



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
ORGANINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

Rūta Sniečkutė

Farmacinė chemija

Magistro baigiamasis darbas

**FLAVONŲ ĮTAKOS PELĖS PRIONINIO BALTYMO IR A β 42
AMILOIDINEI AGREGACIJAI TYRIMAS**

Darbo vadovas (-ė):
Dr. Vytautas Smirnovas

Konsultantas (-ė):
Andrius Sakalauskas

Vilnius, 2022

Flavonų įtakos pelės prioninio baltymo ir A β 42 amiloidinei agregacijai tyrimas

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Amiloidų tyrimų grupėje

Rūta Sniečkutė

/parašas/

Darbo vadovas:

Leisti/neleisti gintis:

Vytautas Smirnovas

/parašas/

Įrašo data

TURINYS

Santrumpos	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Neurodegeneracinės ligos	8
1.1.1. Alzheimerio liga	8
1.1.2. Prioninės ligos.....	8
1.2. Amiloidiniai baltymai	9
1.2.1. APP baltymas ir Amiloidas β	9
1.2.2. PrP ^C ir PrP ^{Sc}	11
1.2.2.1. MoPrP89-230 ir MoPrP23-143.....	12
1.3. Amiloidinės agregacijos mechanizmas	13
1.3.1. Tioflavinas T	15
1.3.2. Atominės jėgos mikroskopija	15
1.4. Baltymų koagregacija.....	17
1.4.1. A β ir PrP sąveika	18
1.5. Slopikliai	19
1.5.1. Flavonai	19
1.5.2. Flavonai amiloidinėje agregacijoje	20
1.6. Citotoksiškumas	21
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	22
2.1. Medžiagos	22
2.1.1. Reagentai	22
2.1.2. Tirpalai.....	23
2.1.3. Mitybinės terpės.....	23
2.1.4. Laboratorinė įranga ir priemonės.....	23
2.2. Metodai.....	24
2.2.1. Neoksiduotų flavonų paruošimas.....	24
2.2.2. Flavonų oksidacija	24
2.2.3. Spontaniinė baltymų agregacija	25
2.2.4. Spontaniinė agregacija veikiant flavonais.....	25
2.2.5. Ląstelių auginimas	25
2.2.6. Ląstelių gyvybingumo testas – MTT	26
2.2.7. Atominės jėgos mikroskopija	26
2.2.8. Kinetikos duomenų normalizavimas	26

3. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
3.1. Rekombinantinių MoPrP mutantų ir A β agregacijos tyrimas	28
3.2. Rekombinantinių MoPrP mutantų ir A β morfologijos tyrimas.....	30
3.3. Flavonų įtaka MoPrP mutantų ir A β agregacijai.....	31
3.3.1. MoPrP23-143 ir A β	31
3.3.2. MoPrP89-230 ir A β	34
3.3.3. Suvestinė	39
IŠVADOS	41
Santrauka	42
Summary.....	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS	44
PRIEDAI	53

Santrumpos

AJM – atominės jėgos mikroskopas;
APP – amiloido beta pirmtako baltymas (*angl.* Amyloid precursor protein);
APTES – 3-aminopropiltrietoksisilanas;
A β – amiloidas beta;
CNS – centrinė nervų sistema;
DMSO – dimetilsulfoksidai;
FBS – jaučio vaisiaus serumas (*angl.* Fetal Bovine Serum);
gCJD – genetinė Creutzfeldt-Jakob liga (*angl.* genetic Creutzfeldt-Jakob disease);
GPI – glikozilfosfatidilinozitolis;
GSS – Gerstmann-Sträussler-Schneiker sindromas;
HaPrP – žiurkėno prioninis baltymas;
HuPrP – žmogaus prioninis baltymas;
MoPrP – pelės prioninis baltymas;
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltet-tetrazolio bromidas;
NADH – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas;
ND – neurodegeneracinės ligos;
PBS – fosfato buferinis tirpalas;
PrP – prioninis baltymas;
PrP^C – ląstelinės formos prioninis baltymas;
PrP^{Sc} – infektyvios formos prioninis baltymas;
sCJD – sporadinė Creutzfeldt-Jakob liga (*angl.* sporadic Creutzfeldt-Jakob disease);
ThT – tioflavinas T;
TRIS – trisaminometanas.

ĮVADAS

Neurodegeneracinės ligos, tai nervinių ląstelių pažeidimų ir nykimo sukelti mirtini neurologiniai sutrikimai. Ląstelių, audinių pažeidimas atsiranda dėl toksiškų fibrilinių agregatų kaupimosi, kuriuos sudaro amiloidiniai baltymai. Kiekvienas neurodegeneracinis sutrikimas yra asocijuojamas su atitinkamu amiloidiniu baltymu: Parkinsono liga su α -sinukleinu, Alzheimerio liga su amiloidu- β ($A\beta$) ir *tau* baltymu, transmisinės spongiforminės encefalopatijos su prioniniu baltymu (PrP).

Įvairūs pokyčiai ląstelinėje aplinkoje (temperatūra, pasikeitusios druskų koncentracijos ar pH) gali inicijuoti natyvaus baltymo struktūros persitvarkymus. Pakitus baltymo struktūrai, toliau yra paleidžiama amiloidinės agregacijos kaskada. Nepaisant to, kad kiekvienam ligos sukėlėjui būdingi specifiniai konformaciniai pokyčiai, agregatų formavimosi principas visiems baltymams yra gana panašus. Viskas prasideda nuo pirminių amiloidinio baltymo struktūrinių pokyčių, po kurių seka agregatų ilgėjimo stadija. Galiausiai pasiekiami stacionari fazė, kur gaunami pilnai suformuoti amiloidiniai agregatai. Taip pat šių procesų metu gali vykti ir antrinė nukleacija. Čia nauji agregacijos iniciatoriai susidaro skylant amiloidinėms fibrilėms atsitiktinėse vietose. Tuo tarpu gyvuose organizmuose agregacijos procesą gali veikti ląstelių baltymų kompleksai ar susidaranti sąveikos tarp įvairių, skirtingas funkcijas atliekančių, baltymų. Alzheimerio ligos atveju, yra svarbūs ryšiai susidarantys tarp su liga asocijuoto baltymo amiloido- β ($A\beta$) ir ląstelinio prioninio baltymo. Pastarasis būdamas didelio afiniškumo receptorių $A\beta$ oligomerams, geba reguliuoti tolimesnius amiloidinės agregacijos procesus. Eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad tam tikros sekos žmogaus prioninio baltymo mutantai jungdamiesi su $A\beta$ koagreguoja ir lėtina fibrilių susidarymą. Deja, slopinamų procesų metu susidarantys tarpiniai/galutiniai produktai pasižymi pasidėjusiu toksiškumu ląstelėms. Šiuo metu didelis dėmesys skiriamas įvairių potencialiai slopinančių junginių tyrimams, kurie galėtų sumažinti agregatų neurotoksiškumą. Amiloidiniai slopikliai gali veikti stabilizuodami baltymo struktūrą ar inhibuodami amiloidinių fibrilių ilgėjimo procesus. Tai lemia, kad neurotoksiškumo mažinimas yra tiesiogiai susijęs su amiloidinės agregacijos procesų slopinimu.

Neurodegeneracinių ligų atveju, svarbiausias veiksnys apsprendžiantis ar potencialus gydymo būdas, vaistas bus veiksmingas, yra kraujo-smegenų barjeras (*angl.* blood-brain barrier). Flavonai yra būtent tokio tipo junginiai, kurie ne tik pereina tarp kraujo ir smegenų esantį barjerą, bet pasižymi ir kitais farmakologiniais poveikiais. Tai iš augalų išskiriami antriniai metabolitai, heterocikliniai organiniai junginiai, kurių molekulės pagrindas sudarytas iš 2-fenil-1-benzopiran-4-ketono. Be neuroprotekcinų, antioksidacinių ir priešuždegiminių savybių, flavonai pasižymi ir anti-amiloidiniu efektu. Pastarasis pastebimas amiloidiniam baltymui, jo tarpiniams ar galutiniams produktams

sąveikaujant su atitinkamu flavonu. Nors tiksliai nėra žinoma, koku būdu polifenoliniai junginiai slopina amiloidinę agregaciją, tačiau manoma, kad tai susiję su pakaitais prisijungusiais prie trijų pagrindinių žiedų.

Darbo tikslas

Esant fiziologinėms sąlygoms įvykdyti pelės prioninio baltymo MoPrP ir A β 42 agregaciją veikiant flavonais ir įvertinti susidarantių agregatų poveikį ląstelėms.

Uždaviniai

1. Įvertinti pelės prioninių baltymų MoPrP mutantų (MoPrP23-143 ir MoPrP89-230) poveikį A β 42 agregacijos procesui;
2. Atlikti pelės prioninio baltymo MoPrP (MoPrP23-143 ir MoPrP89-230) ir A β 42 agregaciją kartu su neoksiduotais/oksiduotais flavonais ir įvertinti flavonų įtaką amiloidinei agregacijai;
3. Atlikti pelės prioninio baltymo (MoPrP23-143 ir MoPrP89-230), A β 42 ir flavonų citotoksiškumo tyrimus, įvertinti susidarantių produktų poveikį ląstelėms.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Neurodegeneracinės ligos

Neurologiniai sutrikimai yra grupė ligų kurios gali paveikti tiek centrinę, tiek periferinę nervų sistemą. Šios ligos atsiranda dėl daugybės faktorių: nervų sistemos pažeidimai, oksidacinis stresas, lėtinė smegenų išemija, virusiniai bei prioniniai užsikrėtimai, neįprastas baltymų kaupimasis (agregacija) nerviniame audinyje, imuninės sistemos sukeltas (autoimuninis) neuronų nykimas, baltymų struktūrų pakitimai. Priklausomai nuo to, kuri nervų sistemos dalis pažeista, galimi trys fiziologiniai pakitimai – neuronų praradimas, gliozė (randinio audinio susidarymas) arba nervinių ląstelių mielino dangalo pažeidimai. Visa tai pasireiškia per žmogaus elgsenos pakitimus bei motorikos sutrikimus (Dugger, Dickson 2017; Barnham, Masters, Bush 2004).

Ne visoms nervų sistemos ligoms yra būdingi tie patys simptomai. Smegenų neurologinis sutrikimas gali pasireikšti žmogaus asmenybės pokyčiais ar atminties praradimu, būdinga sergant Alzheimerio liga. Sumažėjęs gebėjimas judėti ir dėmesio stoka pasireiškia Parkinsono ligą turintiems pacientams, o silpnumas ir aplinkos pažinimo sumažėjimas – amiotrofinę lateralinę sklerozę (Li et al. 2013).

1.1.1. Alzheimerio liga

Alzheimerio liga yra viena dažniausiai pasireiškiančių demencijos formų vyresnio amžiaus žmonėms. Ligos eiga susijusi su neuronų ląstelių nykimu ir dviejų rūšių pakitimais smegenyse (Kumar, Singh, Ekavali 2015). Pirmasis, ekstraląstelinės sankaupos, plokštelės sudarytos iš amiloido beta (A β) baltymų agregatų. Antras, viduląsteliniai neurofibriliniai tinklai (agregatai), kurie sudaryti iš *tau* baltymo fosforilintų formų (Weis et al. 2019). Nors Alzheimerio ligos patogenezė apima abiejų tipų agregatų neurotoksišką poveikį, manoma, kad pirminis ligos progresavimas yra susijęs tik su A β agregatais. Tuo tarpu pakitęs *tau* baltymas yra atsakingas už toksiškumą ir neuronų funkcijos sutrikimus (Kinney et al. 2018; Anwal 2021). Visų šių pakitimų pasekoje yra sukeliama metabolinė disfunkcija, neuronų bei jų sinapsių žūtis. Ligai progresuojant, pasireiškia kognityviniai simptomai (atminties, suvokimo, kalbos sutrikimai), elgsenos ir emociniai sutrikimai, simptominė epilepsija (Joe, Ringman 2019).

1.1.2. Prioninės ligos

Prioninės ligos yra greitai progresuojančių ir mirtinų neurodegeneracinių ligų grupė. Ligos pradžią lemia konformaciniai ląstelinio prioninio baltymo (PrP^C) pokyčiai. Pakitimai gali atsirasti dėl

įvairių aplinkos veiksnių, fiziologinių pokyčių ar nervinės sistemos pažeidimų. Įvykus struktūriniais pokyčiams yra gaunama patogeniška bei infektyvi baltymo forma – PrP^{Sc} (Sigurdson, Bartz, Glatzel 2019). Pastarasis veikia kaip iniciatorius, kuris skatina tolimesnį PrP^C vartimą į PrP^{Sc}. Kitu atveju, liga gali atsirasti dėl genetinės mutacijos prioninio baltymo *PRNP* gene, kas lemia linkusio agreguoti, mutantinio baltymo sintezę (Kim et al. 2018). Tokie molekuliniai pakitimai, vykstantys nervinėje sistemoje, sukelia įvairias fiziologines disfunkcijas: akių paralyžius, aklumas, smegenų audinio sumažėjimas, demencija, drebulys, sutrikęs miegas (Baldwin, Correll 2019).

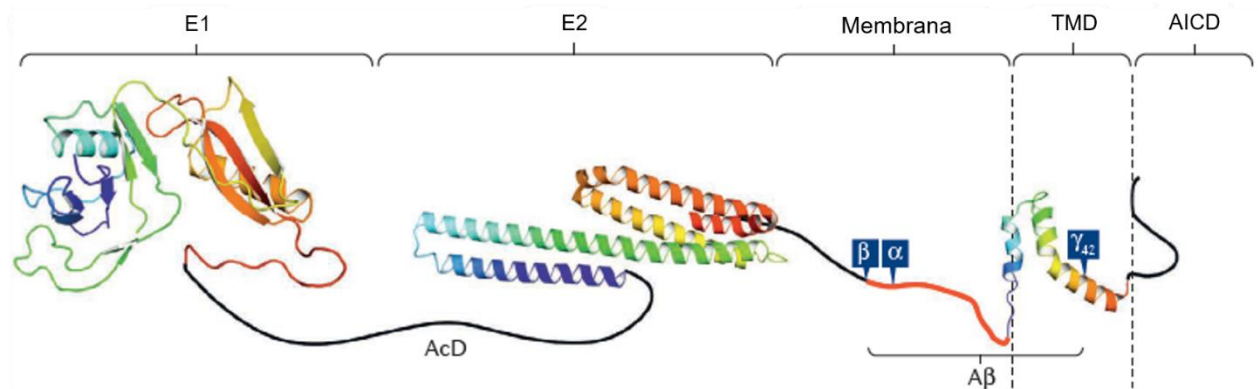
Nors ligos sukėlėjas yra tas pats patogeninis baltymas, tačiau esantys minimalūs skirtumai tarp žmonių ir gyvūnų baltymų sekų lemia skirtingų ligų atsiradimą. Tokios ligos kaip galvijų spongiforminė encefalopatija, lėtinė išsekimo liga (pasireiškia elniams), avių skrepi liga yra būdingos tik gyvūnams. Tuo tarpu žmonių prioninės ligos skirstomos į spontanas, užkrečiamas ir genetines. Viena pagrindinių spontaninio tipo ligų yra spontanišė Creutzfeldt-Jakob liga, kuri sudaro didžiausią dalį prioninių ligų atvejų. Šiek tiek mažesnę procentą visų prioninių žmogaus ligų sudaro genetinės ligos (genetinė Creutzfeldt-Jakob liga, Gerstmann-Sträussler-Schneiker sindromas). Kaip ir minėta anksčiau, šio tipo ligas sukelia *PRNP* geno mutacijos. Rečiausiai pasitaikančios yra užkrečiamos prioninės ligos, kurios pernešamos per prionais užterštus chirurginius instrumentus ar transmisine spongiformine encefalopatija užkrėstos mėsos vartojimą (Kuru, jatrogeninė Creutzfeldt-Jakob liga) (Ironsides, Ritchie, Head 2018).

