amyloid-like fibrils“ is entirely my own work. The title was confirmed on November 3, 2014 by Faculty Dean's order No. 321fm. I have clearly marked the presence of quoted or paraphrased material and referenced all sources.

The academic supervisor of my Final Degree Paper is Lect. Ričardas Mališauskas and dr. Vytautas Smirnovas.

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

(Signature)

Domantas Dargužis

(Given name, family name)

Turinys

ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Amiloidai	11
1.2. A - β struktūros	11
1.3. Amiloidinės ligos	12
1.4. Insulinas kaip modelinis baltymas	14
1.5. Fibrilių charakteristikos ir formavimasis	15
1.6. Amiloidų tyrimų metodikos	16
1.6.1. Infraraudonoji spektroskopija	16
1.6.2. ThT fluorescencija	18
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	20
2.1. Naudoti reagentai	20
2.2. Naudota laboratorinė įranga	20
2.3. Metodai	20
2.3.1. Buferinių tirpalų ruošimas	20
2.3.2. Insulino fibrilių gaminimas	21
2.3.3. Sėklos paruošimas	21
2.3.4. Insulino fibrilių gamyba su sėkla	21
2.3.5. Mėginių paruošimas FT-IR spektroskopijai	21
2.3.6. Insulino fibrilių susidarymo kinetikos mėginiai	21
2.3.7. FT-IR spektro matavimai	22
2.3.8. Agregacijos kinetikos matavimai	22
2.4. Duomenų apdorojimas	23
2.4.9. FT-IR spektro duomenų apdorojimas	23
2.4.10. Kinetinių duomenų apdorojimas	23
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	25
3.1. Insulino agregacija sunkiame buferiniame tirpale	25

3.2. Insulino agregacija skirtingame pH* su sėkla.	26
3.3. Insulino agregacija fosfatiniame buferiniame tirpale	28
3.4. Insulino agregacija skirtingame pH su sėkla.	29
3.5. Insulino fibrilių susidarymo kinetika.....	30
IŠVADOS	33
LITERATŪRA	34

IVADAS

Neteisingas baltymų susilankstymas ir agregacija vaidina didelį vaidmenį sukeldami rimtus žmogaus sveikatos sutrikimus. Natyvią formą praradę baltymai yra ląstelinio streso sukėlėjai. Jie gali turėti aiškių citotoksinių savybių, yra atsakingi už disfunkcijas ir ląstelių nefunkcionalumą pažeistuose organuose. Baltymai, formuojantys amiloidinius β -klosčių struktūros agregatus, sukelia didelį stresą ląstelėse, aktyvuoja imunitetą ir veda link neurodegeneracinių ligų. Alzheimerio, Parkinsono ligos, antro tipo diabetas ir daugelis mažiau žinomų ligų siejamos su baltymų agregacija (Lyubchenko et al., 2006).

Baltymų agregacija sukelia nenormalias ląstelines sąveikas ir veda link įvairių ligų. Tačiau mes mažai žinome apie molekulinis mechanizmus, kurie lemia šiuos procesus. Norint geriau suprasti šiuos procesus reikia gilintis į agregatų susidarymą nulemiančius veiksnius, taip pat tų veiksmų daromą įtaką patiems agregatams.

Šio darbo metu buvo bandoma išsiaiškinti ar pH daro įtaką susidarančių insulino fibrilių antrinei struktūrai bei kinetikai. Taip pat ar skirtingų struktūrų amiloidinės fibrilės, veikdamos kaip sėkla, išlaiko savo formą nepalankiose aplinkos sąlygose.

Darbo tikslas – ištirti insulino amiloidinių fibrilių struktūrinius pokyčius skirtingame pH.

Darbui keliami uždaviniai:

- Atlikti skirtinguose pH spontaniškai susidariusių insulino agregatų struktūros tyrimus.
- Nustatyti ar skirtingų struktūrų fibrilės gali savireplikuotis naudojamos natyvų insuliną.
- Stebėti insulino amiloidinių fibrilių susidarymo kinetiką skirtinguose pH.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

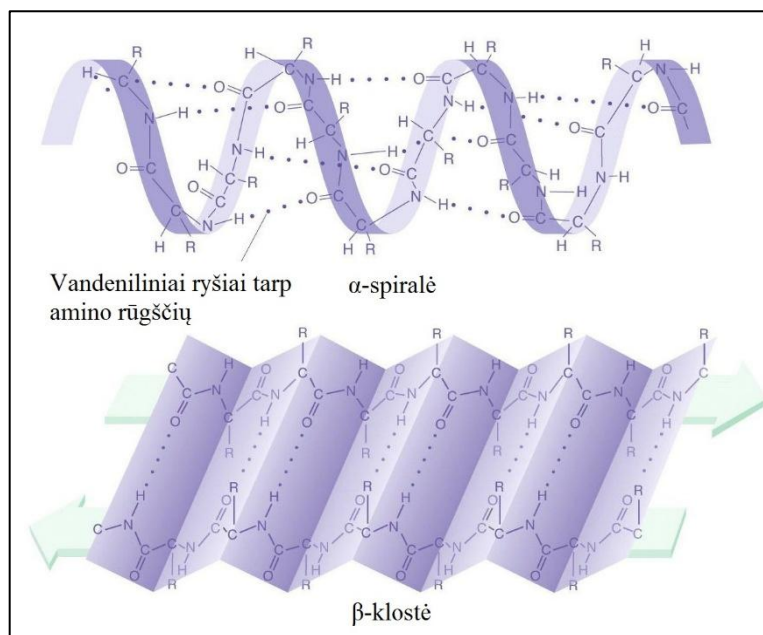
1.1. Amiloidai

1854 metais mokslininkas Rudolfas Virchovas aprašydamas makroskopines audinių anomalijas pastebėjo, jog kai kurie ląsteliniai dariniai nusėda tarp ląstelių įvairiuose audiniuose ir organuose. Mokslininkas panaudojo jodą dažyti makroskopines smegenų audinių anomalijas ir pastebėjo, jog šie nusidažo šviesiai mėlyna spalva, tokia pat, kaip ir krakmolos. Virchovas padarė išvadą, kad pagrindinė medžiaga sukelianti anomalijas yra celiuliozinė ir pavadino amiloidais (Lot. amylium). Tuo metu dar nebuvo aišku, kaip celiuliozė ir krakmolos yra susiję su augalų ir gyvūnų karalystėmis. Todėl buvo nesutariama ar amiloidus sudaranti medžiaga yra celiuliozė ar krakmolos (Sipe, Cohen, 2000).

Tobulėjant mikroskopijos bei biochemijos technologijoms mokslininkas Glenneris 1980 metais pademonstravo, kad amiloidai sudaryti iš daug β -klostinių struktūrų turinčių baltymų. Terminai amiloidinės fibrilės bei β -fibrozės tapo plačiai žinomos.

1.2. α - β struktūros

Teisingas baltymo susilankstymas yra gyvybiškai svarbus. Besilankstydamas baltymas yra priverstas paslėpti hidrofobines šonines grandines. Šis hidrofobinių grupių paslėpimas poliniu baltymo karkasu formuoja α -spirale, didina baltymo tirpumą sudarydamas stipresnius ryšius su vandens molekulėmis. Baltymo susilankstymas priklauso nuo amino rūgščių ir nuo jų eiliškumo polipeptidinėje grandinėje (Berg et al., 2002). Antrinės struktūros α -spiralės formą išlaiko vandeniliniai ryšiai, susidarantys tarp kas ketvirtos aminorūgšties CO ir NH grupių polipeptidinės grandinės viduje. Šios formos kiekviena peptidinė grupė sudaro po du vandenilinius ryšius: vieną su ketvirtos prieš ją sekoje esančios aminorūgšties peptidine grupe, o kitą - su ketvirtos po jos esančios aminorūgšties peptidine grupe. Taip susidarę ryšiai lygiagretūs spiralės ašiai ir pakankamai stiprūs. Spiralės viduje nėra vandens. Tuo tarpu β -klostinę struktūrą stabilizuoja tarpmolekuliniai vandeniliniai ryšiai tarp dviejų arba daugiau grandinių (fibriliniuose baltymuose), arba vidumolekuliniai vandeniliniai ryšiai tarp skirtingų vienos grandinės sričių (globuliniuose baltymuose). Abiem atvejais peptidinė grandinė ištempta (Mildažienė et al., 1999).



Pav. 1.1 Antrinė baltymo struktūra α -spiralė ir β -klostė. Peptidine grandinė pavaizduota amino rūgščių seka, o stabilizuojantys vandeniliniai ryšiai taškeliais.

Šie antrinės struktūros vienetai leidžia susiformuoti aukštesniųjų struktūrų vienetais: β -kolstėms, $\beta\alpha\beta$ vienetais, β -segtukams ir α -spiralės pluoštams. Amiloidinės fibrilės yra sudarytos daugiausiai iš β -klosčių.

Neteisingas baltymo susilankstymas ar agregacija dažniausiai yra antrinės struktūros pasikeitimas į β -klostinę struktūrą (Soto, 1999). Jei baltymas susilanksto netinkamai ar įgyja neteisingą struktūrą jis negali atlikti savo funkcijos. Taigi baltymo susilankstymas ir natyvos formos išlaikymas yra svarbus gyvybės palaikyme.

Natyvos formos praradimas gali būti įtakotas genetinių veiksnių, ar spontaninių pasireiškimų, kuriems daro įtaka netinkama aplinka. Netinkamas pH, stipri joninė jėga, metalų jonai, laisvieji radikalai, oksidacinis stresas ir t.t. daro įtaką baltymo konformacijos pokyčiams. Taip pat, kaip ir prioninių ligų atveju, nenatyvios β -klostinės struktūros baltymai gali sukelti ligą (Soto, 1999).

1.3. Amiloidinės ligos

Amiloidozė yra didelė gana retų ligų grupė, kurioms visoms būdingas nenormalaus, netirpus baltymo – amiloido susikaupimas. Šis sutrikimas gali būti įgytas, paveldėtas ar susijęs su amžiumi. Baltymai, kurie paprastai yra tirpūs, pakeičia struktūrą ir formuoja netirpius baltyminius agregatus – fibriles. Nepaisant to, kad amiloidinės fibriles formuoja gana skirtingi baltymai, tačiau įvairių baltymų agregatai pasižymi tokiomis pat molekulinėmis savybėmis (Xing, Higuchi, 2002).

Šiuo metu žinoma daugiau nei 30 žmogaus ligų, kurias sukelia amiloidinės sankaupos. Jas galima suskirstyti į tris pagrindines grupes: neurodegeneracinės, ne neuropatinės sisteminės

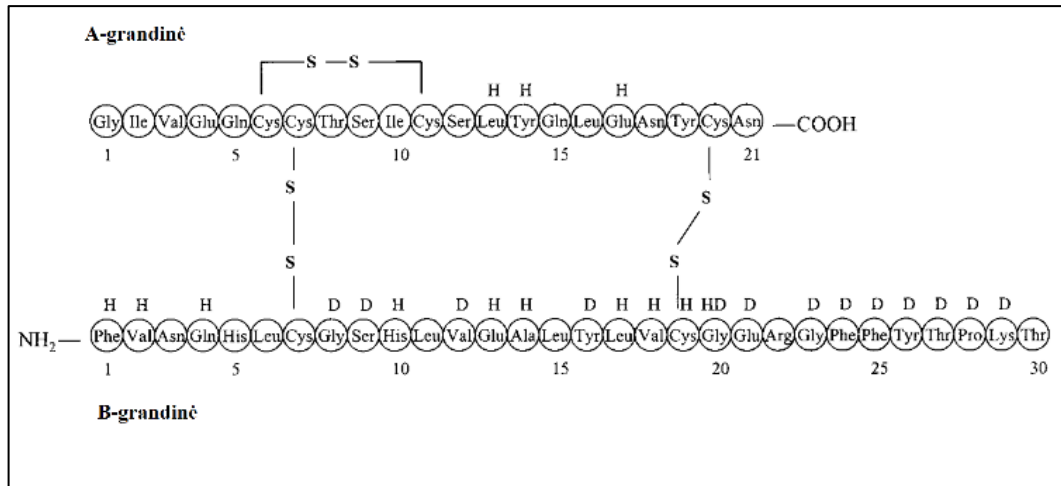
amiloidozės ir ne neuropatinės lokalizuotos ligos. **Lentelėje 1** pateikta dalis ligų, jas sukeltantys baltymų pavadinimai, bei baltymo ilgis.

1 lentelė. Žmogaus ligų, susijusių su amilodų formavimusi, sąrašas (Chiti, Dobson, 2006).

Liga	Agreguojantys baltymai ar peptidai	Aminorūgščių skaičius
<i>Neurodegeneracinės ligos</i>		
Alzheimerio liga	Amiloido β peptidas	40–42
Spongiforminė encefalopatija	Priono baltymas arba jo fragmenta	253
Parkinsono liga	α -Sinukleinas	140
Demensija su Lewy kūneliais	α -Sinukleinas	140
Frontotemporalinė demensija su parkinsonizmu	Tau	352–441
Amiotrofinė lateralinė sklerozė	Superoksido dismutazė 1	153
Hantingtono liga	Hantinginas su poliglutaminų seka	3144
ir kitos.		
<i>Ne neuropatinės sisteminės amiloidozės</i>		
AL amiloidozė	Imunoglobulino lengvosios grandinės ar fragmentai	~90
AA amiloidozė	Serumo amiloido A baltymo fragmentai	76–104
Šeiminė Viduržemio jūros karštligė	Serumo amiloido A baltymo fragmentai	76–104
Senatvinė sisteminė amiloidozė	Laukinio tipo transtiretinas	127
Šeiminė amiloidotinė polineuropatija	Transtiretino mutantai	127
Suomių paveldima amiloidozė	Gelsolino mutantų fragmentai	71
ir kitos.		
<i>Ne neuropatinės lokalizuotos ligos</i>		
II tipo diabetas	Amilinas	37
Skydliaukės modulinė karcinoma	Kalcitoninas	32
Prieširdžio amiloidozė	Prieširdžio natriuretinis faktorius	28
Paveldima cerebralinė hemoragija su amiloidoze	Amiloido β peptido mutantai	40–42
Hipofizės prolaktinoma	Prolaktinas	199
Ragenos amiloidozė susieta su trichiaze	Laktoferinas	692
Katarakta	γ kristalinai	Varijuojantis
ir kitos.		

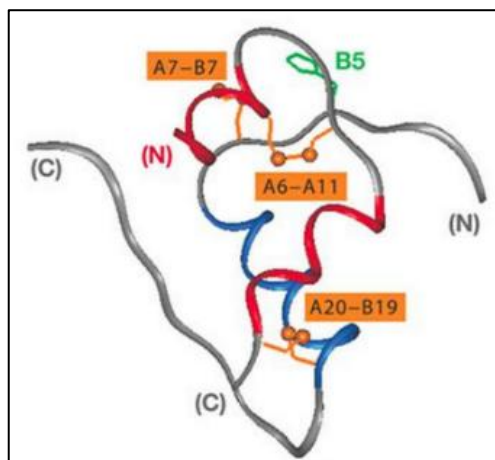
1.4. Insulinas kaip modelinis baltymas

Insulinas yra mažas hormoninis baltymas, kuris yra labai svarbus gliukozės metabolizmo kontrolėje. Pirminę insulino struktūrą sudaro dvi grandinės. A grandinė, kuri susideda iš 21 amino rūgšties, ir B grandinė, kuri susideda iš 30 amino rūgščių. Šios dvi grandinės yra sujungtos disulfidiniiais tilteliais A7-B7 ir A20-B19. Taip pat A grandinė turi vidinį disulfidinį tiltelį A7-A11.



Pav. 1.2 Pirminė insulino struktūra. Pavaizduotos A ir B grandinės, disulfidiniai tilteliai. H ir D raidėmis pažymėtos amino rūgštys dalyvaujančios dimerų ir heksamerų sudaryme.

A grandinės erdvinę struktūrą sudaro dvi, viena kitai priešingos, α -spiralės A2-A8 ir A13-A20, kurios sujungtos prailginta poli peptidine grandine. B grandinės konformaciją sudaro du laisvi polipeptidinės grandinės galai, kurie viduryje sujungti α -spirale B9-B19. (Smith et al., 1984).



Pav. 1.3 Natyvaus insulino erdvinė struktūra. A grandinės α -spiralės pažymėtos raudonai. B grandinės α -spiralė pažymėta mėlynai. Disulfidiniai tilteliai – oranžiniai.

Tirpale insulinas gali būti mišinys monomerų, dimerų, tetramerų ir heksamerų. Viskas priklauso nuo insulino koncentracijos, pH, metalo jonų, joninės jėgos ir tirpiklio sudėties. Fiziologiškai dominuojanti insulino saugojimo forma yra cinko jonų koordinuotas heksameras, sudarytas iš trijų dimerų ir stabilizuotas dviejų ar trijų cinko jonų (Nielsen et al., 2001).

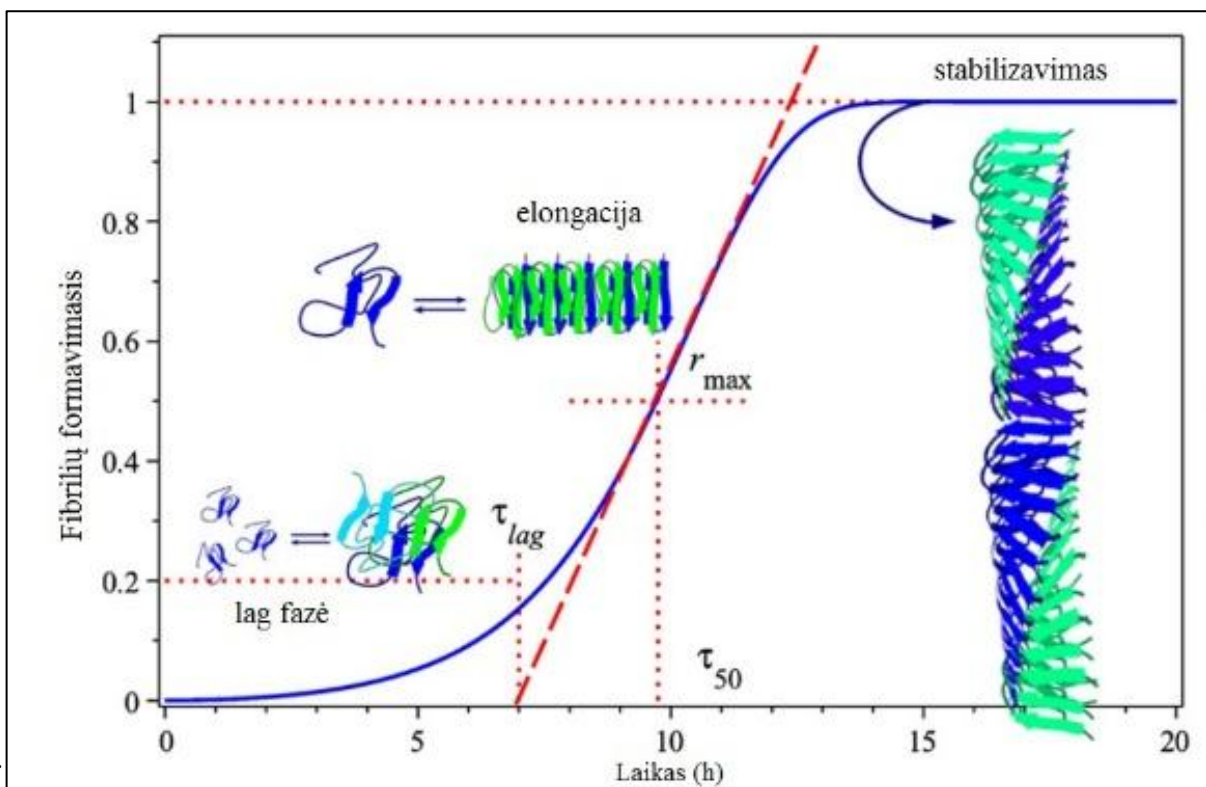
Insulinas, kaip amilodinių fibrilių formavimosi modelinis baltymas, yra naudojamas dėl jo sąlyginai mažos kainos ir sugebėjimo formuoti amiloidinius agregatus. Tiek atskira A grandinė tiek atskira B grandinė gali formuoti fibriles. Taip pat A arba B grandinės agregatai gali veikti kaip sėklos ir aktyvinti pilno insulino baltymo fibrilių formavimąsi. Manoma, jog pagrindiniai baltymo agregacijos centrai, atsakingi už fibrilių formavimąsi, yra A grandinėje (A13-A18) ir B grandinėje (B12-B17). Taip pat šie šešių amino rūgščių insulino fragmentai, LYQLEN (A grandinė 13-18 a.r.) ir VEALYL (B grandinės 12-17 a.r.), gali formuoti fibriles atskirai (Ivanova et al., 2009).