1.2. Amiloidiniai baltymai

1.2.1. APP baltymas ir Amiloidas β

Amiloidas beta ($A\beta$), tai iš amiloido beta pirmtako (angl. *amyloid precursor-protein*) – APP baltymo – proteolitinio karpymo metu susidarantis peptidas. APP baltymas yra pirmo tipo transmembraninis glikoproteinas. Šiai baltymų šeimai taip pat priklauso žinduolių APLP1 ir APLP2 (angl. *amyloid precursor-like protein*) baltymai. Pastarieji turi didelius ekstraląstelinis domenus, tik vieną kartą kerta plazminę membraną, sintetinami panašiu principu kaip ir APP, tačiau neturi amiloido beta pirmtako baltymui būdingos $A\beta$ sekos (van der Kant, Goldstein 2015). APP baltymas taip pat turi didelį ekstraląstelinį domeną ir trumpą citoplazminę uodegą (AICD). Ekstraląstelinį domeną sudaro vienas nuo kito nepriklausomai susilankstę E1 (sudaro α -spirales, β -klostės) ir E2 (sudaro α -spirales) subdomenai. Pastaruosius tarpusavyje jungia AcD domenas, kurį sudaro glutamo ir asparto rūgštys. Toliau seka membranos regionas jungiantis E2 ir transmembraninį domeną. Šiame regione yra išsidėsčiusios alfa ir beta sekretazių skėlimo sritys. Tuo tarpu γ -sekretazės skėlimo sritis

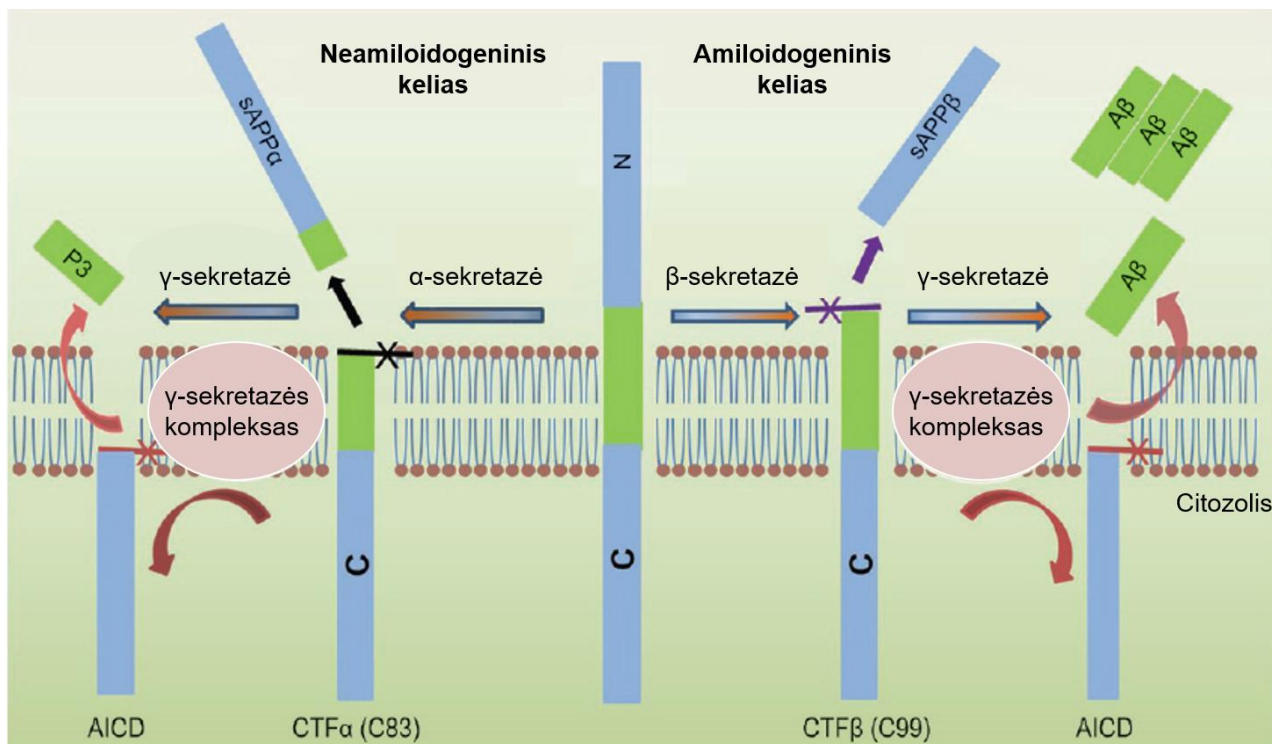
yra transmembraniniame domene (Müller, Deller, Korte 2017; Dawkins, Small 2014). Pilna APP baltymo struktūra yra pateikiama 1.1 paveikslėlyje.



1.1 pav. APP baltymo struktūra (Müller, Deller, Korte 2017). TMD – transmembraninis domenas, AICD – APP baltymo viduląstelinis domenas, AcD – rūgštinis domenas (glutamo ir asparto rūgštys), Aβ – amiloidogeninis fragmentas. α, β ir γ42 žymi atitinkamos sekretazės skėlimo vietą.

Nepaisant to, kad APP baltymas turi amiloidogeninį fragmentą, susidarantis produktas ne visada bus tas pats amiloidas beta. Kuris proteolitinis kelias bus vykdomas (amiloidogeninis ar neamiloidogeninis), apsprendžia procese dalyvaujančios sekretazės (1.2 pav.). Amiloidogeninio brendimo metu APP baltymas pirmiausia yra skeliamas β-sekretazės. Susidaro tirpi APP forma (sAPPβ) ir C-galinis fragmentas (βAPP-CTF). Po to βAPP-CTF fragmentas yra kerpamas γ-sekretazės, ko pasekoje yra gaunamas amiloidogeninis Aβ peptidas ir viduląstelinis APP domenas – AICD. Tuo tarpu neamiloidogeninis kelias vyksta APP baltymą kerpant α-sekretazei. Skėlimas vyksta Aβ sekos srityje, gaunamas tirpus sAPPα fragmentas ir į membraną įsiterpęs αAPP-CTF. Pastarasis toliau yra kerpamas γ-sekretazės ir susidaro P3 peptidas ir AICD (Chen et al. 2017; Wilkins, Swerdlow 2017; Dawkins, Small 2014).

Vykstant nuosekliam β ir γ-sekretazių APP baltymo karpymui gali būti gaunami dviejų rūšių amiloido β peptidai – Aβ40 (40 aminorūgščių) ir Aβ42 (42 aminorūgštys). Aβ40 pasižymi mažesniu toksiškumu nei Aβ42. Tuo tarpu Aβ42 yra tirpus, bestruktūris, ypač neurotoksiškas, linkęs spontaniškai agreguoti bei skatina tolimesnę tiek Aβ, tiek tau baltymo agregaciją. Vykstant Aβ40/Aβ42 agregacijai yra blokuojami jonų kanalai, padidėja mitochondrijų oksidacinis stresas, pakinta kalcio homeostazė, sutrinka ląstelių energetiniai procesai. Visi šie pakitimai galiausiai sukelia nervinių ląstelių mirtį (Niu et al. 2018; O’Brien, Wong 2011).



1.2 pav. Žmogaus APP baltymo proteolizė, amiloidogeninis ir neamiloidogeninis kelias (Chen et al. 2017).

1.2.2. PrP^C ir PrP^{Sc}

Tiek žmogaus, tiek gyvūno centrinėje nervų sistemoje gali būti aptinkami dviejų izoformų prioniniai baltymai. Vienas jų – daugiafunkcinis ląstelinis prioninis baltymas (PrP^C), sialoglikoproteinas. PrP^C yra užkoduotas *PRNP* gene ir susideda apytiksliai iš 253 aminorūgščių liekanų. Dėl baltymo brendimo metu vykstančių modifikacijų, peptido 1-22 dalis identifikuojama kaip signalinė seka, kuri yra nukerpama. Tuo tarpu aminorūgščių sekos 232-253 fragmentas modifikuojamas į glikozilfosfatidilinozitolio inkarą (GPI). Po visų šių modifikacijų yra gaunamas pilnai subrendęs baltymas, kurį sudaro 23-231 aminorūgščių seka ir GPI (Mahabadi, Taghibiglou 2020; Hughes, Halliday 2017). Pilnai susintetintas baltymas aptinkamas neuronuose: išorinėje ląstelės plazminėje membranoje, sekrecinėse pūslelėse (sinapsinės membranos), Goldžio komplekse. Pagrindinės atliekamos PrP^C funkcijos yra neuroprotekcija, jonų homeostazės palaikymas, nervinių ląstelių augimo reguliavimas, efektyvios cheminės bei elektrinės sinapsės užtikrinimas (Watts, Bourkas, Arshad 2018; Terry, Wadsworth 2019).

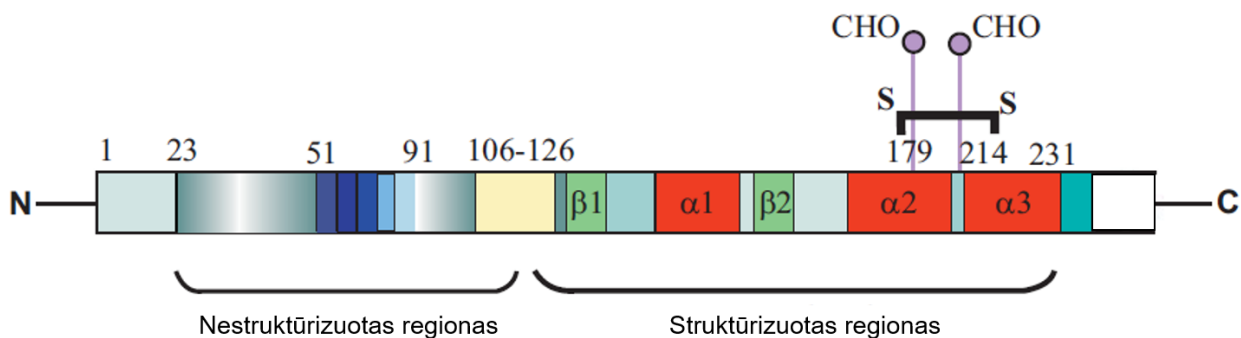
Kita prioninio baltymo izoforma, yra siejama su neurodegeneracinėmis ligomis. Tai infektyvus prioninis baltymas PrP^{Sc}, dar vadinamas „scrapie“ izoforma. Šis baltymas formuojasi iš ląstelinio PrP^C, vykstant struktūriniam baltymo pokyčiams (Wille, Requena 2018). Infektyvaus PrP susidarymas gali priklausyti nuo sąveikos vykstančios tarp ląstelinio prioninio baltymo β-klostės

srities ir PrP^{Sc} segmentų. Vis dėlto tiksli šių konformacinių pokyčių priežastis nėra žinoma. Pakitęs PrP pasižymi atsparumu proteinazei K, yra netirpus, o struktūra sudaryta iš β-klosčių (~ 47 %), kai tuo tarpu PrP^C struktūroje dominuoja α-spiralės. Dėl pakitusios baltyminės struktūros PrP tampa toksiškas, sutrikdomos įprastai ląstelinio prioninio baltymo atliekamos funkcijos (Baral et al. 2019; Kresl et al. 2019).

1.2.2.1. MoPrP89-230 ir MoPrP23-143

Prioninių baltymų tyrimams dažniausiai yra naudojami bakterijose ekspresuojami rekombinantiniai prioniniai baltymai. Šie prionai yra pranašesni už žinduolių baltymus dėl kelių struktūrinių priežasčių. Pirma, jų struktūroje išlieka disulfidinis ryšys tarp C179 ir C214. Antra, nebelieka C-galui būdingo GPI inkaro ir glikozilinimo tarp N181 ir N193. Būtent tai lemia, kad rekombinantiniai PrP yra plačiai naudojami tiriant molekulinis mechanizmus vykstančius PrP^C virstant į PrP^{Sc} (Grovesman et al. 2014; Charco et al. 2017)

Vienas populiariausių ir dažniausiai pritaikomų PrP modelių yra pelės prioninis baltymas (MoPrP). Kaip ir visi kiti prioniniai baltymai, MoPrP turi du domenų: nestruktūrizuotą N-galinį regioną, kurį sudaro aminorūgščių seka 23-120 ir struktūrizuotą C-galinį, apimančią seką 121-231 (1. 3 pav.). Laboratoriniuose tyrimuose dažniausiai yra naudojama ne pilna, o tik tam tikra dalis visos baltymo sekos. Pastarosios gali būti identifikuojamos kaip C-galinė (MoPrP 89-230) arba N-galinė (MoPrP 23-143) (Kim, Lee, Ryou 2014; Aguzzi, Calella 2009).



1.3 pav. Ląstelinis pelės prioninis baltymas (Kupfer, Hinrichs, Groschup 2009).

MoPrP23-143. Tai analogas žmogaus baltymui PrP23-144 (dar žinomam kaip Y145Stop PrP). Ląstelinei formai būdinga bestruktūrinė dalis ir β-klostyta struktūra regione nuo 110 iki 143. Taip pat geba spontaniškai formuoti amiloidines fibriles fiziologinėmis sąlygomis ir sukelia Gerstmann-Sträussler-Schneiker sindromą. Šiame fragmente dažniausiai aptinkamos dviejų tipų genetinės mutacijos: iškritos (delecijos) ir tarpai (insercijos). Tyrimų metu nustatyta, kad spontaniškai

susidariusių amiloidinių fibrilių (iš MoPrP23-143) β -struktūrinę šerdį sudaro trys β -klostės išsidėsčiusios regione nuo 112 iki 139. Nors šios pelės prioninio baltymo fibrilės turi nedidelę šerdies sritį, tačiau geba inicijuoti net pilnos sekos PrP^C vartimą infektyvia forma PrP^{Sc} (Bernardi, Bruni 2019; Hara, Sakaguchi 2020).

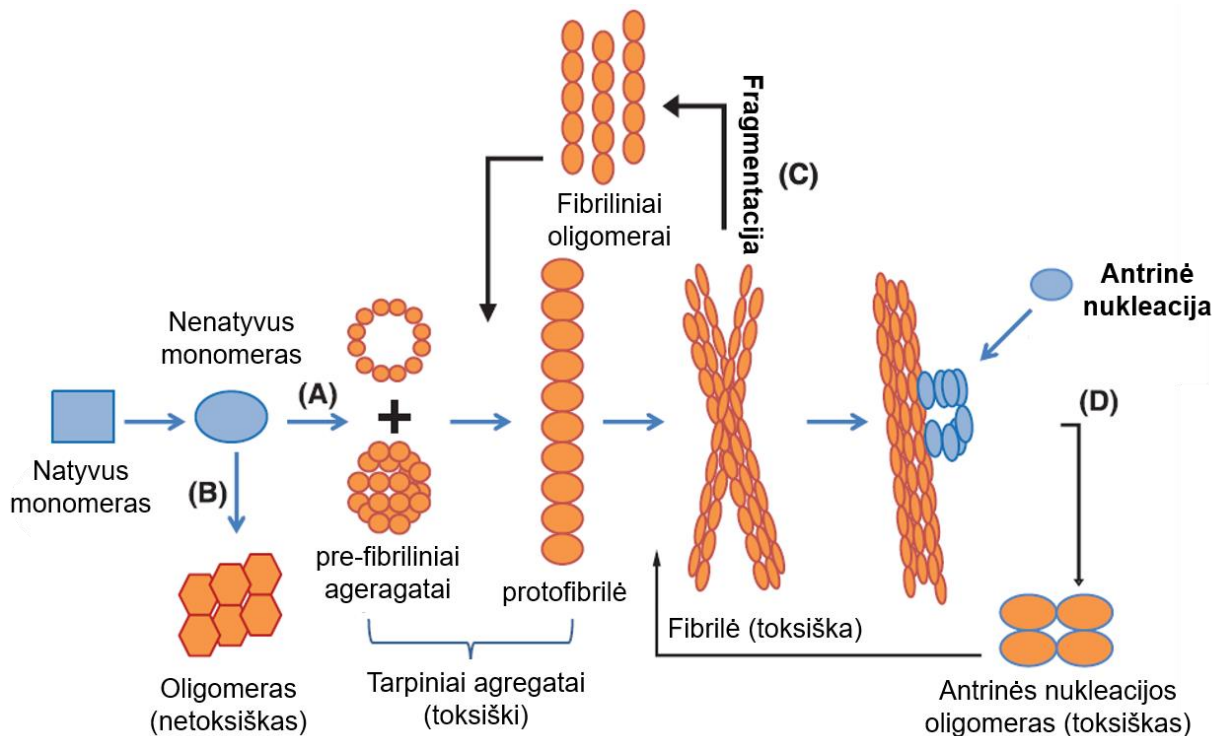
MoPrP89-230. Tai C-galo fragmentas, kuriam priešingai nei 23-143 fragmentui, būdingos taškinės mutacijos. Ląstelinę formą sudaro trys α -spirālės, trigrandė, trumpa antiparaleli β -klostė, o tarpusavyje jas stabilizuoja disulfidinės jungtys. Galiausiai gaunamos dvi dalys, $\beta 1-\alpha 1-\beta 2$ ir $\alpha 2-\alpha 3$, kurios sudaro hidrofobinę šerdį (Bernardi, Bruni 2019; Abskharon et al. 2019).