1.5. Fibrilių charakteristikos ir formavimasis

Amiloidinės fibrilės paprastai būna tiesios grandinės, sudarytos iš gijų, kurios susisuka aplink savo ašį. Fibrilių storis siekia 2-20 nm, o ilgis gali siekti keletą mikronų. Aplinkos sąlygos ir amino rūgščių šoninių grandinių savybės lemia polinkį į fibrilinių skaidulų formavimąsi.

Manoma jog pagrindinė jėga, kuri sukelia baltymų agregaciją, yra natyvos formos destabilizacija. Šis pirmasis konformacinis baltymo pasikeitimas yra vadinamas „monomerų formavimasis“. Šie priešbranduoliniai monomerai jungiasi ir formuoja branduolius. Susiformavę branduoliai pradeda augti, vyksta pirminis augimas, kurio metu fibrilių formavimosi greitis pradeda didėti ir *lag* fazė yra pakeičiama eksponentiniu augimu (**Pav. 1.4**). Visu eksponentinio augimo metu vyksta fibrilių ilgėjimas – elongacija. Pasibaigus šiai fazei, tai yra pasibaigus baltymams, kurie gali dalyvauti elongacijoje, kinetinės kreivės augimas sustoja ir ji stabilizuojasi (Gillam, MacPhee, 2013).

Šio stochastinio proceso vyksmui didelę įtaką daro sėklos buvimas. Sėkla gali būti jau susiformavusi fibrilė ar jos dalis. Sėklos efektyvumą lemia „laisvų galų skaičius“ tai yra - sėkla, kuri buvo apdorota ultragarsu bus homogeniškesnė ir turės daugiau pradžios taškų, nuo kurių galės vykti elongacija. Ši sėkla sutrumpina *lag* fazės laiką ir didina agregacijos greitį. Didesnis sėklos kiekis apie 10-5 % panaikina *lag* fazę ir procesas vyksta eksponentinėje dalyje, o mažas sėklos kiekis < 0.1 % gali inicijuoti proceso pradžią net tokiose sąlygose, kuriose paprastai agregacija nevyksta.



Pav. 1.4 Sigmoidinis fibrilių formavimosi grafikas susidedantis iš lag fazės, elongacijos ir stabilizacijos. Pagrindiniai šios kreivės parametrai yra τ_{50} – tai laikas, kai agregacija pasiekia pusiaukelę, tiesės nuolinkio kampas arba agregacijos greitis ir lag fazės laikas (Gillam, MacPhee, 2013).

1.6. Amiloidų tyrimų metodikos

In vitro tyrimams paprastai yra naudojamas grynas baltymas ir gryni komponentai. Amiloidinių skaidulų formavimasis gali būti apibūdinamas dvejais aspektais: skaidulų struktūros nustatymas (susiformavusių fibrilių struktūra) ir skaidulų formavimosi mechanizmas t. y. kinetinis proceso stebėjimas (Nilsson, 2004). Šiems parametrams stebėti yra nemažai skirtingų metodų. Tačiau apžvelgsiu tik tuos, kuriuos naudoju darbu metu.

1.6.1. Infraraudonoji spektroskopija

Infraraudonoji spektroskopija yra dažnai taikoma organinių ir kai kurių neorganinių junginių analizei. Taip pat taikoma ir baltymo struktūros tyrimams. IR spektroskopija yra mėginio matavimo metodas, kai stebima spindulių intensyvumo absorbcija IR bangos ilgio diapazone. Infraraudonos šviesos diapazonas prasideda nuo 7.8×10^{-5} cm. ir tęsiasi iki 3×10^{-2} cm.

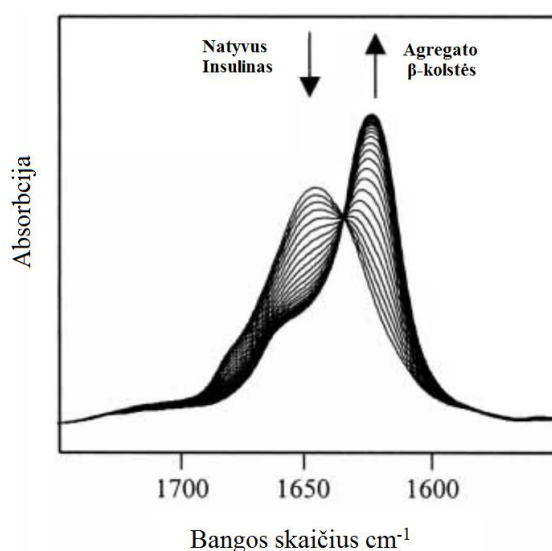
Elektromagnetinė spinduliuotė gali būti sugerama tik tada, kai vibracinio sužadavimo metu pakinta molekulės dipolio momentas. Yra du molekulinės vibracijos tipai – tempimo vibracija ir lenkimo vibracija. Šios molekulinės vibracijos keičia molekulės dipolio momentą, fotonai perduoda savo energiją ir infraraudonoji spinduliuotė yra absorbuojama.

Jautriausias baltymo antrinės struktūros spektrinis regionas yra amido I ryšys. Analizuojant 1600–1700 cm^{-1} regioną matomas amido I ryšio virpesių ruožas, kurį sudaro daugiausia C=O vibracija (apytiksliai 80%), taip pat matoma N-H vibracija, tačiau ji sudaro mažiau nei 20%. Yra nustatyta, kad šis amido I ruožas glaudžiai koreliuoja su kiekvienu baltymo antrinės struktūros elementu (Kong, Yu, 2007).

Didelis jautrumas nedideliems molekulės geometriniais ir vandenilinių ryšių pasikeitimams, amido I regione, leidžia stebėti baltymo antrinės struktūros sudėtį. Kiekvienas antrinės struktūros elementas, dėl unikalios molekulinės geometrijos ir skirtingai išsidėsčiusių vandenilinių ryšių, sukelia šiek tiek skirtingą C=O tempimo dažnį. Baltymų amido I spektro kontūras susideda iš persidengiančių komponentų: α -spiralių, β -klosčių ir atsitiktinių struktūrų juostų.

Analizuojant baltymo struktūras kaip tirpiklį teisingiau būtų naudoti H_2O nei D_2O . Tačiau H_2O turi stiprią absorbciją trijose spektro juostose. Viena spektro juosta 1645 cm^{-1} (H-O-H lenkimo) persidengia su amido I regionu. Šis persidengimas 1600 – 1700 cm^{-1} ribose trukdo stebėti baltymo spektrinę sugertį amido I regione. Todėl stebint amido I regioną dažniausiai yra naudojamas tirpiklis D_2O (Kong, Yu, 2007), kurio spektrinės charakteristikos nepaslepia amido I regiono.

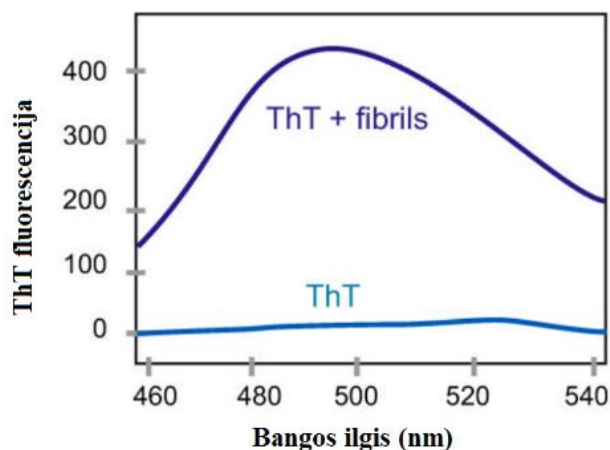
Agreguojant insulinui, antrinės struktūros amido I vibracijos ruožas pasistumia iš $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ pozicijos, tipiškos baltymo α -spiralems, į $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ (Pav. 1.6). Šis regionas atitinkamai yra priskiriamas β -klostėm, kurios formuojasi susidarant amiloidiniams agregatams (Dzwolak et al., 2004).



Pav. 1.6 Sėkla indukuoto jaučio insulino agregacija laike (24 h). FT-IR spektras rodo amido I ryšio struktūrinį pokytį palaipsniui, kai baltymas iš natyvos formos pereina į denatūruotą susidarant fibrilėms (Dzwolak et al., 2004).

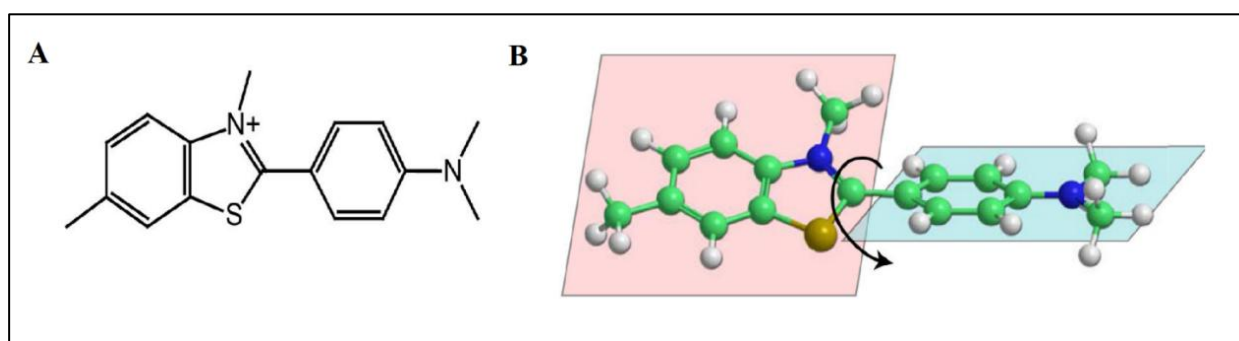
1.6.2. ThT fluorescencija

Benzotiazolo dažas Thioflavinas T (ThT) pirmą kartą buvo aprašytas 1959 metais. Šis dažas buvo pradėtas plačiai naudoti identifikuojant ir kiekybiškai nustatant amiloidinių fibrilių susidarymą tiek *in vivo* tiek ir *in vitro*. ThT dažas rišasi prie amiloidinių sankauptų ir jo fluorescencija smarkiai išauga. Emisija ties ~490 nm, o sužadینimas ~ 440 nm. bangos ilgio. Laisvas ThT dažas vandenyje rodo labai silpną fluorescenciją su mažesniais emisijos ~ 440 nm. ir sužadınimo ~ 350 nm. bangos ilgiais (Hudson et al., 2009).



Pav. 1.6 Mėlyna spalva pažymėta laisvo ThT dažo fluorescencija vandenyje. Violetine spalva pažymėta dažo fluorescencija sąveikaujant su amiloidinėm fibrilėm.

Nors ThT dažas yra vienas iš labiausiai naudojamų amiloidinių dažų, tačiau tikslus šio dažo jungimosi mechanizmas nėra aiškus. Manoma, jog ThT molekulė veikia kaip „molekulinis rotorius“. Mažas energijos barjeras tirpale leidžia benzilaminui ir benzotiazolo žiedui laisvai sukintis apie C-C ryšį.



Pav. 1.7 **A** Amiloidinio dažo Thioflavino T molekulinė struktūra. **B** Optinis dažo vaizdas, kuriame benzotiazolo ir benzilamino grupės vaizduojamos skirtinguose plokštumose. Šios molekulės grupės laisvai sukasi apie C-C ryšį.

Šis sukimasis malšina fotonų sužadavimo galimybę, todėl laisvo dažo fluorescencijos emisija maža. Amiloidiniai baltymai sudaro chiralinę aplinką dažui ir jį „užrakina“. Ši chiralinė aplinka intensyvina dažo fluorescenciją bei daro įtaką sužadavimo ir emisijos bangų poslinkiui (Biancalana, Koide, 2012).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudoti reagentai

- *Carl Roth*: sunkus vanduo (99,8 % D), trideuterio fosforo rūgštis D_3PO_4 , natrio deuterio oksidas NaOD.
- Fisher Scientific: H_3PO_4 , NaOH, HCl.
- *Sigma Aldrich*: rekombinantinis žmogaus insulinas, tioflavinas T.

2.2. Naudota laboratorinė įranga

- Centrifuga „Technico Maxi“
- FT-IR spektrometras „Bruker Optics ALPHA FT-IR“
- pH metras „Orion DUAL STAR Meter“
- Realus laiko PGR aparatas „Qiagen Rotor-Gene Q“
- Sūkurinė maišyklė „VELP SCIENTIFICA VORTEX MIXER“
- Svarstyklės: „Denver Instrument TP-214“
- Termomikseris „DITABIS MHR 23“
- Ultragarsinis homogenizatorius „Bandelin Sonopuls“

2.3. Metodai

2.3.1. Buferinių tirpalų ruošimas

Buferiniai tirpalai insulino agregacijai buvo ruošiami sunkiame vandenyje (D_2O) ir paprastame (H_2O). 1 mL buferinio tirpalo buvo ruošiamas įpilant 800 μ L vandens, 100 μ L 1M fosfatinės rūgšties. 1 M natrio šarmo tirpalu kruopščiai privedama reikiama buferinio tirpalo pH reikšmė. Įpilamas reikiamas kiekis vandens, kad bendras tirpalo tūris pasiektų 1mL. Pagamintas fosfatinis buferinis tirpalas (FB) yra 100mM koncentracijos.

Sunkus fosfatinis buferinis tirpalas (SFB) buvo ruošiamas taip pat, tik vietoj paprasto vandens, natrio šarmo ir fosforo rūgšties tirpalų buvo naudojamas sunkus vanduo, 1M natrio deuterio oksido ir 1M trideuterio fosforo rūgšties tirpalai.

2.3.2. Insulino fibrilių gaminimas

Insulino fibrilės ruošiamos ištirpinant 5.8 mg/mL insulino 100mM paprastame arba sunkiame fosfatiniame buferyje . Inkubuojama 24 valandas 60 °C temperatūroje purtant 200 aps/min greičiu. Po inkubacijos susidaro tiršta amiloidinių fibrilių suspensija.

2.3.3. Sėklos paruošimas

Insulino sėkla ruošiamą iš 2.3.2 pagamintų insulino fibrilių. Sėklos ruošimas sunkiame ar paprastame vandenyje nesiskiria.

Mėginys su susidariusiais agregatais yra įstatomas į ledo vonią ir ultragarsinamas 10 minučių (30s/30s ultragarsinimo/poilsio pulsais, 50% amplitude ir mėginio galutinis gautas energijos kiekis ~5.6 kJ) naudojant „Bandelin Sonopuls“ ultragarso aparatą su MS73 antgaliu. Šis mėginio apdorojimas padidinti fibrilių galų skaičių ir homogenizuoja suspensiją.

2.3.4. Insulino fibrilių gamyba su sėkla

Mėginys su sėkla ruošiamas pagal **3 lentelę** paprastame (FB) ir sunkiame (SFB) fosfatiniame buferyje. Inkubacija vykdoma 37 °C temperatūroje 24 valandas.

2 lentelė. Mėginio, su skirtingomis sėklos koncentracijomis, ruošimas FB/SFB.

Mėginio sėklos procentinė dalis %	Insulinas mg.	FB/SFB μL.	Sėkla μL.	Galutinis mišinys
0.1	5.8	999	1	Insulino + sėklos koncentracija 1M, 100mM paprastame/sunkiame fosfatiniame buferiniame tirpale
10	5.2	900	100	

2.3.5. Mėginių paruošimas FT-IR spektroskopijai

Insulinas suagregavęs SFB yra ultragarsinama 60 sekundžių naudojant 50% amplitude ledo vonioje, gautas energijos kiekis ~1.12 kJ.

Insulinas suagregavęs FB yra atplaunamas sunkiu vandeniu (SV). Mėginys yra nucentrifuguojamas (20 min 14000 aps/min), nusiurbiamas supernatantas, suspenduojama 0.5 mL SV. Taip pakartojame du kartus. Trečią kartą suspenduojame 1 mL SV. Ultragarsinama 60 sekundžių naudojant 50% amplitude ledo vonioje.

2.3.6. Insulino fibrilių susidarymo kinetikos mėginiai

Spontantinės insulino fibrilių susidarymo kinetikos tyrimo metu buvo paruošiami mėginiai su 5.8 mg/mL insulino , 100 μM ThT, 100mM fosfatiniame arba sunkiame fosfatiniame

buferiniame tirpale su skirtingomis pH/pH* reikšmėmis. Spontaniinė agregacija buvo vykdoma 60 °C temperatūroje iki 24 valandų matuojant fluorescencijos intensyvumą.

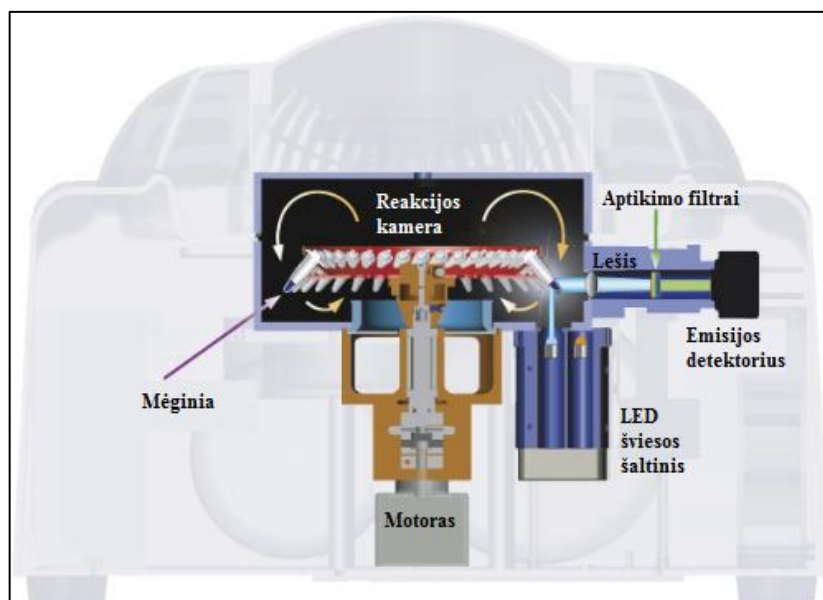
2.3.7. FT-IR spektro matavimai

FT-IR spektroskopija stebima naudojant „ALPHA FT-IR“ spektroskopą. Reakcijos mėginys (30 μL) užnešamas ant CaF_2 matavimo celės su 0.05 mm. tarpine. Ši celė 4000 – 1200 cm^{-1} ruože yra skaidri, todėl absorbcija užrašoma šiose ribose. FT-IR spektras nuskaitymas 256 kartus ir išvedamas spektro vidurkis. Spektro rezoliucija parenkama 2 cm^{-1} . Kiekvieną dieną paimami triukšmo (oro) ir sunkaus vandens spektrai, kurie naudojami apdorojant spektrinius duomenis.

2.3.8. Agregacijos kinetikos matavimai.

Agregacijos kinetika stebima naudojantis „Qiagen Rotor-Gene Q“ realaus laiko PGR aparatu. Šio aparato specifinė technologija suteikia galimybę atlikti ne tik PGR reakcijas, bet ir realiu laiku stebėti agregacijos tyrimus. Viso proceso metu palaikoma pastovi temperatūra. Aparatas talpina 36 mažus (200 μL) tūrio mėgintuvėlius. Jie sudėti į apvalų stovą kuris sukasi 400 aps/min greičiu taip palaikydamos reakcijos mišinį mėgintuvėlio dugne, kur matuojama fluorescencija.

Susidarant insulino amiloidinems fibrilėms ThT dažas jungiasi prie agregato ir pradeda fluorescuoti. Fluorescencijos intensyvumas tiesiogiai priklauso nuo fibrilių susidarymo bei ThT dažo koncentracijos. Fluorescencija sužadinama 470 nm. bangos ilgio šviesa, o emisija surenkama 510 nm.



Pav. 2.1 „Qiagen Rotor-Gene Q“ aparato sandara. Aparatas fiksuoja mėgintuvėlių fluorescenciją palaikant pastovią temperatūrą.