Laboratoriniams tyrimams gali būti naudojami įvairūs prioniniai baltymai: žmogaus (HuPrP), triušio (RaPrP), žiurkėno (HaPrP) ir t.t. Nepaisant to, didžioji dalis eksperimentų atliekami pasitelkiant pelės modelinį organizmą. Tai lemia lengvai manipuluojamas pelės genomus, kitiems žinduoliams ir pelėms būdinga panaši ligos patologija bei molekuliniai procesai. Viena svarbiausių šio modelio savybių yra tarprūšinis pelės-žmogaus prionų barjeras (Igel-Egalon et al. 2018). Pastarąjį gali apspręsti daugelis veiksnių: biologinis rūšių barjeras, rūšiai būdinga prioninio baltymo aminorūgščių seka (skirtumai tarp rūšių), infektyvaus PrP^{Sc} ir naujo šeimininko PrP^C struktūrinis nesuderinamumas (Ma et al. 2019). Visa tai pasireiškia pailgėjusiu infektyvaus baltymo inkubacijos laiku ir atidėta ligos iniciacija ar progresavimu (Pérez, Damberger, Wüthrich 2010; Taguchi, Nishida 2017).

1.3. Amiloidinės agregacijos mechanizmas

Įvairūs agregatai, susidarantys iš neteisingai susilankstančių ląstelinių baltymų, yra pagrindinė neurodegeneracinių ligų priežastis. Priklausomai nuo to, koks baltymas formuoja agregatus, skiriasi ir sukeliama liga: amiloidas beta ($A\beta$) sukelia Alzheimerio ligą (AD), *tau* baltymas atsakingas už AD ir demenciją, alfa-sinukleinas (α -Syn) už Parkinsono ligą, prioniniai baltymai (PrP) – prionines ligas (CJD, TSE ir t.t.) (Höglund, Salter 2013). Visi šie baltymai tarpusavyje skiriasi savo aminorūgščių sekomis, funkcijomis, dydžiu bei struktūromis. Kiekvienas amiloidinis baltymas pasižymi savitais konformaciniais pokyčiais, po kurių seka ir baltymui specifiniai tolimesni agregacijos procesai: oligomerų formavimas, branduolių susidarymas, oligomerų ilgėjimas (protofibrilių formavimas), fibrilių susidarymas ir t.t. (Scheckel, Aguzzi 2018). Visi šie pokyčiai gali atsirasti tiek dėl genetinių mutacijų, tiek dėl aplinkos veiksnių (temperatūra, pH, tam tikrų junginių koncentracijų pokyčiai) (Lévy et al. 2019; Devi et al. 2022).

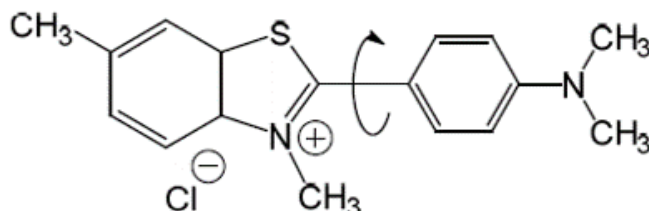
Baltymų struktūriniai pokyčiai ir tolimesnis agregacijos mechanizmas susideda iš kelių žingsnių (1.4 pav.). Pirmiausia vyksta lėta ir termodinamiškai nepalanki branduolio susidarymo stadija. Čia reakcijos greitį lemia stabilus pirminio branduolio susidarymas. Pirminė nukleacija vyksta nenatyvios struktūros monomerams jungiantis į oligomerus. Toliau seka greita ilgėjimo stadija. Prie pirmoje stadijoje susiformavusio branduolio jungiasi monomeriniai baltymai, formuojamos fibrilės (Willbold et al. 2021). Susidariusios polimerinės struktūros gali skilti (fragmentuotis) atsitiktinėse vietose taip sukurdamos naujus agregacijos branduolius (1.4 pav. C). Pastarieji toliau ilgėja prijungdami monomerus, ko pasekoje taip pat suformuojamos amiloidinės fibrilės (Zaman et al. 2019). Kitas galimas fibrilinių agregatų susidarymo kelias (1.4 pav. D) yra antrinis branduolių susidarymas: ankstesnio proceso metu gauti agregatai skatina naujų branduolių formavimąsi ant jau esamų fibrilių paviršiaus (Linse 2017). Taigi agregacijos procesas yra tiesiog natyvos baltymo struktūros pasikeitimas į struktūrą turinčią daugybę β -klosčių. Visas susidariusias amiloidines struktūras stabilizuoja vandeniliniai ryšiai bei hidrofobinės sąveikos (Lukiw 2022).



1.4 pav. Amiloidinės agregacijos mechanizmas (Verma, Vats, Taneja 2015). (A) – natyvus baltymas keičia savo konformaciją, formuoja protofibriles ir galiausiai amiloidines fibriles. (B) – nenatyvus baltymas formuoja oligomerus, kurie nelinkę formuoti amiloidinių agregatų. (C) – fibrilių fragmentacija, naujų branduolių susidarymas. (D) – antrinė nukleacija, naujų branduolių susidarymas ant fibrilių paviršiaus.

1.3.1. Tioflavinas T

Fibrilių susidarymas yra vis dar iki galo neištirti procesai, kurie glaudžiai susiję su neurodegeneraciniais sutrikimais. Pastaruoju metu atsiranda naujų metodų, kurių pagalba galima tirti baltymų struktūrinių pokyčių ir fibrilių susidarymo mechanizmus tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Vienas populiariausių metodų yra fluorescencinių dažų, besijungiančių prie amiloidinių fibrilių, naudojimas. Pirmosios medžiagos, 1875 metais pritaikytos agregatų nustatyme, buvo sieros rūgštis ir jodas. Nuo 1922 metų amiloidinių fibrilių tyrimuose plačiai naudotas Kongo raudonasis (diazotinės kilmės dažas). Laikui bėgant, buvo pastebėta, kad Kongo raudonasis jungiasi ir prie kitų aplinkoje esančių molekulių (Howie 2019). Galiausiai, nuo 1989 metų, baltymų agregacijos kinetikai stebėti, pradėtas naudoti fluorescencinis dažas tioflavinas T (ThT) (Gade Malmos et al. 2017).



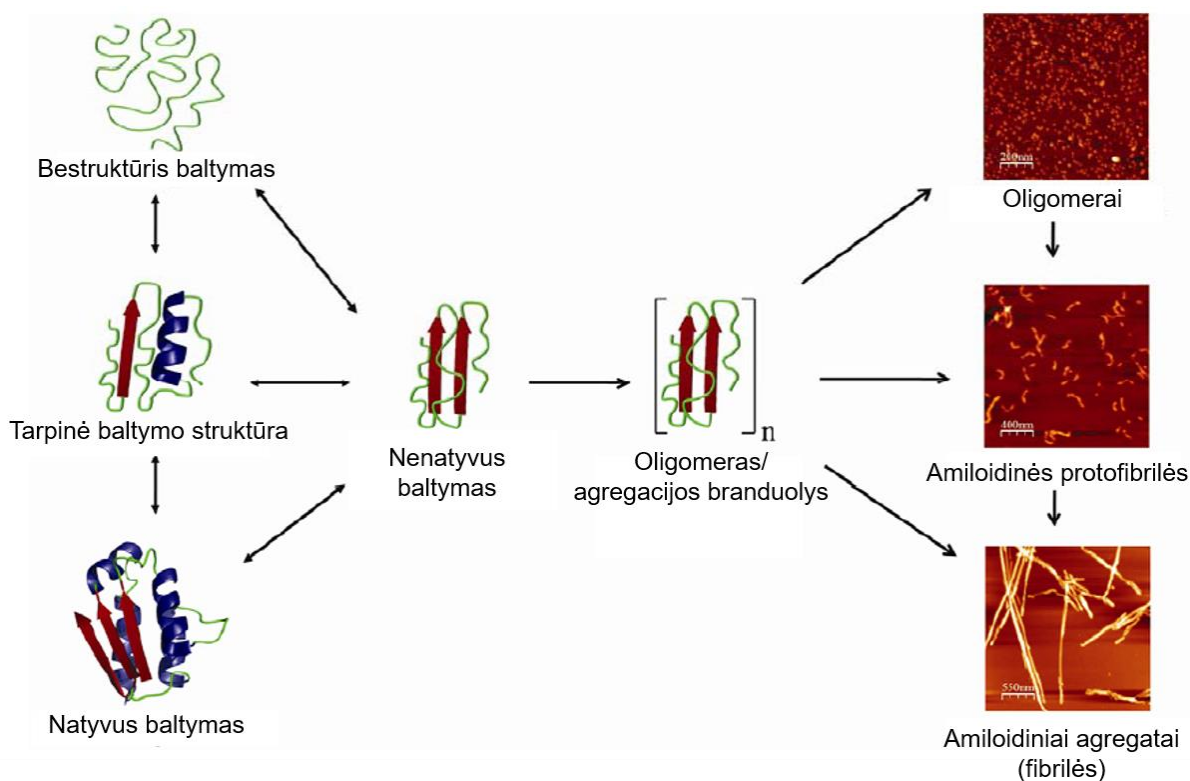
1.5 pav. Fluorescencinio dažo tioflavino T molekulinė struktūra (Qin et al. 2017).

Dėl savo specifiškumo amiloidinėms fibrilėms šis dažas vis dar yra plačiai naudojamas *in vitro* tyrimuose (Sebastiao, Quittot, Bourgault 2017). ThT molekulę sudaro laisvai apie bendrą C-C ryšį besisukantys benzotiazolio ir benzilamino žiedai (1.5 pav.), kas molekulę padaro optiškai aktyvią. Kadangi vykstant žiedų sukimuisi sunaudojama didžioji dalis sužadinto fluoroforo energijos, ThT fluorescencija būna nežymi. Išaugus fluorescencijos intensyvumui, ThT molekulei būdingas 440-450 nm sužadinimas ir 460-500 nm emisija. Vykstant dažo sąveikai su amiloidiniais agregatais, fluorescencija padidėja: β -klostės struktūros fibrilių paviršiuje suformuoja griovelius, į kuriuos patekę žiedai sustabdomi (nebegali sukis) (Ziaunys, Smirnovas 2019; Verma, Ravichandiran, Ranjan 2021).

1.3.2. Atominės jėgos mikroskopija

Įvairių amiloidinių baltymų struktūros, morfologija, tarpusavio sąveikos yra svarbūs aspektai siekiant pilnai suprasti agregatų formavimąsi bei ieškant veiksnių, galinčių paveikti šį procesą. Tam gali būti naudojami įvairūs metodai. Antrinių struktūrų (β -klosčių) tyrimams dažniausiai yra naudojama Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija, o amiloidinių baltymų

struktūrų dinaminiai pokyčiai gali būti stebimi pasitelkiant didelio greičio atominės jėgos mikroskopiją (*angl.* high-speed atomic force microscopy) (Li, Lantz, Du 2019; Konno et al. 2020). Morfologiniam bei fibrilinių agregatų kiekybiniam įvertinimui plačiausiai yra naudojama atominės jėgos mikroskopija (AJM). Dėl paprasto mėginių paruošimo, metodas yra lengvai pritaikomas įvairioms sistemoms (mėginiai gali būti analizuojami fiziologinėmis sąlygomis). AJM pagalba galima nustatyti įvairių baltymų formuojamas amiloidines fibriles bei tarpines jų struktūras (1.6 pav.) arba iš to paties baltymo kilusias skirtingas agregatų konformacijas (Ruggeri et al. 2019). Taip pat AJM pagalba yra tiriami ir kiti biologiniai objektai: membranos, audiniai, biomolekulės, ląstelės, kitos neamiloidinės fibrilinės sistemos (kolageno, fibronektino ir šilko baltymų fibrilių susidarymas) (Stylianou et al. 2019).



1.6 pav. Skirtingų amiloidinių struktūrų atvaizdavimas atominės jėgos mikroskopijos būdu (Kumar, Udgaonkar 2010).

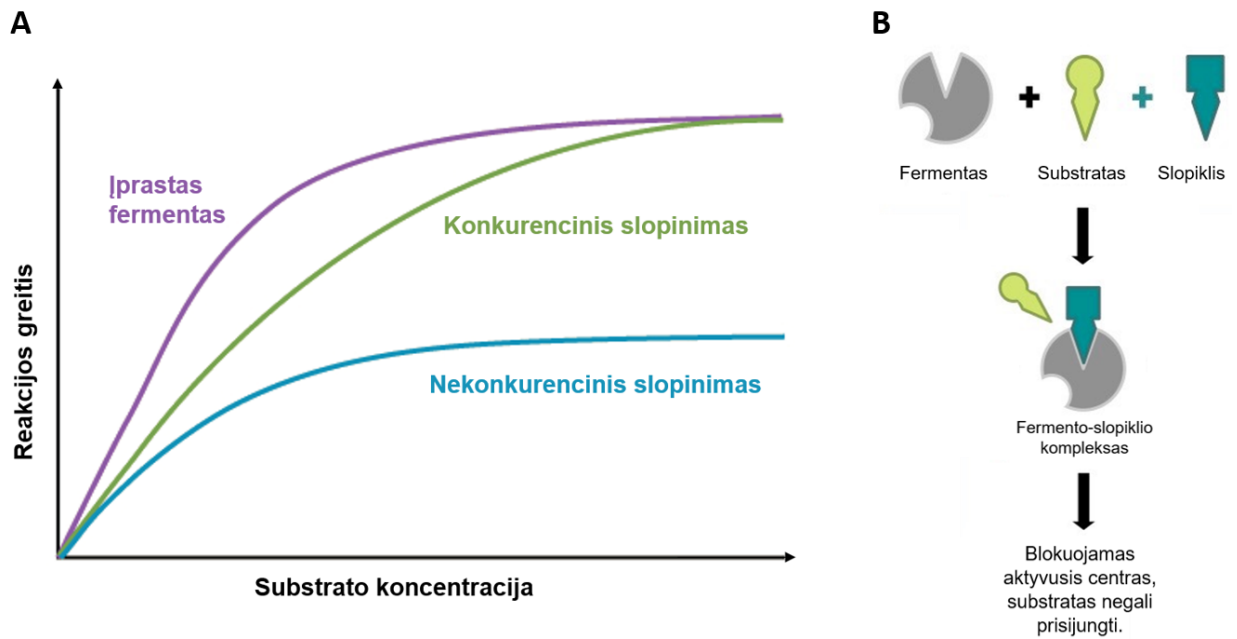
Atominės jėgos mikroskopijos ir kitų, skenuojančio zondo mikroskopijos rūšių, veikimo principas – mikroskopo adatos ir mėginio sąveika. Smaili zondo antgalio viršūnė (adatos) sudaro kontaktą su tiriamuoju paviršiumi, generuojamas signalas, kuris yra pateikiamas paviršiaus nuotraukos formatu. Visi matavimai yra atliekami nanoskalėje (Adamcik, Mezzenga 2012).

1.4. Baltymų koagregacija

Atitinkamo baltymo struktūriniai pokyčiai ir tolimesnė agregacija lemia citotoksiškų amiloidinių formų susidarymą, kurios sukelia baltymui specifines neurodegeneracines ligas: Alzheimerio liga (A β), Parkinsono liga (α -sinukleinas) ir t.t. Gyvuose organizmuose baltymai funkcionuoja įvairiose ląstelės dalyse, kur juos supa atitinkama mikroaplinka, vyksta sąveikos tarp tų pačių ar skirtingų baltymų, formuojasi baltymų kompleksai. Tokios baltymų tarpusavio sąveikos yra gana svarbios siekiant suprasti amiloidinę agregaciją ir jos galutinių/tarpinių produktų toksiškumą. Vis daugiau agregacijos tyrimų yra atliekami naudojant ne vieną, o kelis skirtingus baltymus, t.y. tiriama baltymų koagregacija (Dubey et al. 2014). Skirtingi amiloidiniai baltymai (sukeliantys skirtingas ND ligas) veikdami tarpusavyje gali vienu ar kitu būdu paveikti amiloidinę agregaciją. Kai kurie baltymai veikdami tarpusavyje gali veikti kaip agregacijos iniciatoriai ir amiloidinių produktų susidarymas bus pagreitintas. Kitu atveju, sąveika tarp dviejų skirtingų peptidų gali lemti agregacijos proceso slopinimą. Nepriklausomai kurio keliu vyks koagregacija, toks tarpusavio veikimas rodo skirtingų energijos barjerų egzistavimą vykstant heterogeninei agregacijai (Chaudhuri et al. 2019; Sarell, Stockley, Radford 2013).

Koagregacijos procesas yra susijęs su konkuruojančios struktūros įgavimu ir tarpusavio ryšių sudarymu tarp tos pačios rūšies (X-X) ir tarp kelių skirtingų rūšių (X-Y) baltymų (Bondarev et al. 2018). Nepaisant to, fibrilių formavimuisi vis vien yra būdinga su spontanine agregacija asocijuojama sigmoidinė kreivė. Eksperimentinių tyrimų metu pastebėta, kad kai kuriais atvejais, vykstant koagregacijai, gaunama sigmoidinė kreivė gali būti dviguba ar net triguba (Sneideris, Milto, Smirnovas 2015).

Skirtingi amiloidiniai baltymai pasižymi skirtingomis agregacijos ir konformacinių pokyčių kinetikomis. Tai lemia, kad vienos rūšies amiloido baltymas gali sudaryti didesnę kiekį agregatų („sėklos“), kurie agregacijos (tiek homologinės, tiek heterologinės) metu inicijuoja kito baltymo agregatų formavimąsi Pavyzdžiui, A β agregatai veikia kaip „sėkla“ skatinant α -sinukleino ir priono agregaciją. Tuo pačiu, prionas ir α -sinukleinas taip pat greitina A β agregaciją. Taip pat yra atvejų, kai sąveika tarp skirtingų baltymų lemia agregacijos slopinimą. Manoma, kad toks procesas vyksta konkurencinio slopinimo principu, būdingu fermentinėms reakcijoms (1.7 pav). Kas apsprendžia tokį veikimo mechanizmą, nėra aišku (Ivanova et al. 2021).



1.7 pav. Fermentinės reakcijos slopinimo grafikas (A) ir konkurencinio slopinimo veikimo principas (B) (Blanco, Blanco 2017).

1.4.1. A β ir PrP sąveika

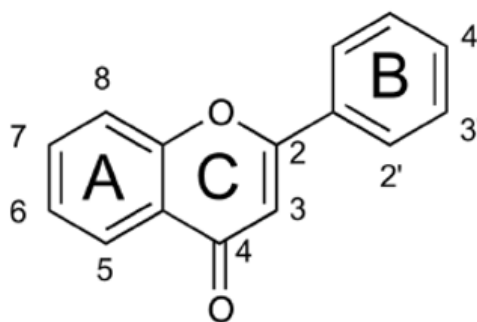
Kaip ir minėta ankstesniame skyriuje, neurodegeneracinės ligos atsiradimui bei progresavimui gyvame organizme yra svarbūs ir kiti ląstelėse aptinkami baltymai. Vieni tokių baltymų yra ląstelinis prioninis baltymas PrP^C ir amiloidas- β . Jų sudaromi tarpusavio ryšiai yra svarbūs Alzheimerio ligos atsiradimui ir patogenezei. Veikimas pagrįstas dideliu prioninio baltymo afiniškumu amiloido- β formuojamiems oligomeriniams agregatams (Jarosz-Griffiths et al. 2016). Siekiant nustatyti baltymų tarpusavio sąveikas ir sukiamą neurotoksišką poveikį, prioninio baltymo seką patogiu analizuoti dalimis. Tyrimų metu nustatyta, kad C-galo ir N-galo prioninio baltymo domenai skirtingai sąveikauja su A β 42, kas lemia ir susidariusių agregatų toksiškumą (Honda 2018). N-galo PrP23-143 dalis stabdo fibrilių susidarymą jungdamasi su A β oligomerais ir neleisdama jiems dalyvauti agregacijos procese. Šios sąveikos ląstelių tyrimai parodė sumažėjusį toksiškumą, taip pat kaip ir pilnos sekos PrP baltymas (König et al. 2021). Tuo tarpu C-galo mutantų tyrimų rezultatai rodo, kad PrP121-230 su A β nesudaro heteroagregatų (kaip PrP23-143 atveju) ir nekeičia A β oligomerų toksiškumo ląstelėms. Tačiau ląstelinio PrP fragmentai 99-107 ir 112-134, kaip ir N-galas, mažina A β agregatų toksišką poveikį (Zhang et al. 2019).

1.5. Slopikliai

1.5.1. Flavonai

Flavonoidai, tai biologiniu aktyvumu pasižyminčių polifenolinių junginių šeima, literatūroje dar įvardinama kaip flavonai. Šie iš augalų išskiriami antriniai metabolitai saugo juos nuo biotinių ar abiotinių veiksnių, veikia kaip ultravioletinių spindulių filtrai, signalinės molekulės. Maisto racione flavonoidai aptinkami vaisiuose, daržovėse, iš augalų gautuose maisto produktuose – kakavoje, arbatoje, kavoje (Yonekura-Sakakibara, Higashi, Nakabayashi 2019; Jiang, Doseff, Grotewold 2016). Nepaisant to, šie junginiai pasižymi įvairiomis farmakologinėmis ir biologinėmis funkcijomis: dalyvauja neuroprotekcijoje, turi antioksidacinių, antimikrobinių ir antialerginių savybių, naudojami vėžinių susirgimų prevencijai, saugo nuo uždegiminių procesų. Priešuždegiminis poveikis pasireiškia per reguliacinių baltymų slopinimą, uždegiminių citokinų veiklos reguliavimą bei transkripcijos faktorių aktyvacijos blokvimą (Farhadi et al. 2019; Wang, Li, Bi 2018).

Kiekvienai flavonoidų klasei būdinga savita struktūra, kurios pagrindą sudaro du aromatiniai ir vienas heterociklinis žiedas. Čia benzeno žiedas (A) jungiasi su pirono žiedu (C), kurio antroje arba trečioje pozicijoje kaip pakaitas prisijungusi fenilo grupė (1.8 pav). Remiantis prie žiedų prisijungiančiais pakaitais, jų išsidėstymu ir kiekiu, flavonoidai yra skirstomi į: flavonus, flavononus (dihydroflavononus), flavonolius, izoflavonus ir antocianidinus (Alseekh et al. 2020).



1.8 pav. Molekulinė flavono struktūra (Barreca et al. 2020).

Didžiausia įvairovė augalų karalystėje pasižymi flavonoidai. Struktūros pagrindą sudaro 2-fenil-1,4-benzopironas (1.8 pav) prie kurio (dažniausiai) 5- ir 7- pozicijoje, 3'- ir/arba 4'- pozicijoje būna prisijungusios hidroksilo grupės. Lyginant su kitomis flavonų grupėmis, ši laikoma viena efektyvių (biologiniu požiūriu). Vis dėlto priešuždegiminės flavonų savybės ypač priklauso nuo jų struktūros – prie A ir B žiedų prisijungiančių grupių išsidėstymo ir kiekio (Wang et al. 2021).

1.5.2. Flavonai amiloidinėje agregacijoje

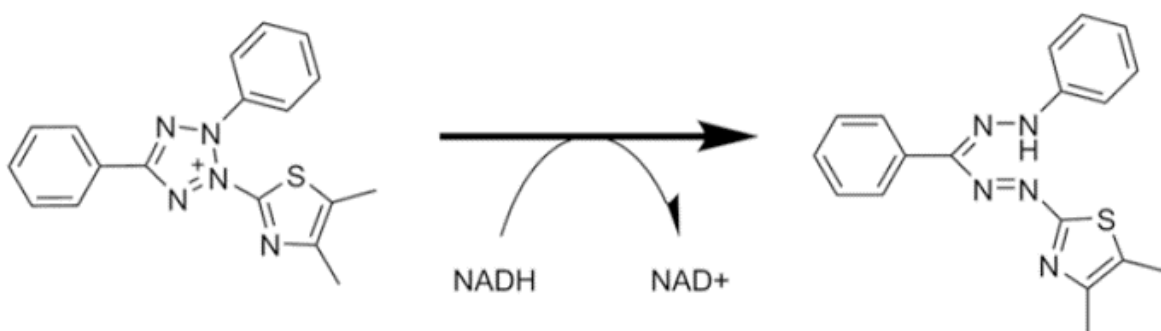
Nuolat vykstančių paieškų, nukreiptų į neurodegeneracinių ligų atsiradimo ar progresavimo stabdymą, metu vis didesnis dėmesys skiriamas augalinės kilmės junginiams. Vieni tokių junginių, kurie potencialiai galėtų veikti kaip amiloidinės agregacijos slopikliai, yra flavonai (Ayaz et al. 2019). Farmakologiniu požiūriu, šie junginiai yra lengvai prieinami, nebrangūs, stabilūs, būdinga maža šalutinių poveikių rizika, esant mažoms junginio koncentracijoms pasižymi nedideliu toksiškumu. Viena svariausių flavonų savybių – gebėjimas kirsti kraujo-smegenų barjerą (Solanki et al. 2015). Pastarasis yra ypač svarbus ieškant bei kuriant farmacinius preparatus neurodegeneracinių sutrikimų gydymui.

Tikslus flavonų veikimo mechanizmas amiloidinėje agregacijoje nėra iki galo suprantas. Ne visi flavonai sukelia vienodą efektą fibrilių formavimuisi, kas leidžia manyti, kad kiekvienas polifenolinis junginys gali būti labai specifiskas atitinkamam taikiniui. Potencialūs flavoniniai slopikliai agregacijos procesą gali paveikti labai skirtingai: neleisti susidaryti pirminiam branduoliui, slopinti fibrilinių agregatų formavimąsi, toksišką baltymo konformaciją gali pakeisti į netoksiškus agregatus (Choi et al. 2020; Singh, Kaur, Silakari 2014). Tiriant amiloidinių baltymų (α -syn, A β , tau) ir flavonoidų sąveikas daugelis tyrimų atliekama naudojant oksiduotus polifenolius. Oksidacijos procesas pradeda vykti pakitus aplinkos sąlygoms (temperatūrai, pH), ko pasekoje gaunama pakitusi flavono molekulinė struktūra. Dalinai išardoma žiedų sistema ar net susidarantys tarpiniai oksidacijos produktai gali visiškai pakeisti polifenolinių junginių savybes, atliekamas funkcijas (Sakalauskas et al. 2021). Tyrimų metu nustatyta, kad oksiduota kvercetino forma neleidžia vykti baltymo konformaciniams pokyčiams ir stabdo fibrilių ilgėjimo procesą. Panašiu agregacijos slopinimo mechanizmu pasižymi ir fisetinas (Zhu, Han, Fink 2013; Akaishi et al. 2008). Tuo tarpu morinas geba destabilizuoti susidariusias fibriles, ko pasekoje susidaro agregacijos procese toliau nedalyvaujantys tarpiniai produktai (Lemkul, Bevan 2012). Nors dalis polifenolinių junginių *in vitro* geba slopinti agregatų formavimą, *in vivo* eksperimentai nepasižymi tokiu pačiu efektyvumu. Vienas iš literatūroje daugiausiai minimų flavonų, kuris efektyviai veikia A β 42 agregacijos procesą, o gauti produktai rodo sumažėjusį citotoksiškumą, yra kempferolis. Manoma, kad šio flavono veikimo mechanizmas susijęs su baltymo hidrofobinės dalies ir flavono sąveika, kas lemia baltymo toksiškos konformacijos susidarymą (Sharoar et al. 2012).

1.6. Citotoksiškumas

Įvairius gyvus organizmus paveikus tam tikromis medžiagomis, ląstelėmis ar pakeitus aplinkos sąlygas gali atsirasti įvairios organų, audinių pažaidos, sutrikti metaboliniai procesai, kas bendrai yra vadinama toksiškumu. Konkrečiai ląstelių atveju, toksiškų veiksnių įtaka įvardijama kaip citotoksiškumas. Citotoksinės medžiagos gali sukelti ląstelių pažaidas ar mirtį, vykdant nekrozę ar apoptozę, arba sumažinti ląstelių gyvybingumą (stabdomi augimo ir dalijimosi procesai) (Freshney 2005).

Citotoksiškumo tyrimai farmacijoje yra vienas pirmųjų etapų nustatant potencialių vaistinių medžiagų (sintetinių), augalų ekstraktų ar iš augalų gautų biologiškai aktyvių junginių toksiškumą. Šiems biologiniams tyrimams naudojami įvairūs metodai bei ląstelių linijos. Tai gali būti tokie metodai kaip pažeistų ląstelių morfologinių pokyčių stebėjimas, toksiškais junginiais paveiktų ląstelių gyvybingumo ar metabolinių pokyčių matavimas (Çelik 2018). Vienas populiariausių ir paprasčiausių yra kolorimetrinis MTT gyvybingumo testas (1.9 pav.). Jo pagalba galima registruoti ląstelių dauginimąsi, gyvybingumą ir citotoksiškumą. MTT tyrimo principas pagrįstas geltonos spalvos tetrazolio druskos (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltet-tetrazolio bromido) skilimu iki galutinio produkto – purpurinės spalvos formazano, veikiant nikotinamido adenino dinukleotido fosfatui (NADH). Susidaręs formazano kristalų kiekis yra tiesiogiai proporcingas gyvų, nepažeistų ląstelių kiekiui (Stockert et al. 2012; Grela, Kozłowska, Grabowiecka 2018).



1.9 pav. Fermentinė MTT redukcija iki formazano (Präbst et al. 2017).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

2.1 lentelė. Medžiagos, naudotos darbo metu.

Gamintojas	Medžiagos ir reagentai
Acros Organics	NaOH; NaH ₂ PO ₄ ; Na ₂ HPO ₄ ; HCl; NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄ ; NaCl; KCl; KH ₂ PO ₄ .
Sigma – Aldrich	Tioflavinas T; Jaučio vaisiaus serumas (FBS).
Carl Roth	CH ₃ COOH; CH ₃ COONa; C ₂ H ₆ OS.
Gibco	DMEM auginimo terpė; Penicilinas-streptomicinas; PBS (1x); Tripsinas.
Fisher Scientific	MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltet-tetrazolio bromidas).