2.4. Duomenų apdorojimas

2.4.9. FT-IR spektro duomenų apdorojimas

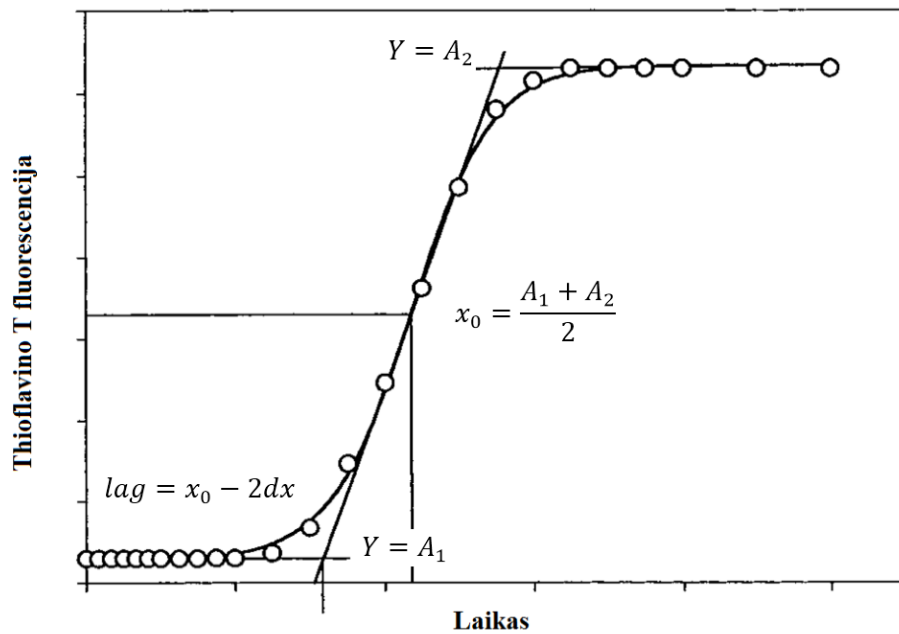
Surinkti spektriniai yra apdorojami tam, kad būtų lengviau palyginti tarpusavyje. Spektriniai duomenys apdorojami GRAMS/AI 8 programa. Apdorojimas vykdomas šiais etapais:

1. Atimamas sunkaus vandens (D₂O) spektras, kuris kiekvieną matavimo dieną paaimamas iš naujo.
2. Atimamas tos dienos triukšmas.
3. Atliekama bazinės linijos korekcija. Sukuriama bazinė linija 1700 - 1560 cm⁻¹ ribose. Išlyginama lygiagrečiai x ašiai.
4. Atliekama nulinė korekcija - bazinės linijos nuleidimas į nulinę y ašies reikšmę.
5. Spektras normalizuojamas padalinant spektrą iš 1700-1560 cm⁻¹ spektro ploto tam, kad gauti spektrai būtų vienodo dydžio ir būtų galima nesunkiai palyginti.
6. Atliekama antro laipsnio Sav Golay išvestinė.

2.4.10. Kinetinių duomenų apdorojimas

Eksperimentiniai duomenys gauti ThT fluorescencijos metodu apdorojami Microsoft Excel ir Origin 8 programomis. Amiloidinių fibrilių formavimosi kinetines kreives galima suskirstyti į dvi grupes. Pirmoji – spontaninė arba nedidelio sėklos kiekio amiloidinių fibrilių formavimosi kinetika, kai fibrilių susidarymo kreivė gali būti aprašoma sigmoidiniu modeliu. Antroji – amiloidinių fibrilių ilgėjimo kinetika, kai fibrilių, susidarymo kreivė primena Michaelio-Menten modelį.

Amiloidinių fibrilių agregaciją, kuri vyksta spontaniškai ar veikiant nedideliu sėklos kiekiu, galima aprašyti sigmoidiniu modeliu (**Pav. 2.2**), kurį sudaro trys pagrindinės fazės. Pirmosios (*lag*) fazės metu natyvus baltymas pradeda prarasti savo formą ir yra destabilizuojamas, jis formuoja pirminius monomerus, kurie pradeda formuoti branduolius. Šio proceso metu ThT fluorescencijos intensyvumas neauga, jis išlieka minimalus. Antrosios (*augimo*) fazės metu vyksta eksponentinis augimas, pradeda ilgėti branduoliai. Šioje fazėje ThT dažas rišasi su susidarančiomis fibrilėmis ir pradeda rodyti vis stipresnę fluorescenciją. Trečiosios (*stabilizacijos*) fazės metu pradeda trūkti fibriles formuojančių monomerų, todėl dažo fluorescencijos augimas sustoja ir stabilizuojasi.



Pav. 2.2 Insulino amiloidinių fibrilų augimą atspindinti schema.

Tam, kad duomenys būtų lengviau palyginami tarpusavyje, jie yra normalizuojami pagal formulę:

$$y_{norm} = \frac{y - y_{min}}{y_{max} - y_{min}} \quad (1)$$

Kur, y_{norm} yra normalizuotas fluorescencijos intensyvumas, o y_{min} – minimali fluorescencijos reikšmė y_{max} - maksimali fluorescencijos reikšmė. Taip normalizuoti duomenys pasiskirsto 0 – 1 ribose pagal fluorescencijos intensyvumą.

Normalizuoti duomenys gluodinami Boltzmann'o sigmoide (Banerjee, Das, 2012), kuri aprašoma lygtimi 2.

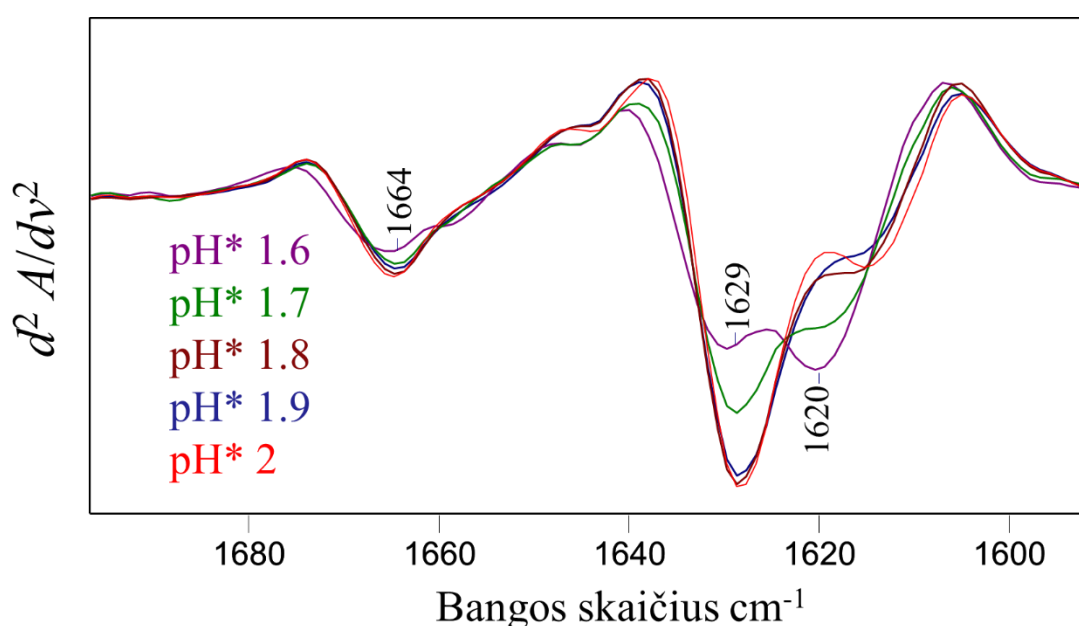
$$Y = \frac{A_2 - A_1}{1 + e^{(x_0 - x)/dx}} + A_1 \quad (2)$$

Lygties A_1 reikšmė – tai pradinė fluorescencija, A_2 maksimali fluorescencija, Y fluorescencijos intensyvumas. Iš šios lygties galime išskaičiuoti kelis esminius parametrus, kurie svarbūs duomenų analizavimu: x_0 – laiko tarpas, kai pasiekama pusė fluorescencijos intensyvumo, lag – lag fazės laikas.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

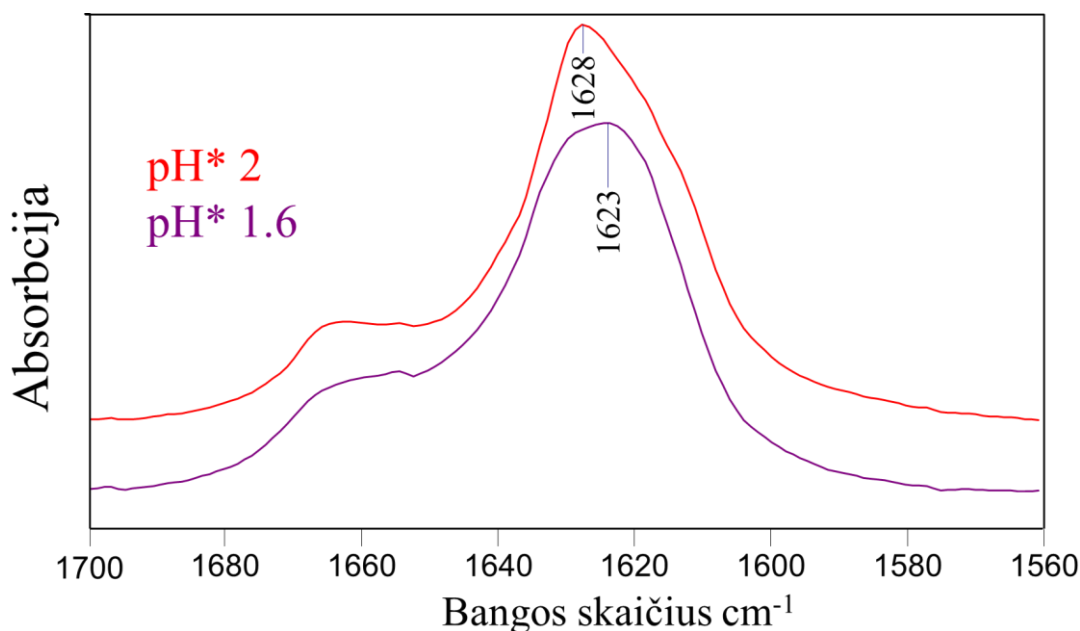
3.1. Insulino agregacija sunkiame buferiniame tirpale

Spontantinė insulino agregacija buvo atliekama skirtingose sunkaus fosfatinio buferinio tirpalo sąlygose. Agregacija buvo vykdoma pH*1.6, pH* 1.7, pH* 1.8, pH* 1.9 ir 2 (kur, pH* – pH-metro parodymai sunkiame fosfatiname buferyje). Paveiksle 3.1 pateiktos 1700-1560 cm⁻¹ ruožo infraraudonojo spektro antro laipsnio išvestinės. 1620 -1640 cm⁻¹ ribose atvaizduojama amido I' juostos smailė.