Baltymai:

Tyrimams naudoti baltymai – amiloidas-β, MoPrP89-230 ir MoPrP23-143 – gauti iš Vilniaus universiteto, Amiloidų tyrimų grupės.

2.1.2. Tirpalai

A. 10 mM acetatinis buferinis tirpalas (pH 4). 1 M CH₃COOH ir 1 M CH₃COONa buferiniai tirpalai sumaišomi santykiu 3:1. Tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu. pH koreguojamas atitinkamai HCl arba NaOH tirpalu. Filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

B. 10 mM natrio fosfatinis buferinis tirpalas (pH 8). pH koreguojamas atitinkamai HCl arba NaOH tirpalu. Filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

C. 20 mM natrio fosfatinis buferinis tirpalas (pH 8). pH koreguojamas atitinkamai HCl arba NaOH tirpalu. Filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

D. 10x PBS buferinis tirpalas (pH 6,8). NaCl, KCl, Na₂HPO₄ ir KH₂PO₄ ištirpinami naudojant dejonizuotą vandenį. pH koreguojamas atitinkamai HCl arba NaOH tirpalu. Filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

E. 1x PBS buferinis tirpalas (pH 7,4). 10x PBS buferinis tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu santykiu 1:10. pH koreguojamas atitinkamai HCl arba NaOH tirpalu. Filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

F. 10 % natrio dodecilsulfato su 0,01 N HCl buferinis tirpalas. NaC₁₂H₂₅SO₄ tirpinamas dejonizuotame vandenyje. Pridedama HCl, kad galutinė koncentracija tirpale būtų 0,01 N. Filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

G. 5 mg/mL MTT reakcijos mišinys. MTT milteliai tirpinami naudojant 1x PBS (*Gibco*). Filtruojama per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

2.1.3. Mitybinės terpės

Ląstelių auginimo terpė. Sterili DMEM auginimo terpė papildoma 10 % jaučio vaisiaus serumu ir 1 % penicilino-streptomicino antibiotiku. Į 500 mL DMEM auginimo terpę pilama 50 mL jaučio vaisiaus serumo (FBS) ir 5 mL antibiotiko.

2.1.4. Laboratorinė įranga ir priemonės

- Filtrai „Fisher Scientific“: 0,22 μm porų skersmens, 47 mm diametro;
- pH metras „Thermo Scientific Orion DUAL STAR meter“;
- Svarstyklės: „Kern PCB 1000-2“ ir „Denver Instruments TP-214“;

- Ultragarsinis homogenizatorius „Bandelin Sonopuls“;
- Plokštelių skaitytuvas „CLARIOstar Plus“;
- 96 šulinėlių mikroplokštelės (ThermoFisher, kataloginis numeris: 10438082);
- 96 šulinėlių plokštelės ląstelių auginimui (TPP, kataloginis numeris: 92196);
- Magnetinės maišyklės: „VARIOMAG Maxi Direct“ ir „VELP Scientifica® ARE“;
- Spektrofotometras „Nanodrop 2000“;
- Vakuuminė filtravimo sistema „Sigma-Aldrich“;
- Liofilizatorius „FreeZone Triad Freeze Dry Systems“;
- Laminarinė traukos spinta „Nuair Class II type“;
- Vakuuminė filtravimo sistema „Sigma-Aldrich“;
- Laboratoriniai inkubatoriai: „Medline Scientific™ AAH21172K“ ir „NuAire DHD AutoFlow 5510 Air Jacketed CO₂ Incubator“;
- Mikroskopas „Olympus CKX31“;
- Vandens vonelė „VWB2 series“;
- Atominės jėgos mikroskopas „Dimension Icon Bruker“.

2.2. Metodai

2.2.1. Neoksiduotų flavonų paruošimas

Neoksiduoti flavonai ruošiami taip, kad galutinė koncentracija mėgintuvėlyje būtų 20 mM. Tam pasiekti, kiekvienas atsvertas flavonas tirpinamas atitinkamame dimetilsulfoksido trūyje. Dėl tirpumo sumažėjimo, flavonas liuteolinas buvo skiedžiamas iki 15 mM.

2.2.2. Flavonų oksidacija

Kiekvienas 20 mM flavono tirpalas oksidacijai ruošiamas skiedžiant jį su 10 mM fosfatinu buferiniu tirpalu ir 10 mM dimetilsulfoksidu (DMSO). Galutinė flavono koncentracija paruoštame tirpale – 200 μM. Oksidacija vykdoma 37 °C. Po oksidacijos flavonų tirpalai liofilizuojami.

Po liofilizavimo gauti flavonai tirpinami tokia 1x PBS buferinio tirpalo tūryje, kad galutinė koncentracija būtų 400 μM.

2.2.3. Spontaninė baltymų agregacija

Agregacijos tyrimams naudoti trys baltymai: amiloidas- β ($A\beta$), MoPrP89-230 ir MoPrP23-143. Spontaninės agregacijos tyrimui iš viso ruošiami penki reakcijos mišiniai: tik amiloidas- β , tik MoPrP89-230, tik MoPrP23-143, $A\beta$ +MoPrP89-230 mišinys ir $A\beta$ +MoPrP23-143 mišinys. Kiekvienas baltymo tirpalas/tirpalai sumaišomi su 1x PBS buferiniu tirpalu ir 10 mM ThT, kad galutinė ThT koncentracija būtų 20 μ M, o baltymų koncentracijos atitinkamai: $A\beta$ – 2 μ M, MoPrP89-230 – 10 μ M ir MoPrP23-143 – 10 μ M. Spontaninės agregacijos procesas stebimas matuojant ThT fluorescencijos pokytį laike. Procesas vykdomas 37 °C temperatūroje, be purtymo. Matavimai atliekami kas 5 minutes, esant 440 nm sužadavimo ir 480 nm emisijos bangos ilgiams.

2.2.4. Spontaninė agregacija veikiant flavonais

Spontaninės agregacijos tyrimas vykdomas veikiant $A\beta$ +MoPrP mišinį neoksiduotais arba oksiduotais flavonais.

Tyrimas su neoksiduotais flavonais. Monomeriniai baltymai ($A\beta$ ir MoPrP) ir kiekvienas neoksiduoto flavono tirpalas sumaišomas su 1x PBS buferiniu tirpalu, 10 mM ThT ir DMSO, kad galutinė flavono koncentracija būtų 50 μ M, ThT koncentracija – 20 μ M, amiloido β – 2 μ M, MoPrP – 10 μ M ir 0,25 % dimetilsulfoksido.

Tyrimas su oksiduotais flavonais. Monomeriniai baltymai ($A\beta$ ir MoPrP) ir kiekvienas oksiduoto flavono tirpalas sumaišomas su 1x PBS buferiniu tirpalu ir 10 mM ThT, kad galutinė flavono koncentracija būtų 50 μ M, ThT koncentracija – 20 μ M, amiloido β – 2 μ M ir MoPrP – 10 μ M.

Agregacijos procesas vykdomas 2.2.4 skyriuje nurodytomis sąlygomis.

2.2.5. Ląstelių auginimas

Tyrimams naudojamos žmogaus neuroblastomos ląstelės SH-SY5Y įsigytos iš „American Type Culture Collection (ATCC)“ (Manasas, Virdžinija, JAV).

Ląstelės auginamos DMEM mitybinėje terpėje, papildytoje 10% jaučio vaisiaus serumo ir 1 % antibiotiko, CO₂ inkubatoriuje (37 °C temperatūroje ir augimo aplinkoje esant 5 % CO₂).

2.2.6. Ląstelių gyvybingumo testas – MTT

Žmogaus neuroblastomos ląstelės (SH-SY5Y) užsėjamos į 96 šulinėlių plokštelę, po 15000 ląstelių kiekviename šulinėlyje. Plokštelė su ląstelėmis paliekama augti per naktį. Po inkubacijos augimo terpė pakeičiama į terpę, kurioje yra atitinkamas monomerinių baltymų (Aβ ir MoPrP) ir flavono mišinys. Kaip kontrolės, naudojamos terpės, kurių sudėtyje yra: abiejų tiriamųjų baltymų ir flavono buferiniai tirpalai; vienas iš baltymų, kito baltymo ir flavono buferinis tirpalas; abu monomeriniai baltymai ir flavono buferinis tirpalas. Inkubuojama 48 valandas, CO₂ inkubatoriuje. Po 48 valandų inkubacijos į kiekvieną šulinėlį pilama paruošto 5 mg/mL koncentracijos MTT reagento (tirpalas G), kad galutinė jo koncentracija šulinėlyje būtų 10 μM. Inkubuojama 2 valandas. Po dviejų valandų susidarę formazano kristalai tirpinami į kiekvieną šulinėlį įpilant po 100 μL tirpalo F. Galiausiai matuojama sugertis naudojant 570 nm ir 690 nm bangos ilgi.

2.2.7. Atominės jėgos mikroskopija

Ant šviežiai nulupto žėručio užnešama 0,1 % v/v APTES (3-aminopropiltrioksisilano). Inkubuojama 2 minutes. Po inkubacijos žėrutis nuplaunamas 2 mL milli-Q vandens ir švelnia oro srove nudžiovinamas. 20 μL fibrilinio mėginio užnešama ant APTES reagentu padengto žėručio ir inkubuojama 2 minutes. Po dviejų minučių žėrutis yra nuplaunamas 2 mL milli-Q vandens, švelnia oro srove nudžiovinamas. Paruošti mėginiai yra atvaizduojami naudojant atominės jėgos mikroskopą „Dimension Icon Bruker“. Naudoti parametrai: 10 μm plotas, aukšta rezoliucija (1024 × 1024 pikselių), matavimo greitis 0,5 Hz.

Vaizdiniai analizuojami programine įranga „Gwyddion“.

2.2.8. Kinetikos duomenų normalizavimas

Agregacijos proceso kinetinės kreivės yra gaunamos atitinkamame laiko intervale registruojant tioflavino T fluorescencijos intensyvumo pokytį. Gauti duomenys naudojami santykinų agregacijos puslaikių apskaičiavimui. Duomenų normalizavimas atliekamas pagal 2.1 formulę:

$$I_{norm} = \frac{(x - x_{min})}{(x_{max} - x_{min})}$$

2.1 lygtis. Duomenų normalizavimo formulė kinetikai. X – fluorescencijos reikšmė x laiko momentu, x_{min} – mažiausia fluorescencijos reikšmė, x_{max} – trylikos didžiausių/paskutinių fluorescencijos reikšmių vidurkis.

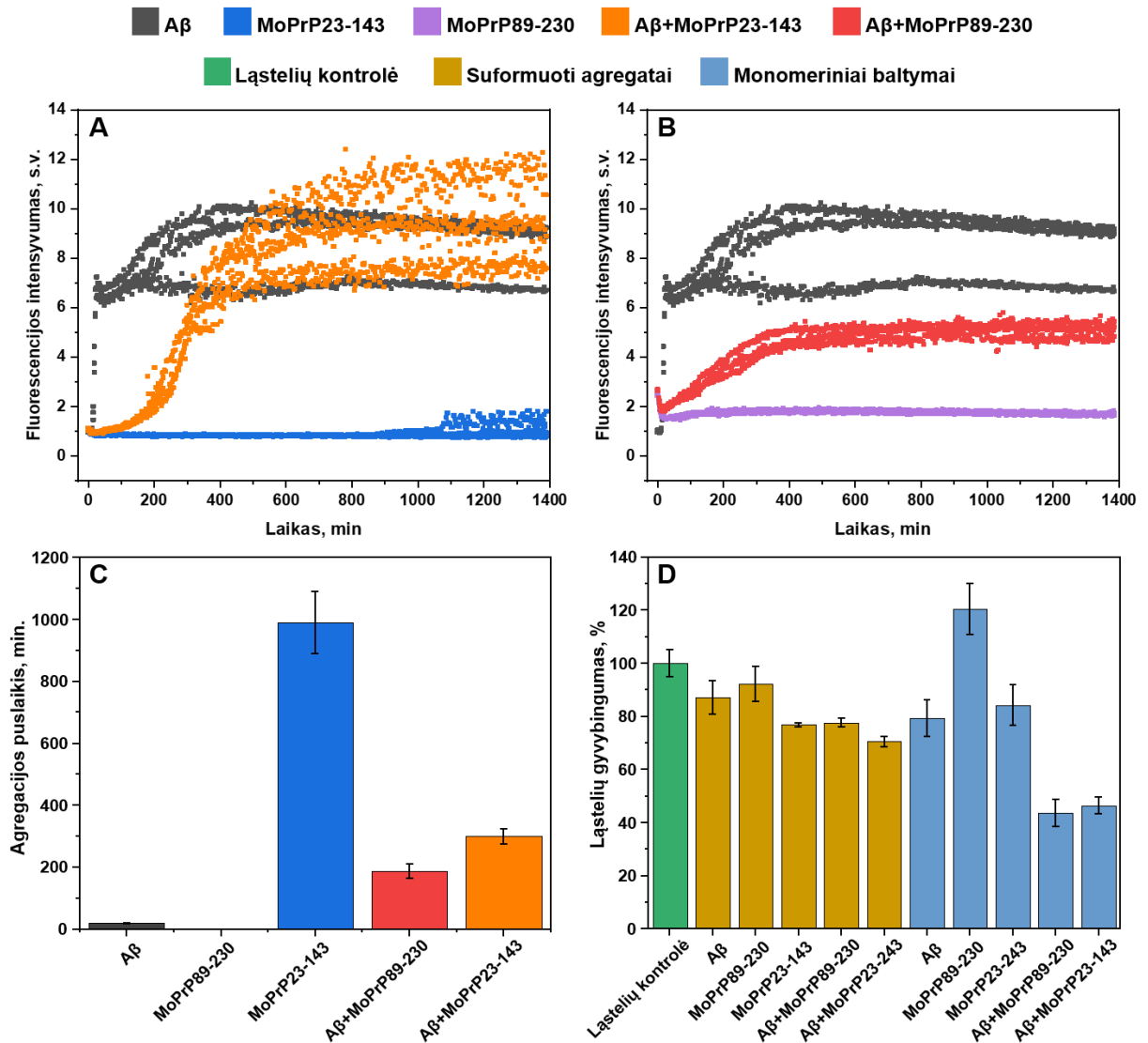
Po duomenų normalizavimo apskaičiuojamas santykinis agregacijos puslaikis. Ši vertė gaunama kiekvieno mėginio agregacijos puslaikių vidurkį padalinus iš kontrolinio mėginio agregacijos puslaikių vidurkio. Agregacijos puslaikių vidurkio apskaičiavimui pasirenkami trys nepriklausomi pakartojimai.

3. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Rekombinantinių MoPrP mutantų ir A β agregacijos tyrimas

Fiziologinėmis sąlygomis neurodegeneracinius procesus gali nulemti ląstelės mikroaplinka: ląstelinių ir amiloidinių baltymų sąveika. Būtent tai skatina manyti, kad už neurodegeneracinių ligų atsiradimą ir progresavimą nėra atsakingas tik vienas baltymas, bet kelių baltymų kompleksai. Alzheimerio ligos atveju su agregacijos procesu siejamas A β ir pelės prioninis baltymas.

Šio tyrimo metu buvo siekiama įvertinti kaip amiloidas- β ir pelės prioninis baltymas veikia vienas kito agregacijos procesą. Tam buvo naudojamas A β 42 ir du pelės prioninio baltymo mutantai: MoPrP23-143 ir MoPrP89-230. Spontaniškos baltymų agregacija vykdyta fiziologinėmis sąlygomis, kaip aprašyta 2.2.3 skyriuje. Gauti kinetikos duomenys panaudoti apskaičiuojant agregacijos puslaikių vertes (3.1 pav. C). Tiek iš gautų kinetikos kreivių (3.1 pav. A-B), tiek remiantis puslaikių vertėmis, matoma, kad A β baltymo agregacijos puslaikis yra apie 20 minučių. Tuo tarpu MoPrP23-143 agregacijos puslaikio vertė yra apie 1000 minučių, o MoPrP89-230 spontaniškai neagregavo. Sumaišius A β 42 su MoPrP23-143 pastebėtas agregacijos puslaikio padidėjimas amiloido- β atžvilgiu, bet sumažėjimas – MoPrP23-143 atžvilgiu. Reakcijos mišinyje esant A β 42 ir MoPrP89-230 matoma tokia pati agregacijos proceso tendencija kaip ir A β +MoPrP23-143 atveju. Lyginant abu reakcijos mišinius tarpusavyje, A β +MoPrP89-230 pasižymi mažesne agregacijos puslaikio verte ir mažesniu fluorescencijos intensyvumu (3.1 pav. B). Manoma, kad vykstant A β ir MoPrP23-143 koagregacijai baltymai linkę sukibti, kas lemia koncentracijos sumažėjimą. Šie pokyčiai gali būti susiję su sulėtėjusiu A β agregacijos procesu, o sudarę agregatai skatinti kartu procese dalyvaujančio MoPrP23-143 fibrilių formavimąsi (Honda 2018). Tuo tarpu A β ir MoPrP89-230 koagregacijos procesas ir jo metu susidarančios sąveikos nėra iki galo nustatyti.



3.1 pav. Pelės prioninio baltymo mutantų (MoPrP23-143 ir MoPrP89-230) ir Aβ amiloidinės agregacijos tyrimas. A – Aβ ir MoPrP23-143 agregacijos kinetikos grafikas, B – Aβ ir MoPrP89-230 agregacijos kinetikos grafikas, C – agregacijos puslaikių diagrama, D – ląstelių gyvybingumo diagrama.

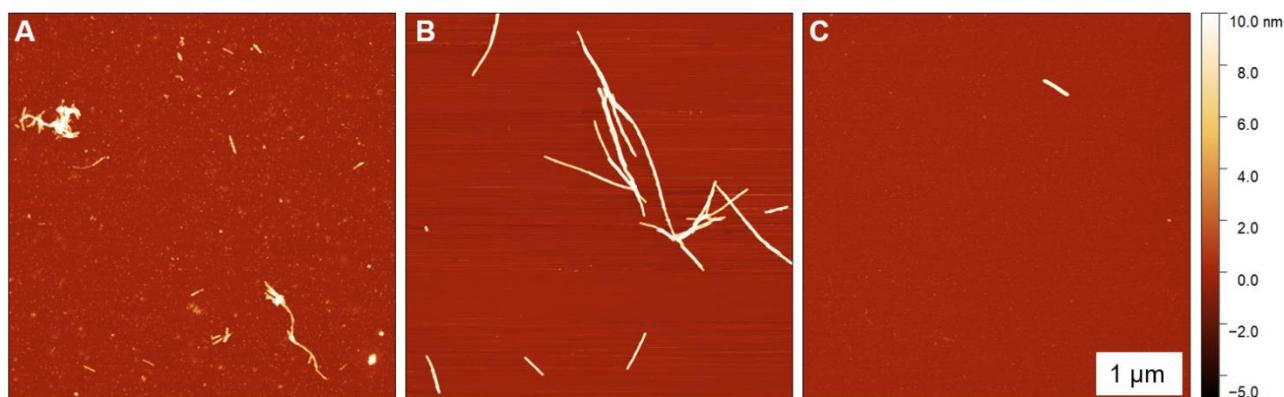
Atlikus spontaniinę agregaciją, buvo tiriamas agregatų toksiškumas ląstelėms. Tyrimo metu, ląstelės buvo auginamos esant dviem sąlygoms. Pirmu atveju, ant ląstelių užnešus jau suformuotus agregatus (3.1 pav. D, rudos spalvos stulpeliai). Antru atveju, agregacijos procesą vykdant ląstelinėje aplinkoje, t.y. ląsteles inkubuojant su atitinkamais monomeriniais baltymais. Paveikus ląsteles suformuotais agregatais, gauti rezultatai tarpusavyje yra gana panašūs. Matoma, kad ląstelių gyvybingumas apytiksliai sumažėja tik iki 70 %. Tuo tarpu ant ląstelių užnešus monomerinius baltymus (agregaciją vykdant ląstelinėje aplinkoje) matomi dideli skirtumai tarp rezultatų. Aβ ir MoPrP mišiniai pasižymi didžiausiu toksiškumu – ląstelių gyvybingumas sumažėja 50 %. Didesnį atsparumą fibriliniams agregatams lemia struktūros stabilumas lyginant su oligomerais, pačių fibrilių dydis (riboja išplitimą į kitus audinius ar organeles) (Verma et al. 2015).

Tolimesniems ląstelių gyvybingumo tyrimams buvo nuspręsta nenaudoti jau suformuotų agregatų, o agregaciją vykdyti augančių ląstelių aplinkoje.

3.2. Rekombinantinių MoPrP mutantų ir A β morfologijos tyrimas

Agregacijos metu susidariusių fibrilių morfologiniai skirtumai vertinti pasitelkiant atominės jėgos mikroskopiją. Mėginiai mikroskopavimui buvo ruošiami paviršių modifikuojant taip, kad prie jo prisijungtų neigiamą krūvį turintis A β baltymas (2.2.7 skyrius).

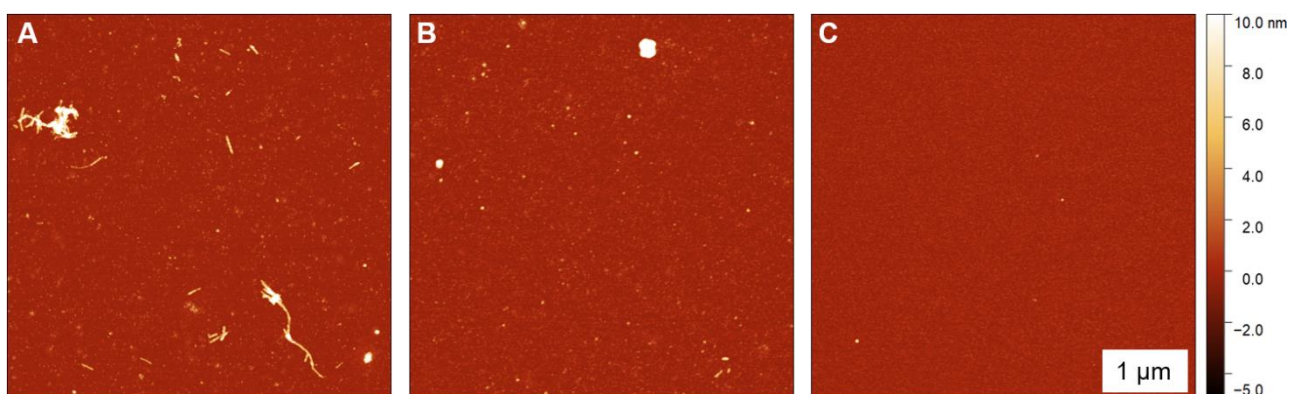
AJM būdu gauti A β 42 ir MoPrP23-143 vaizdiniai pateikti 3.2 paveikslėlyje. Čia matoma, kad A β 42 formuoja daug trumpų agregatų, kurie linkę susitelkti į nedideles sankaupas (3.2 pav. A ir 3.3 pav. A). Lyginant su A β 42, MoPrP23-143 sudaro šiek tiek aukštesnes, ilgesnes fibriles (3.2 pav. C). Dėl modifikavimo APTES reagentu, teigiamai įkrautas MoPrP silpnai jungiasi prie žėručio paviršiaus, ko pasekoje matomas sumažėjęs agregatų tankis. Tuo tarpu A β 42 ir MoPrP23-143 koagregacijos metu susidariusios fibrilės yra ilgesnės nei pavienių baltymų ir morfolgiškai panašesnės į MoPrP23-143. Tai gali reikšti, kad amiloidinių agregatų pagrindą sudaro MoPrP baltymas. Taip pat šiems koagregacijos produktams būdingas didelis agregatų tankis (jungimasis prie modifikuoto paviršiaus), ką galėtų lemti prie MoPrP fibrilių paviršiaus prisijungę A β baltymo fragmentai (König et al. 2021).



3.2 pav. A β 42 ir MoPrP23-143 amiloidinių agregatų AJM vaizdiniai. A – A β 42, B – A β 42 ir MoPrP23-143, C – MoPrP23-143.

Toliau buvo analizuojami A β ir MoPrP89-230 mėginiai. Gauti AJM rezultatai pateikti 3.3 paveikslėlyje. Kaip ir buvo nustatyta agregacijos tyrimo metu, MoPrP89-230 spontaniškai neagreguoja. MoPrP89-230 mėginį analizuojant AJM pagalba nėra matoma susidariusių amiloidinių fibrilių, tačiau yra pavienių mažų fragmentų, kurie galėtų būti baltymo monomerinė ar oligomerinė forma (3.3 pav. C). Gautuose A β 42 ir MoPrP89-230 koagregacijos vaizdiniuose (3.3 pav. B) nėra

aiškiai išreikštų amiloidinių fibrilių. Čia matomos nedidelės agregatų sancaupos ir pavieniai nedideli jų fragmentai. Norint tiksliai nustatyti, kokių baltymų agregatai tai yra, reikalingi tolimesni tyrimai.



3.3 pav. Aβ42 ir MoPrP89-230 amiloidinių agregatų AFM vaizdiniai. A – Aβ42, B – Aβ42 ir MoPrP89-230, C – MoPrP89-230.

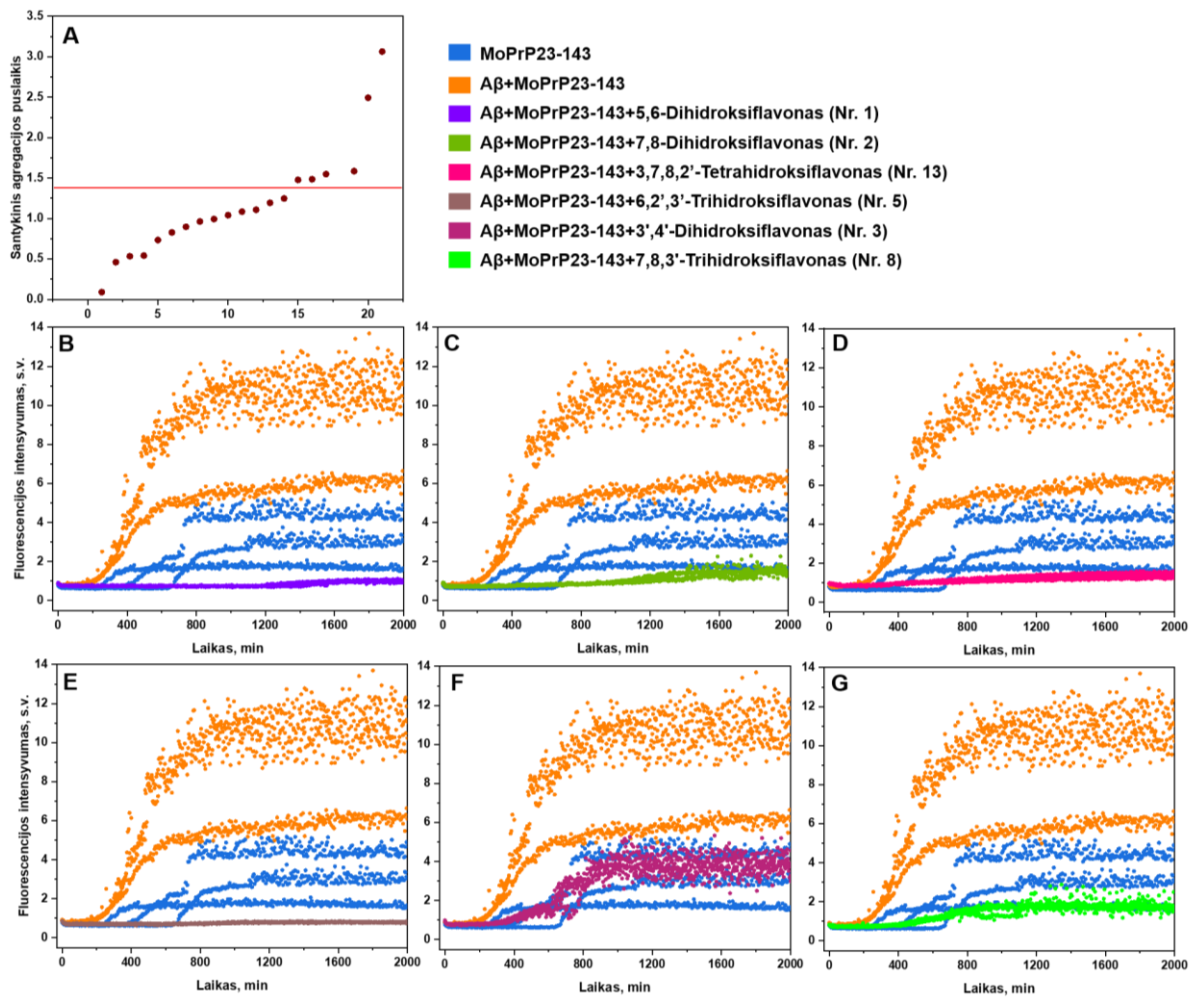
3.3. Flavonų įtaka MoPrP mutantų ir Aβ agregacijai

Didėjant supratimui apie amiloidinių fibrilių susidarymą, vis daugiau tyrimų atliekami ieškant veiksmingų galinčių paveikti agregacijos proceso eigą. Didelis dėmesys skiriamas junginiams, kurie potencialiai slopintų amiloidinių agregatų formavimąsi. Vieni tokių junginių, kurių anti-amiloidinis efektas minimas literatūroje, yra flavonai.

Šia tyrimo dalimi siekta įvertinti oksiduotų ir neoksiduotų flavonų įtaką Aβ42 ir MoPrP mutantų koagregacijos procesui. Pilnas, tyrime naudotų flavonų sąrašas nurodytas skyriuje „PRIEDAI“.

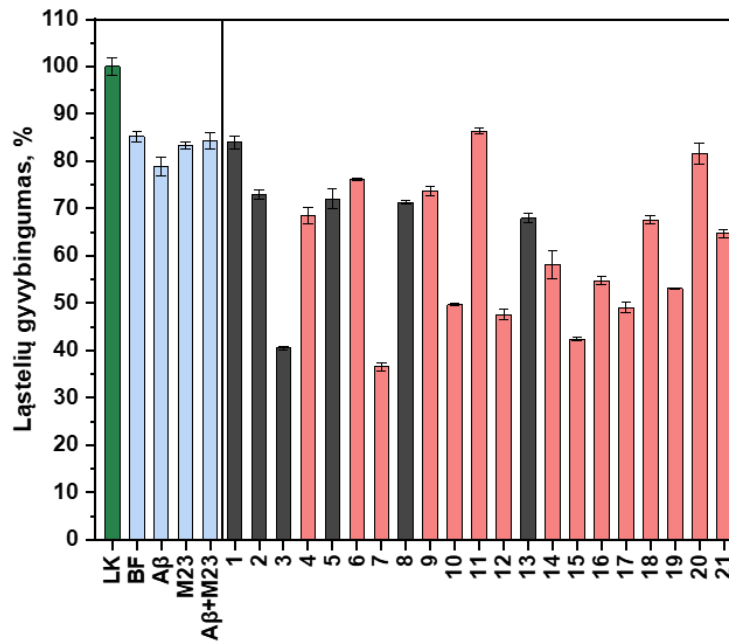
3.3.1. MoPrP23-143 ir Aβ

Neoksiduotų flavonų poveikis Aβ42 ir MoPrP23-143 bendram agregacijos procesui buvo vertinamas registruojant ThT fluorescencijos intensyvumo verčių pokytį laike. Iš gautų kinetikos duomenų apskaičiuotos santykinės agregacijos puslaikių vertės (3.4 pav. A). Didžiausia santykinio agregacijos puslaikio vertė nustatyta 5,6-dihidroksiflavonui (Nr. 1), o šiek tiek mažesnė – 7,8-dihidroksiflavonui (Nr. 2). Tarpusavyje panašiomis santykinėmis agregacijos puslaikių vertėmis pasižymėjo keturi flavonai: 3,7,8,2'-tetrahidroksiflavonas (Nr. 13), 6,2',3'-trihidroksiflavonas (Nr. 5), 3',4'-dihidroksiflavonas (Nr. 3) ir 7,8,3'-trihidroksiflavonas (Nr. 8). Kiekvienam iš šių junginių esant reakcijos mišinyje, pastebėtas santykinio agregacijos puslaikio padidėjimas lyginant su kontroliniu reakcijos mišiniu (Aβ+MoPrP23-143).