Pav. 3.1 Antrinės išvestinės FT-IR spektrai. Raudona linija – fibrilės susidariusios pH* 2 aplinkoje, mėlyna – fibrilės susidariusios pH* 1.9, ruda – fibrilės susidariusios pH* 1.8, žalia – fibrilės susidariusios pH* 1.7, violetinė – fibrilės susidariusios pH* 1.6 aplinkoje.

Iš pateiktų duomenų matome, jog spektrai turi silpną minimumą ~1664 cm⁻¹, tačiau agregatų susidariusių pH* 1.6 aplinkoje (violetinė spalva) pagrindinis spektro minimumas skiriasi nuo agregatų susidariusių pH* 1.7 ar pH* 2 aplinkose. Fibrilės susidariusios pH* 1.6 pagrindinis spektro minimumas pasislinkęs į mažesnių reikšmių pusę – 1620 cm⁻¹. Taip pat šis spektras turi silpnesnį minimumą prie ~1629 cm⁻¹ bangos skaičiaus. Fibrilės susiformavusios pH* ruože [1.7 – 2.0] skiriasi labai mažai, išlaikydamos pagrindinį spektro minimumą ties ~1629 cm⁻¹.



Pav. 3.2 Absorbancijos FT-IR spektrų palyginimas. Paveiksle matomas amido I' regionas, kur raudona spalva atspindi – fibrilės susiformavusias pH* 2 aplinkoje, violetinė – fibrilės susiformavusias pH* 1.6 aplinkoje.

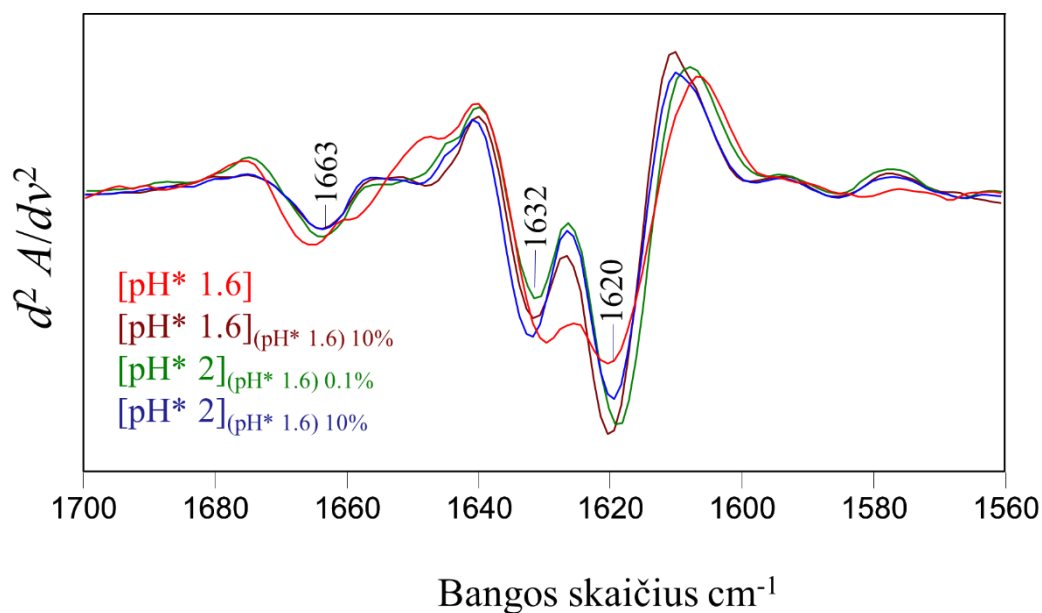
Fibrilės susidariusio pH* 2 absorbcinio spektro maksimumą rodo ties 1628 cm⁻¹ bangos skaičiaus. Fibrilės susidariusios pH* 1.6 absorbcinio spektro maksimumą rodo ties 1623 cm⁻¹.

Mažas pH* pokytis fibrilių susidarymo aplinkoje daro įtaką spektrų poslinkiui. Šie spektro poslinkiai, amido I' ruože, parodo, jog fibrilės susidariusios skirtingame pH* skirias savo struktūra. Todėl galima teigti, jog fibrilės susidariusios pH* 1.6 yra kitokio tipo, nei fibrilės susidariusios pH* 2 aplinkoje.

3.2. Insulino agregacija skirtingame pH* su sėkla.

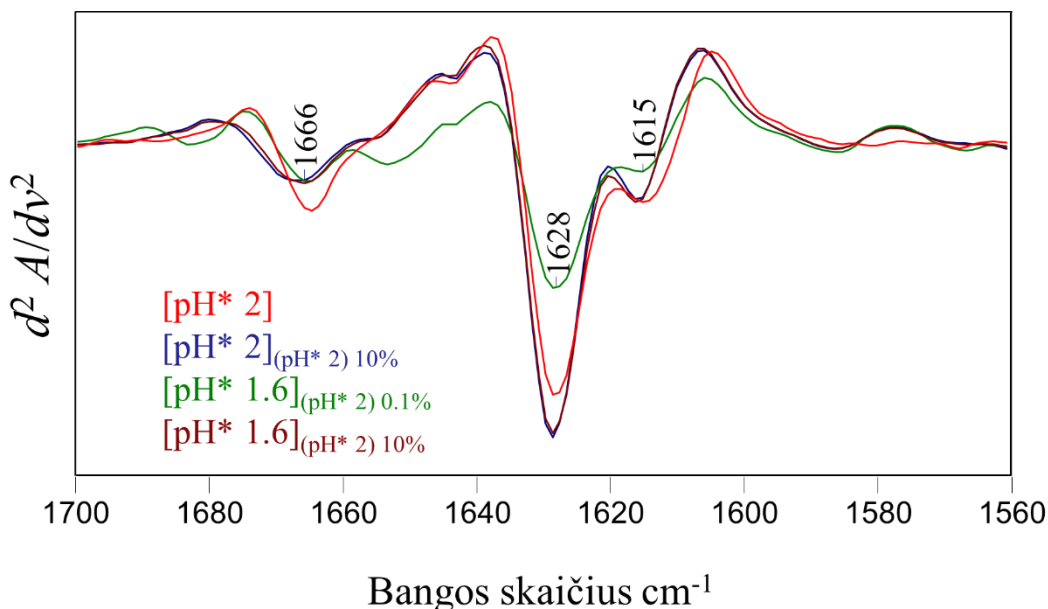
Amiloidinio agregato – sėklos buvimas fibrilių formavimosi aplinkoje keičia jų susidarymo kinetiką. Sėkla sutrumpina arba panaikina pirmąją fibrilių formavimosi stadiją (*lag fazę*), kurioje vyksta monomerų ir branduolių formavimasis. Norint išsiaiškinti, ar sėklos buvimas fibrilių formavimosi aplinkoje daro įtaką ir fibrilių struktūrai, buvo atliekama insulino agregacija skirtingose pH* sąlygose su skirtingais sėklos tipais.

Insulino agregacija su sėkla, buvo atliekama su dviejų tipų sėklomis – spontaniškai suagregavusiomis pH* 1.6 ir pH* 2 sunkaus fosfatinio buferio aplinkose. Agregatai susidarę pH* 1.6 buvo ultragarsinami ir skirtingu kiekiu (0.1 ar 10 %) buvo dedami į pH* 1.6 ir pH* 2 insulino tirpalus. Taip pat ir agregatai susidarę pH* 2 aplinkoje buvo ultragarsinami ir skirtingu kiekiu (0.1 ar 10 %) buvo dedami į pH* 1.6 ir pH* 2 insulino tirpalus.



Pav. 3.3 Antrinės išvestinės FT-IR spektrai. Raudona linija – fibrilės susidariusios pH* 1.6 aplinkoje, kurios panaudotos kaip sėkla. Ruda spalva – fibrilės susidariusios pH* 1.6 aplinkoje su 10 % pH* 1.6 sėkla, žalia – fibrilės susidariusios pH* 2 aplinkoje su 0.1 % pH* 1.6 sėkla, mėlyna – fibrilės susidariusios pH* 2 aplinkoje su 10 % pH* 1.6 sėkla.

Iš paveikslo 3.3 matome, jog fibrilės susiformavusios skirtingose pH* sąlygose ir veikiant skirtingu sėklos kiekiu, išlaiko labai panašią struktūrą kaip ir pH* 1.6 sėkla. Pagrindinis spektro antrinės išvestinės minimumas išlaikomas ~1620 cm⁻¹, o silpnesnis minimumas, nors ir minimaliai skiriasi nuo sėklos, tačiau išlaikoma panašiose 1632 – 1630 cm⁻¹ ribose.



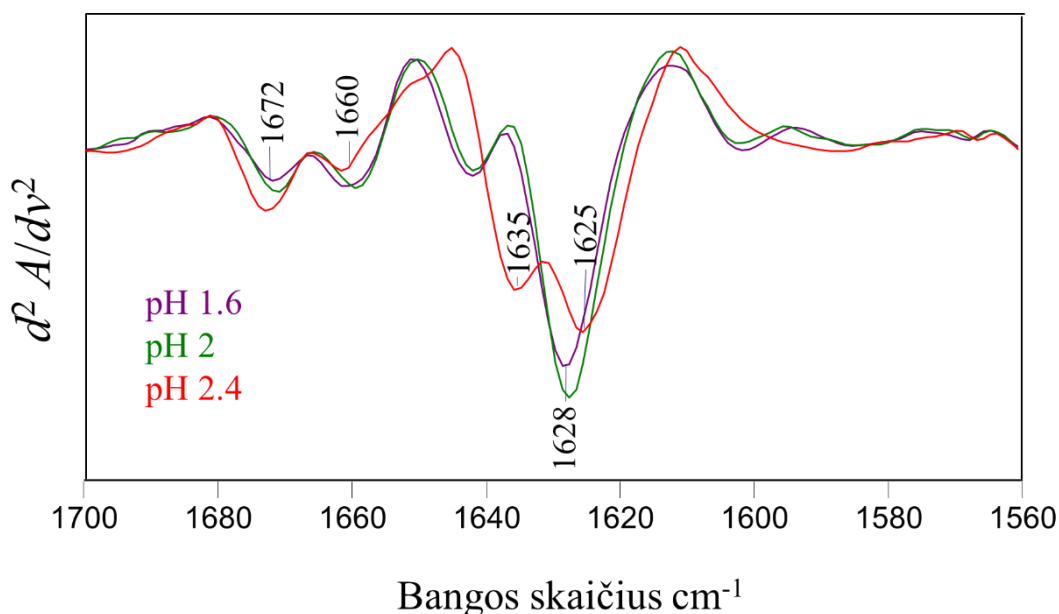
Pav. 3.4 Antrinės išvestinės FT-IR spektrai. Raudona linija – fibrilės susidariusios pH* 2 aplinkoje, kurios panaudotos kaip sėkla. Mėlyna spalva – fibrilės susidariusios pH* 2 aplinkoje su 10 % pH* 2 sėkla, žalia – fibrilės susidariusios pH* 1.6 aplinkoje su 0.1 % pH* 2 sėkla, ruda – fibrilės susidariusios pH* 1.6 aplinkoje su 10 % pH* 2 sėkla.