3.4 pav. Neoksiduotų flavonų įtaka Aβ42 ir MoPrP23-143 agregacijai. A – santykinų agregacijos puslaikių grafikas (raudona linija žymi kontrolinio mėginio santykinio puslaikio paklaidos viršutinę ribą), B-G – slopinančių junginių agregacijos kinetikos kreivės (grafikai išdėstyti pagal santykinės agregacijos puslaikio vertės mažėjimą). Legendoje skliaustuose pateikti skaičiai nurodo flavono eilės numerį bendrame flavonų sąrašė (skyrius „PRIEDAI“).

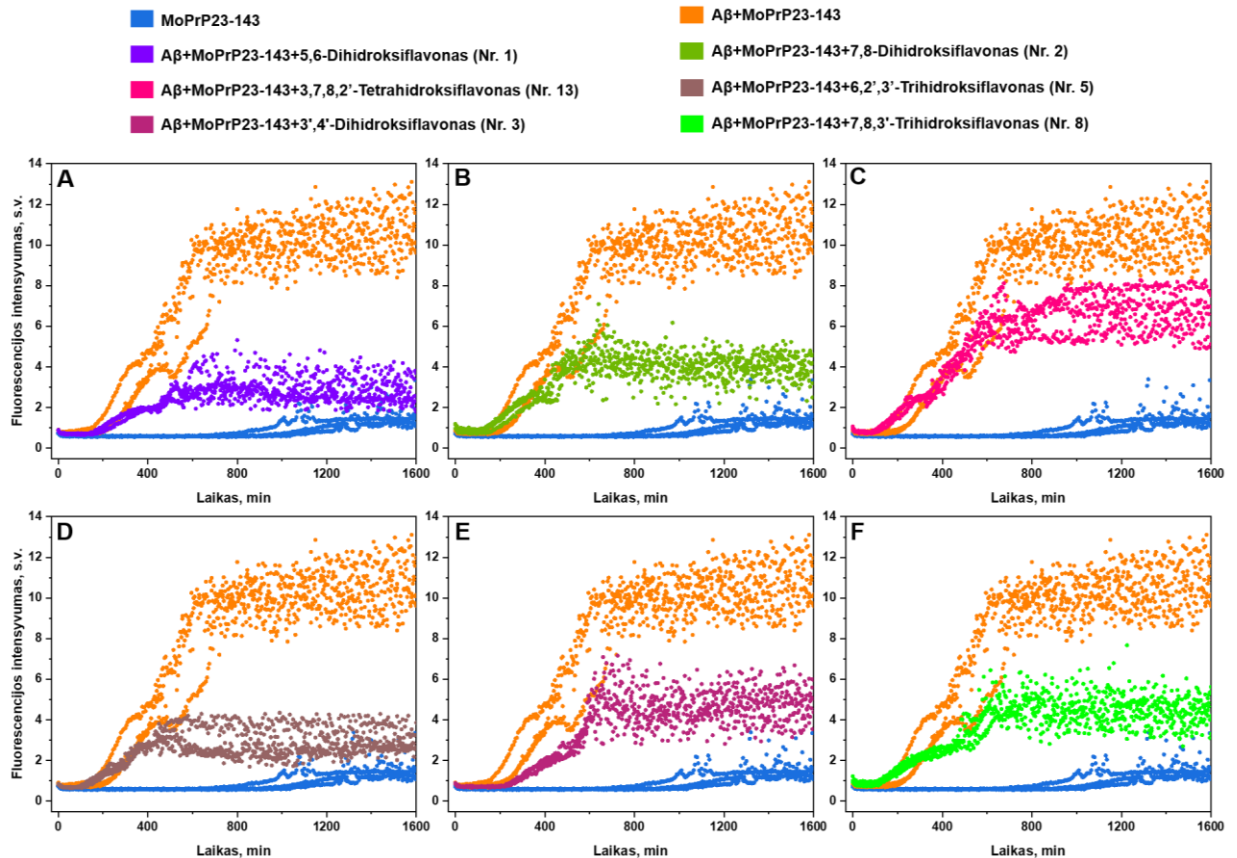
Tolimesnei analizei pasitelktos agregacijos kinetikos kreivės. 3.4 paveikslėlio B-G dalyse pateikiami šešių didžiausiomis santykių agregacijos puslaikių vertėmis pasižyminčių flavonų kinetikos kreivės. Matoma, kad vykstant Aβ+MoPrP23-143+flavono agregacijai, ThT fluorescencijos intensyvumo vertės yra mažesnės nei kontrolinio mėginio (Aβ+MoPrP23-143). Aβ+MoPrP23-143+3',4'-dikidroksiflavono (Nr. 3) atveju, ThT fluorescencijos intensyvumas yra du kartus didesnis lyginant su kitais flavonais: fluorescencijos intensyvumas lygus MoPrP23-143 kontrolei (3.4 pav F). Agregacijos procesui vykstant su flavonu ir be flavono, pastebimi skirtumai tarp gautų kinetikos kreivių. Konkrečiai, agregacijai vykstančiai su flavonu, būdingas eksponentinis kitimas laike.



3.5 pav. Neoksiduotų flavonų įtakos Aβ42 ir MoPrP23-143 agregacijai citotoksiškumo tyrimas. LK – ląstelių kontrolė, BF – baltymų buferinis tirpalas, M23 – MoPrP23-143, Aβ+M23 – Aβ ir MoPrP23-143 baltymų kontrolinis mėginys. Skaičiai 1-21 žymi Aβ+MoPrP89-230 ir atitinkamo flavono reakcijos mišinį. Naudojusių flavonų sąrašas pateiktas skyriuje „PRIEDAI“. Tamsesni stulpeliai (1, 2, 3, 5, 8, 13) žymi reakcijos mišinius pateiktus 3.4 pav.

Vėliau buvo tiriama, kaip keičiasi ląstelių gyvybingumas, amiloidinei agregacijai vykstant su ir be flavono. Pastebėta, kad ne visi didžiausios santykinės agregacijos puslaikio vertės Aβ+MoPrP23-143+flavono agregacijos mišiniai turėjo ir ląstelių gyvybingumą didinančių savybių. Aβ+MoPrP23-143+5,6-dihidroksiflavono (Nr. 1) mišiniu paveikus ląsteles yra matomas mažiausias citotoksiškumas. Ląstelių gyvybingumas siekia apie 85 %, kas yra lygu baltymų kontrolei. Analogiškas rezultatas būdingas ir junginiui Nr. 11 (5,6,7,4'-Tetrahidroksiflavonui). Tuo tarpu didžiausiu citotoksiškumu ląstelėms pasižymėjo Aβ+MoPrP23-143+flavonas Nr. 7 (6,3',4'-Trihidroksiflavonas). Šiek tiek didesnis gyvybingumas stebimas esant flavonui Nr. 3 (~ 40 %), su kuriuo Aβ+MoPrP23-143 agregacija vyksta lėčiausiai.

Identiški eksperimentai buvo atliekami naudojant oksiduotus flavonus. Šiuo atveju, gautos kinetikos kreivės visiškai skiriasi nuo gautų paveikus neoksiduotasi flavonais. Pastebėta, kad tiek kontrolinio (Aβ+MoPrP23-143), tiek Aβ+MoPrP23-143+flavono mėginio agregacijos procesui būdinga dviguba sigmoidinė kreivė. Tai rodo agregacijos metu vykstančią antrinę nukleaciją, kuri susijusi su skirtingų struktūrų – kamieno – susidarymu (Sneideris et al. 2015). Iš tokių kinetikos duomenų yra sudėtinga nustatyti tikslius agregacijos puslaikius, todėl bendram oksiduotų flavonų įtakos vertinimui pasitelktos kinetikos kreivės.



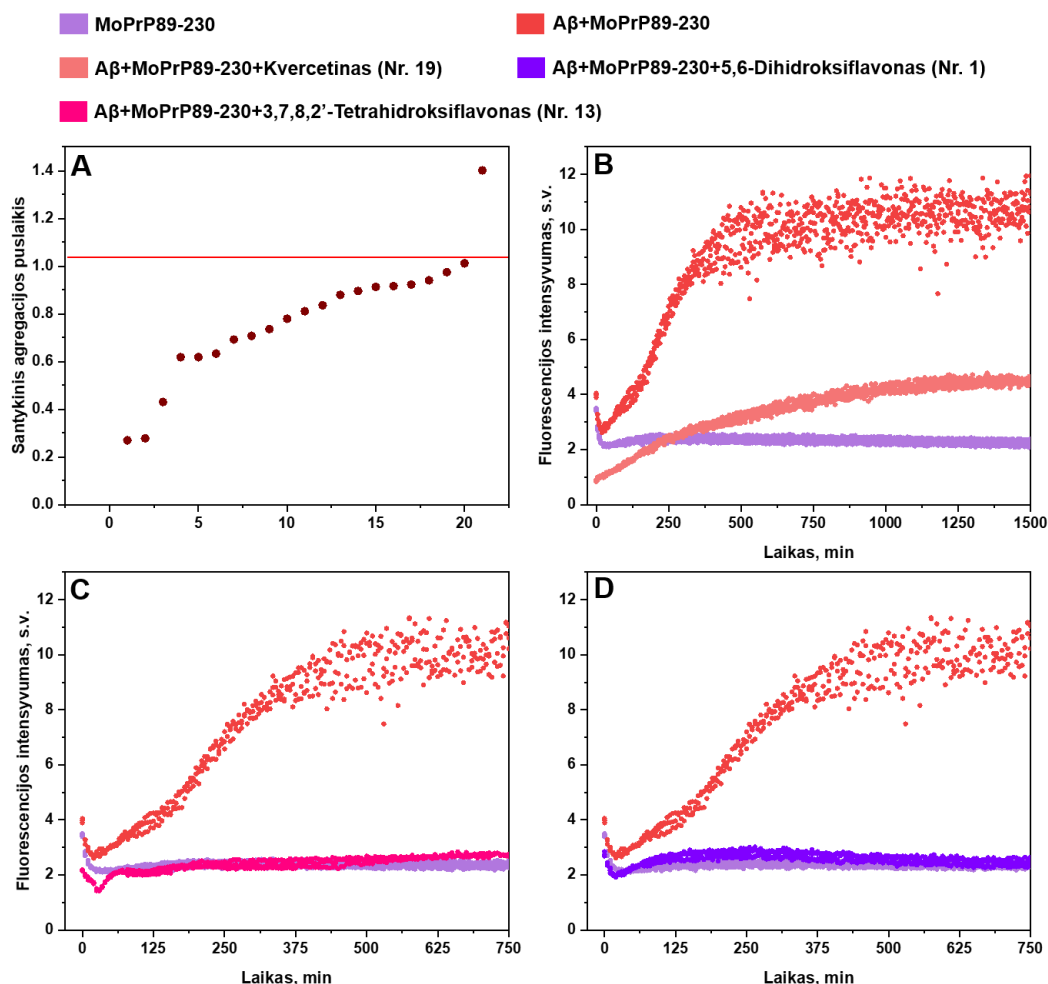
3.6 pav. Oksiduotų flavonų įtaka Aβ42 ir MoPrP23-143 agregacijai. A-F – atrinktos Aβ, MoPrP23-143, su atitinkamais fenoliniais junginiais, agregacijos kinetikos kreivės.

Iš 3.6 paveikslėlio grafikų matoma, kad vykdant Aβ+MoPrP23-143+oksiduotų flavonų agregaciją, ThT fluorescencijos intensyvumo vertės nesumažėja kaip 3.4 pav. B-G atveju. Tai gali reikšti, kad oksiduotos (stabilesnės) flavonų formos neturi didelės įtakos ThT fluorescencijos intensyvumui, lyginant su tais pačiais neoksiduotais flavonais. Taip pat 3.6 pav. B ir D grafikuose matoma, kad Aβ+MoPrP23-143+flavono (atitinkamos) agregacijos kinetinių kreivių vertės nustoja kisti anksčiau nei baltymų kontrolinio mėginio kinetikos kreivės (Aβ+MoPrP23-143). Tai gali paaiškinti keli procesai: B ir D atveju nevyksta antrasis agregacijos etapas arba greičiau yra pasiekama dinaminė pusiausvyra – greitinamas agregacijos procesas (Cukalevski et al. 2015).

3.3.2. MoPrP89-230 ir Aβ

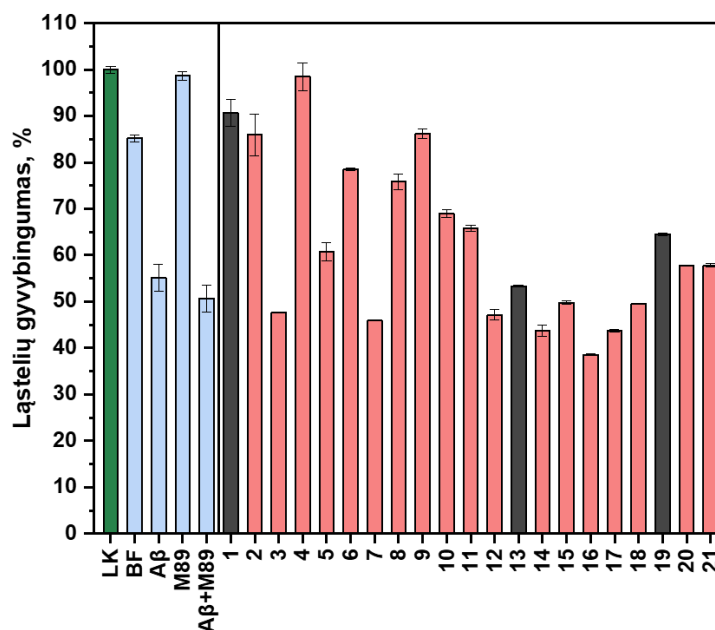
Neoksiduotų flavonų poveikis Aβ42 ir MoPrP89-230 bendram agregacijos procesui vertintas kaip ir Aβ+MoPrP23-143, t.y. registruojant ThT fluorescencijos intensyvumo verčių pokytį laike. Gauti kinetikos duomenys panaudoti santykinę agregacijos puslaikių apskaičiavimui (3.8 pav. A). Čia didžiausia santykinė agregacijos puslaikio vertė pasižymėjo tik vienas Aβ+MoPrP89-230+flavono reakcijos mišinys. Sulėtėjęs agregatų formavimasis būdingas Aβ+MoPrP89-230+kvercetino (Nr. 19) mišiniui. Pastarojo kinetikos grafikas pateiktas 3.8 paveikslėlio B dalyje.

Lyginant su kontroliniu mėginiu ($A\beta$ +MoPrP89-230), matomas sumažėjęs ThT fluorescencijos intensyvumas ir eksponentinis verčių kitimas laike. Tokie kvercetino sukelti agregacijos pokyčiai siejami su agregacijos proceso slopinimu (Wang, Wang, Zeng 2011).