Iš paveikslo 3.4 pateiktų duomenų matome, jog ir fibrilės susiformavusios mėginyje esant pH*2 sąlygomis, skirtingose pH* sąlygose, išlaiko panašią struktūrą į sėklos. Pagrindinis spektro minimumas išlaikomas $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$. Taigi galime teigti, jog fibrilių struktūros formavimuisi, sunkiame vandenyje, didesnę įtaką daro ne aplinkos pH* sąlygos, o mėginyje esančios sėklos tipas.

3.3. Insulino agregacija fosfatiniame buferiniame tirpale

Spontanine insulino agregacija fosfatiniame buferyje buvo atliekama skirtingose pH sąlygose. Agregacija buvo vykdoma pH 1.6, pH 2 ir pH 2.4 buferiniuose tirpaluose.

Paveiksle 3.5 matoma, jog mėginiai paruošti fosfatiniame buferiniame tirpale turi silpną bendrą minimumą $\sim 1672 \text{ cm}^{-1}$ ir $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ bangos skaičiaus. Tačiau pagrindiniai spektro minimumai skiriasi. Spektras paimtas iš fibrilių suagregavusių pH 2.4 aplinkoje pagrindinis spektro minimumas skiriasi nuo fibrilių suagregavusių pH 2 ar pH 1.6 aplinkose. Fibrilės susidariusios pH 2 pagrindinį spektro minimumą rodo ties $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$, o fibrilės susidariusios pH 2.4 [1620 - 1640] cm^{-1} ribose, turi du minimumus. Pagrindinis ties 1625 cm^{-1} , o silpnesnis ties 1635 cm^{-1} . pH 2 ir pH 2.4 aplinkose susidariusios fibrilės amido I/I' smailės regione rodo skirtingus spektrus. Todėl galima teigti, jog fibrilės susidariusios pH 2 yra kitokio tipo, nei fibrilės susidariusios pH 2.4 aplinkoje.



Pav. 3.5 Antrinės išvestinės FT-IR spektrai. Raudona linija – fibrilės susidariusios pH 2.4 aplinkoje, žalia – fibrilės susidariusios pH 2, violetinė – fibrilės susidariusios pH 1.6 aplinkoje.

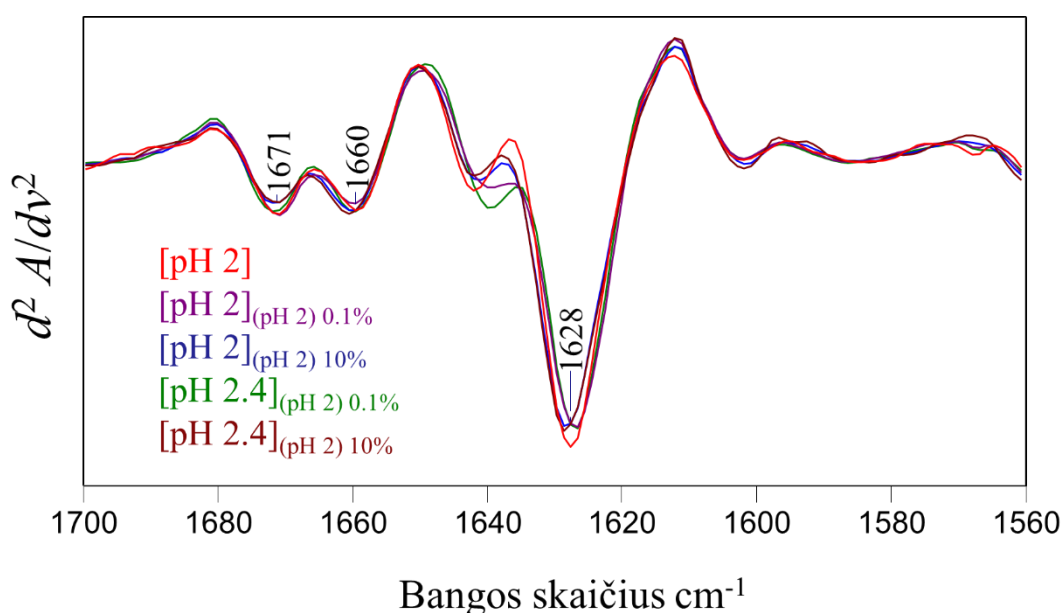
Remiantis 2010 m. mokslininko Kurouskio atliktais tyrimais, fibrilės susidarančios skirtingame pH skiriasi savo supermolekuliniu chiralumu. Šiuose tyrimuose buvo stebima susidariusių fibrilių, pH ribose [1.3 – 3.1], IR spektroskopija ir žiedinis dichroizmas. Buvo

pastebėta, jog fibrilės susidariusios pH 2.4 ir aukščiau rodo normalų chiralumą, kai fibrilės susidariusios pH 2.1 ir žemiau rodo priešingą chiralumą. Viso eksperimentinio pH ribose IR spektro pokyčių nebuvo pastebėta (Kurouski et al., 2010), tačiau eksperimentuose buvo naudojama didesnė 60 mg/mL insulino koncentracija, lyginant su 5.8 mg/mL naudota mano darbe.

Lyginant fibriles susidariusias D₂O ir H₂O pastebimas pH neatitikimas. D₂O tirpiklyje susidariusios fibrilės skiriasi savo struktūra tarp pH* 1.6 ir 2, o H₂O tirpiklyje susidariusios fibrilės rodo skirtingus tipus pH 2 ir 2.4. Esant vienodai D⁺ ir H⁺ koncentracijai, pH-metro stiklinis elektrodas, rodo 0.4 pH vienetais žemiau D₂O tirpiklyje negu H₂O (Glasoe, Long, 1960). Šis skirtumas atsiranda dėl stiklo elektrodo charakteristikų. Įdomu tai, kad baltymo pK_a poslinkis sunkiame vandenyje kompensuoja stiklo elektrodo paklaidą, tad esant vienodiems pH-metro parodymams baltymo jonizacija tiek D₂O, tiek H₂O tirpaluose turėtų būti vienoda (Bundi, Wüthrich, 1979). Kadangi insulino agregacijos atveju atsiranda 0.4 skirtumas tarp D₂O ir H₂O, galima manyti, kad skirtingų amiloidinių fibrilių struktūrų susidarymui svarbi ne baltymo jonizacija, bet aplinkos pH.

3.4. Insulino agregacija skirtingame pH su sėkla.

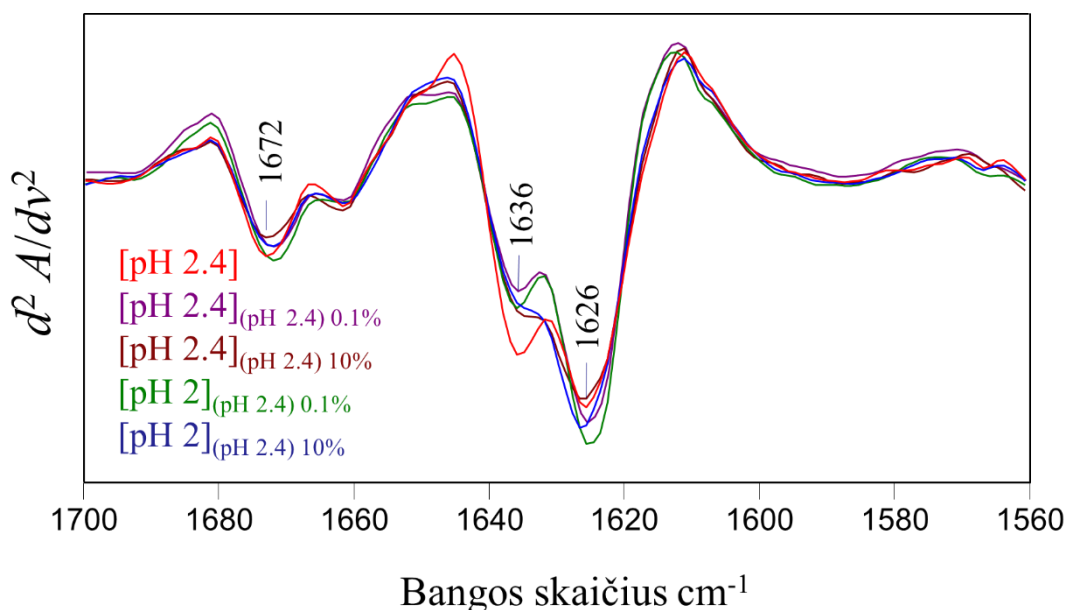
Insulino agregacija su sėkla, buvo atliekam su dviejų tipų sėklomis – spontaniškai suagregavusiomis pH 2 ir pH 2.4 fosfatinio buferinio tirpalo aplinkose. Agregatai susidarę pH 2 buvo ultragarsinami ir skirtingu kiekiu (0.1 ar 10 %) buvo dedami į pH 2 ir pH 2.4 insulino tirpalus. Taip pat ir agregatai susidarę pH 2.4 aplinkoje buvo ultragarsinami ir skirtingu kiekiu (0.1 ar 10 %) buvo dedami į pH 2 ir pH 2.4 insulino tirpalus.



Pav. 3.6 Antrinės išvestinės FT-IR spektrai. Raudona linija – fibrilės susidariusios pH 2 aplinkoje, kurios panaudotos kaip sėkla. Violetinė spalva – fibrilės susidariusios pH 2 aplinkoje su 0.1 % pH 2

sėkla, mėlyna – fibrilės susidariusios pH 2 aplinkoje su 10 % pH 2 sėkla, žalia – fibrilės susidariusios pH 2.4 aplinkoje su 0.1 % pH 2 sėkla ir ruda – fibrilės susidariusios pH 2.4 aplinkoje su 10 % pH 2 sėkla.

Insulino fibrilių formavimasi fosfatiniame buferyje su sėkla, kaip ir fibrilių formavimasi sunkiame fosfatiniame buferyje, lemia ne aplinka, kurioje formuojasi fibrilės, bet sėklos tipas, nuo kurios prasideda agregacija. Fibrilės susidariusios su pH 2 sėkla (**Pav. 3.6**) pagrindinį spektro minimumą rodo ties $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$, nepriklausomai ar mėginių aplinką buvo pH 2.4 ar tokia pat pH 2.

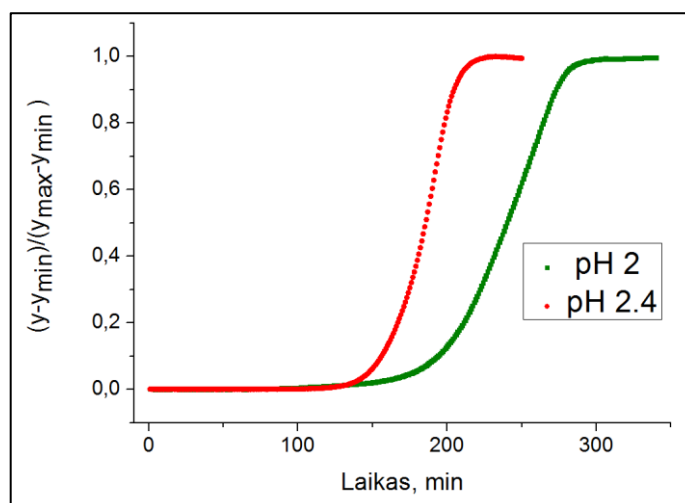


Pav. 3.7 Antrinės išvestinės FT-IR spektrai. Raudona linija – fibrilės susidariusios pH 2.4 aplinkoje, kurios panaudotos kaip sėkla. Violetinė spalva – fibrilės susidariusios pH 2.4 aplinkoje su 0.1 % pH 2.4 sėkla, ruda – fibrilės susidariusios pH 2.4 aplinkoje su 10 % pH 2.4 sėkla, žalia – fibrilės susidariusios pH 2 aplinkoje su 0.1 % pH 2.4 sėkla ir mėlyna – fibrilės susidariusios pH 2 aplinkoje su 10 % pH 2 sėkla.

Insulino fibrilės susiformavusios mėginyje esant pH 2.4 aplinkoje susidariusia sėkla, skirtingose pH sąlygose, išlaiko panašią struktūrą į sėklos (paveikslas **3.7**). Mėginiai pagrindinį spektro minimumą rodo $\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$, o silpnesnį spektro minimumą ties $\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$ bangos skaičiaus. Remiantis šiais duomenimis, galima teigti, jog fibrilės susiformavusios su pH 2.4 sėkla išlaiko panašią struktūrą į sėklos, nepriklausomai nuo tirtų pH sąlygų.

3.5. Insulino fibrilių susidarymo kinetika

Skirtingos aplinkos sąlygos daro skirtingą poveikį baltymo konformacijai, susidarančių fibrilių struktūrai ir kinetikai. Norint išsiaiškinti, kaip aplinkos pH sąlygos veikia agregatų susidarymo kinetiką, buvo atliekama spontaniinė insulino agregacija skirtingose pH/pH* sąlygose.



Pav. 3.8 Spontaninės agregacijos kinetikos palyginimas. Mėginiai ruošti pagal 2.3.6 skyriaus aprašą. Raudona spalva – agregatų susidarymo kinetika pH 2.4 aplinkoje, žalia spalva – agregatų susidarymo kinetika pH 2 aplinkoje.

Spontaninė insulino agregacija buvo vykdoma pH 1.6, 2 ir 2.4 60 °C temperatūroje 100 mM fosfatiniame buferyje. Atlikus agregaciją buvo nustatyta, jog tirtose pH ribose insulinas greičiausiai agreguoja, kai aplinkos pH siekia 2.4 (**Pav. 3.8**). Esant tokiai pH reikšmei 1 mM insulino tirpalas 60 °C temperatūroje pasiekia pusę fluorescencijos intensyvumo per 185 min (**3 lentelė**). Prie pH 2 insulinas pasiekia pusę intensyvumo ties 240 min, o prie pH 1.6 insulino agregacija pasiekia pusiaukelę per 557 min. Insulino fibrilių susidarymas pH aplinkose, kuriose formuojasi skirtingi fibrilių tipai, skiriasi. Insulinas pH 2.4 suagreguoja 55 min. greičiau nei pH 2 aplinkoje.

3 lentelė. Skirtingose pH sąlygose ruoštų mėginių kinetiniai duomenys, kur x_0 – laikas, kai pasiekiamas pusė fluorescencijos maksimumo reikšmės, *lag* – lag fazės laikas. Duomenys pateikti iš 10 pakartojimų.

Mėginio pH	x_0 laikas, min	<i>lag</i> laikas, min
1.6	557 ± 37	397 ± 38
2	240 ± 5	207 ± 5
2.4	185 ± 10	162 ± 8

Spontaninė insulino agregacija sunkiame fosfatiniame buferyje vyksta kiek kitaip, nei fosfatiniame buferyje. Agregacija buvo vykdoma pH [1.6 – 2] ribos (**4 lentelė**). Atlikus agregaciją buvo pastebėta jog, ji greičiausiai vyksta, kai aplinkos pH* 1.9. Pusę fluorescencijos intensyvumo pasiekia per 291 min. Aukštesniame pH* ar palaipsniui mažinant pH* reikšme agregacijos laikas ilgėja. Tuo pačiu ilgėja ir *lag* fazės laikas. Insulino fibrilių susidarymas pH*

aplinkose, kuriose formuojasi skirtingi fibrilių tipai, skiriasi. Insulinas pH* 2 aplinkoje suagreguoja 419 min. greičiau nei pH* 1.6.

4 lentelė. Apskaičiuoti skirtingomis pH* sąlygomis ruoštų mėginių spontaninės kinetikos duomenys. Mėginiai ruošti sunkiame fosfatiniame buferyje. Duomenys pateikti iš 6 pakartojimų.

Mėginio pH*	x_0 laikas, min	<i>lag</i> laikas, min
1.6	786 ± 54	670 ± 64
1.7	563 ± 18	471 ± 15
1.8	383 ± 3	306 ± 3
1.9	291 ± 31	246 ± 26
2	367 ± 19	323 ± 17

Lyginant agregacijos kinetinius duomenis galima pastebėti, jog agregacija fosfatiniame buferyje (tirpiklis H₂O) ir sunkiame fosfatiniame buferyje (tirpiklis D₂O) skiriasi. Greičiausiai agregacija vyksta pH 2.4 FB ir pH* 1.9 SFB.

IŠVADOS

1. Insulino amiloidinių fibrilių, susidariusių pH 2 ir pH 2.4 normaliame vandenyje ir pH* 1.6 ir pH* 2 sunkiame vandenyje, turi skirtingas struktūras.
2. Skirtingų tipų agregatai sugeba daugintis, išlaikydamos savo struktūrą nepalankiomis sąlygomis.
3. Insulinas tik šiek tiek (<1,3 karto) greičiau agreguoja prie pH 2.4 nei prie pH 2. Tuo tarpu sunkaus vandens aplinkoje prie pH* 2 jis agreguoja 2 kartus greičiau nei prie pH* 1.6

LITERATŪRA

- Banerjee, V., Das, K. P. (2012). Modulation of pathway of insulin fibrillation by a small molecule helix inducer 2,2,2-trifluoroethanol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 142–150.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (pp. 1–237).
- Biancalana, M., Koide, S. (2012). Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta*, 29(7), 997–1003.
- Bundi, A., Wüthrich, K. (1979). ¹H-nmr parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers*, 18, 285–297.
- Chiti, F., Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 333–366.
- Dzwolak, W., Smirnovas, V., Jansen, R., Winter, R. (2004). Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner: an FT-IR spectroscopic study. *Protein Science*, 13, 1927–1932.
- Gillam, J. E., MacPhee, C. E. (2013). Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *Journal of Physics. Condensed Matter*, 25.
- Glusoe, P. K., Long, F. A. (1960). Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *Physical Chemistry*, 64, 188–190.
- 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. *FEBS Journal*, 276, 5960–5972.
- Ivanova, M. I., Sievers, S. a, Sawaya, M. R., Wall, J. S., Eisenberg, D. (2009). Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18990–18995.
- Kong, J., Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549–559.
- Kurouski, D., Lombardi, R. a, Dukor, R. K., Lednev, I. K., Nafie, L. a. (2010). Direct observation and pH control of reversed supramolecular chirality in insulin fibrils by vibrational circular dichroism. *The Royal Society of Chemistry*, 46, 7154–7156.

- Lyubchenko, Y. L., Sherman, S., Shlyakhtenko, L. S. (2006). Nanoimaging for protein misfolding and related diseases. *J Cell Biochem.*, 9(1), 1–14.
- Mildažienė, V., Kadziauskas, J., Daugelavičius, R., Laurinavičius, V., Naučienė, Z., Bironaitė, D. (1999). *Struktūrinė biochemija* (pp. 1–105).
- Nielsen, L., Frokjaer, S., Brange, J., Uversky, V. N., Fink, a. L. (2001). Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry*, 40, 8397–8409.
- Nilsson, M. R. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34, 151–160.
- Sipe, J. D., Cohen, a S. (2000). Review: history of the amyloid fibril. *Journal of Structural Biology*, 130, 88–98.
- Smith, G. D., Swenson, D. C., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Reynolds, C. D. (1984). Structural stability in the 4-zinc human insulin hexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(November), 7093–7097.
- Soto, C. (1999). Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches. *Journal of Molecular Medicine*, 77, 412–418.
- Xing, Y., Higuchi, K. (2002). Amyloid fibril proteins. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 1625–1636.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju baigiamojo darbo vadovams lekt. Ričardui Mališauskui ir dr. Vytautui Smirnovui už suteiktas žinias, naudingus patarimus bei pastabas baigiamojo bakalauro darbo metu.