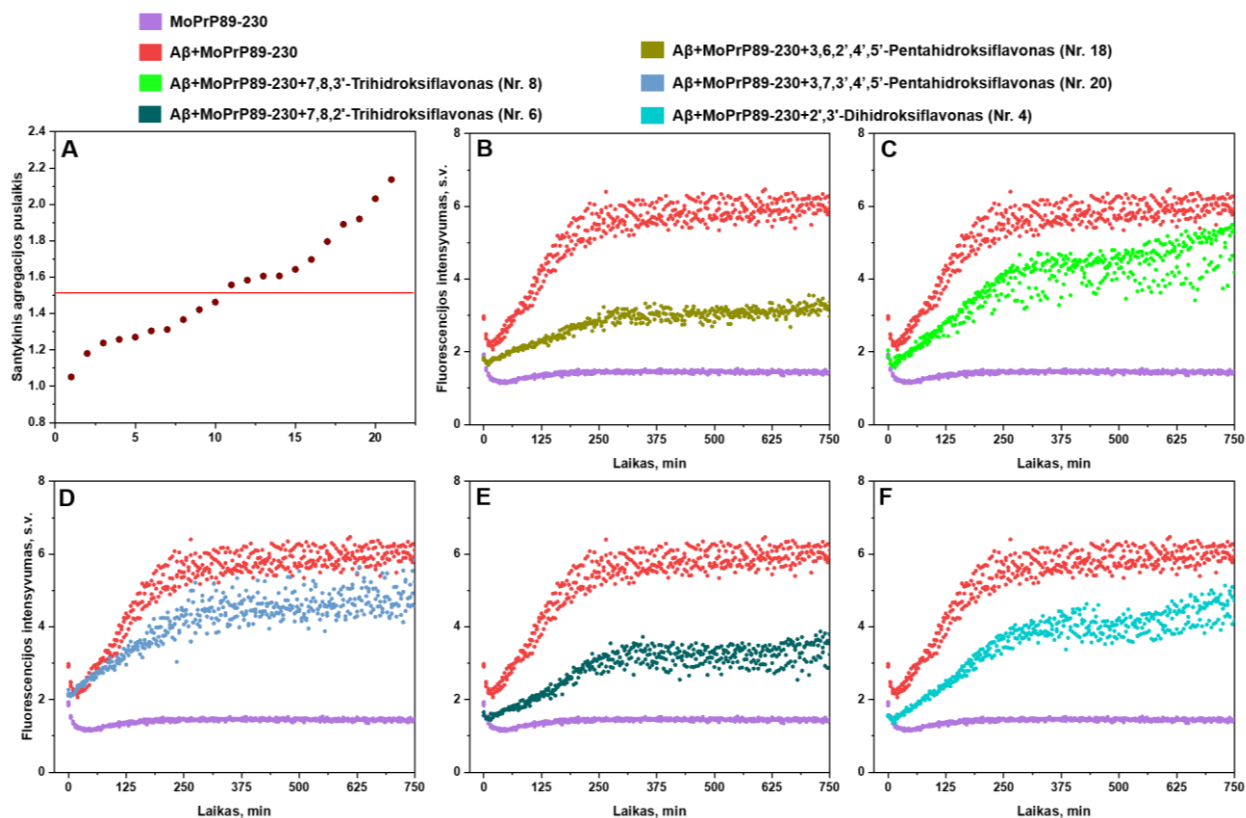
3.8 pav. Neoksiduotų flavonų įtaka $A\beta$ 42 ir MoPrP89-230 agregacijai. A – santykinų agregacijos puslaikių grafikas (raudona linija žymi kontrolinio mėginio santykinio puslaikio paklaidos viršutinę ribą), B – slopinančio junginio agregacijos kinetikos kreivės, C-D – agregaciją greitinančių junginių kinetikos kreivės.

Tyrimo metu taip pat buvo nustatyti ir keli polifenoliniai junginiai, kurių įtaka $A\beta$ +MoPrP89-230 koagregacijai išsiskyrė mažomis santykinėmis agregacijos puslaikių vertėmis. Tai 5,6-dihidroksiflavonas (Nr. 1) ir 3,7,8,2'-tetrahidroksiflavonas (Nr. 13). $A\beta$ +MoPrP89-230 paveikus tiek vienu, tiek kitu junginiu, matomas aiškus ThT fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas, tačiau vertės nebekinta praėjus pirmam 100 minučių. Tokie kinetikos pokyčiai gali reikšti, kad agregacijos eigoje flavonas oksiduojasi sudarydamas chinoną, kuris jungiasi su $A\beta$ 42, stabilizuoja baltymą ir taip lėtina agregaciją (Park, Yi, Lim 2021). Taip pat, agregacijos metu vykstant flavonų oksidacijai atsiranda tamsėjimo efektas, kurio metu ThT fluorescencija yra sugerama šių oksidacijos proceso metu susidarančių junginių (Bijlsma et al. 2022; Tan et al. 2020).



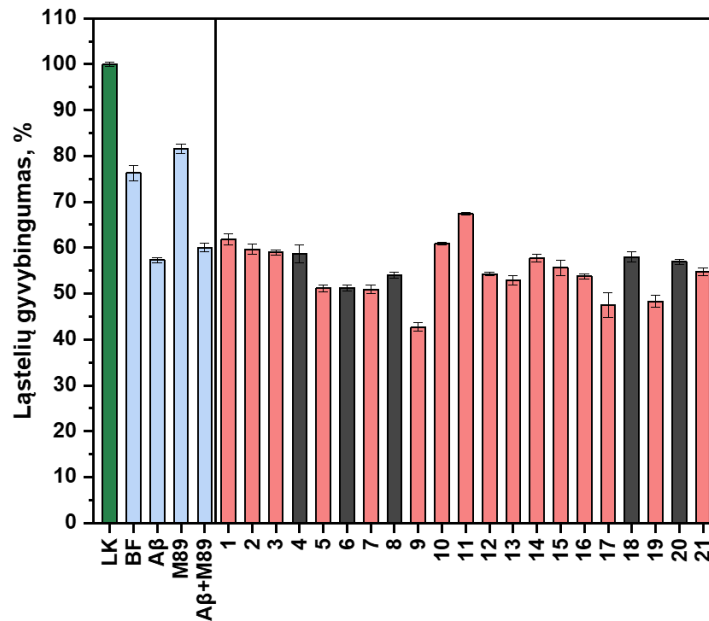
3.9 pav. Neoksiduotų flavonų įtakos Aβ42 ir MoPrP89-230 agregacijai citotoksiškumo tyrimas. LK – ląstelių kontrolė, BF – baltymų buferinis tirpalas, M23 – MoPrP89-230, Aβ+MoPrP89-230 – Aβ ir MoPrP89-230 baltymų kontrolinis mėginys. Skaičiai 1-21 žymi Aβ+MoPrP89-230 ir atitinkamo flavono reakcijos mišinį. Naudotų flavonų sąrašas pateiktas skyriuje „PRIEDAI“. Tamsesni stulpeliai (1, 13, 19) žymi reakcijos mišinius pateiktus 3.8 pav.

Neoksiduotų flavonų kartu su Aβ+MoPrP89-230 poveikis tirtas ląstelių gyvybingumo metodu. Didžiausios santykinės agregacijos vertės – Aβ+MoPrP89-230+kvercicino (Nr. 19) – mišinys ląstelių gyvybingumą sumažino iki 65 % (3.9 pav.). Tuo tarpu Aβ+MoPrP89-230+5,6-dihidroksiflavonas (mažiausia agregacijos puslaikio vertė) gyvybingumą sumažino tik iki 90 %. Matoma, kad Aβ+MoPrP89-230+5,6-dihidroksiflavonas (Nr. 1) yra vienas iš mažiausių toksiškumą sukeliančių kompleksų. Dar vienas polifenolinis junginys sumažinęs Aβ+MoPrP89-230 toksiškumą ląstelėms yra 2',3'-dihidroksiflavonas (Nr. 4). Manoma, kad flavonams jungiantis su Aβ oligomerais skatinami pastarųjų konformaciniai pokyčiai – suardomi hidrofobiniai ir π-π ryšiai, kas lėtina Aβ agregaciją ir mažina citotoksiškumą (Zeng et al. 2018). Iš visų testuotų junginių pats didžiausias toksiškumas matomas ląsteles veikiant Aβ+MoPrP89-230+7,8,3',4'-tetrahidroksiflavonu (Nr. 16). Šiuo atveju gyvybingumas sumažėja iki 37 %.



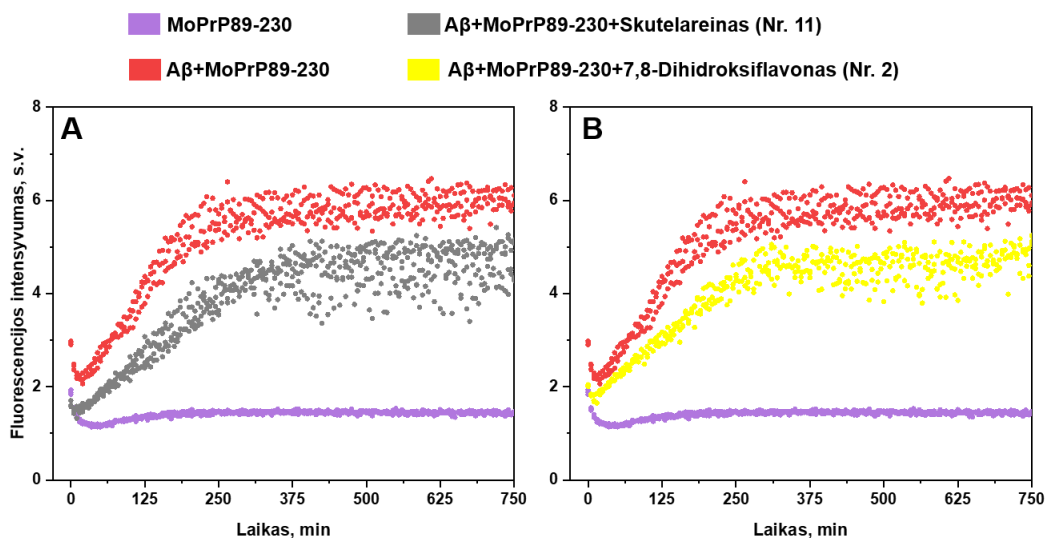
3.10 pav. Oksiduotų flavonų įtaka Aβ42 ir MoPrP89-230 agregacijai. A – santykinų agregacijos puslaikių grafikas (raudona linija žymi kontrolinio mėginio santykinio puslaikio paklaidos viršutinę ribą), B-F – slopinančių junginių agregacijos kinetikos kreivės (grafikai išdėstyti pagal santykinės agregacijos puslaikio vertės mažėjimą).

Oksiduotų flavonų tyrimo metu, nustatyta 11 junginių, kurie lyginant su kontrole, pasižymėjo didelėmis santykinio agregacijos puslaikio vertėmis. 3.10 paveikslėlyje pateikiamos penkių flavonais paveiktų mėginių kinetikos kreivės, kuriems būdingas lėčiausias agregacijos procesas. Didžiausia vertė būdinga Aβ+MoPrP89-230+3,6,2',4',5'-pentahidroksiflavono (Nr. 18) kompleksui. Lyginant su Aβ+MoPrP89-230 kontroliniu mėginiu, esant 3,6,2',4',5'-pentahidroksiflavono (Nr. 18) matomas sumažėjęs fluorescencijos intensyvumas. Panaši tendencija stebima ir agregaciją vykdant su 7,8,2'-trihidroksiflavonu (Nr. 6), tačiau šiuo atveju, iš kinetikos duomenų nustatytas mažesnės agregacijos puslaikio vertė (lyginant su Nr. 18). Kiti polifenoliniai junginiai, lėtinantys amiloidinius procesus, yra 2',3'-dihidroksiflavonas (Nr. 4), 7,8,3'-trihidroksiflavonas (Nr. 8) ir 3,7,3',4',5'-pentahidroksiflavonas (Nr. 20). Agregacijos metu esant šių oksiduotų flavonų, ThT fluorescencijos intensyvumai yra artimi Aβ+MoPrP89-230 kontrolei. Tyrimo metu pastebėta, kad visiems penkiems baltymų-flavonų reakcijos mišiniams būdinga konkurencinį fermentinės reakcijos slopinimo mechanizmą apibūdinanti kreivė (Whidden et al. 2014).



3.11 pav. Oksiduotų flavonų įtakos Aβ42 ir MoPrP89-230 agregacijai citotoksiškumo tyrimas. LK – ląstelių kontrolė, BF – baltymų buferinis tirpalas, M89 – MoPrP89-230, Aβ+MoPrP89-230 – Aβ ir MoPrP89-230 baltymų kontrolinis mėginys. Skaičiai 1-21 žymi Aβ+MoPrP89-230 atitinkamo flavono reakcijos mišinį. Naudotų flavonų sąrašas pateiktas skyriuje „PRIEDAI“. Tamsesni stulpeliai (4, 6, 8, 18, 20) žymi reakcijos mišinius pateiktus 3.10 pav.

Oksiduotų flavonų ir Aβ+MoPrP89-230 sudaromo komplekso poveikis ląstelėms stebėtas citotoksiškumo tyrimo metu. Beveik visų 3.10 pav. B-F grafikuose pateiktų Aβ+MoPrP89-230+flavonų toksiškas poveikis ląstelėms pasireiškia gyvybingumo sumažėjimu iki 60 %, kas yra lygu Aβ+MoPrP89-230 kontrolei. Baltymų mišinyje esant 7,8,2'-trihidroksiflavono (Nr. 6), ląstelių gyvybingumas nukrenta iki 50 %.



3.12 pav. Aβ42, MoPrP89-230 ir oksiduotų flavonų agregacijos kinetikos kreivės.

Didžiausias gyvybingumas stebimas ląstelių augimo aplinkoje esant skutelareinui (Nr. 11). Su šiuo junginiu vykdant Aβ+MoPrP89-230 agregaciją taip pat nustatytas ir vienas didesnių santykinių

agregacijos puslaikių (devintas iš vienuolikos junginių lėtinančių agregaciją) (3.12 pav. A). Kaip ir buvo minėta anksčiau, toksiškumo sumažėjimas gali būti siejamas su flavonų inicijuotais A β oligomerų konformaciniais pokyčiais. Taip pat, lyginant su kontroliniais mėginiais, tiek nedidelis toksiškumas, tiek maža agregacijos puslaikio vertė yra būdinga A β +MoPrP89-230+7,8-dihidroksiflavono (Nr. 2) reakcijos mišiniui. Pagal santykinės agregacijos puslaikių vertes, šis reakcijos mišinys yra vienuoliktas iš nustatytų aukščiausių verčių.

3.3.3. Suvestinė

3.1 lentelė (1 dalis). Flavonų įtakos MoPrP ir A β agregacijai tyrimo rezultatų suvestinė.

	Nr.	Į reakcijos mišinį įdėto flavono pavadinimas	A β + MoPrP23-143		A β + MoPrP89-230	
			Slopina agregaciją	Mažiau citotoksiška	Slopina agregaciją	Mažiau citotoksiška
Neoksiduoti	1	5,6-Dihidroksiflavonas	+	+	-	+
	2	7,8-Dihidroksiflavonas	+	-	-	+
	3	3',4'-Dihidroksiflavonas	+	-	-	-
	4	2',3'-Dihidroksiflavonas	+	-	-	+
	5	6,2',3'-Trihidroksiflavonas	+	-	-	+
	6	7,8,2'-Trihidroksiflavonas	-	-	-	+
	7	6,3',4'-Trihidroksiflavonas	-	-	-	-
	8	7,8,3'-Trihidroksiflavonas	+	-	-	+
	9	7,8,4'-Trihidroksiflavonas	-	-	-	+
	10	7,3',4'-Trihidroksiflavonas	+	-	-	+
	11	Skutelareinas	-	+	-	+
	12	3,6,3',4'-Tetrahidroksiflavonas	-	-	-	-
	13	3,7,8,2'-Tetrahidroksiflavonas	+	-	-	-
	14	6,7,3',4'-Tetrahidroksiflavonas	-	-	-	-
	15	Luteolinas	-	-	-	-
	16	7,8,3',4'-Tetrahidroksiflavonas	-	-	-	-
	17	5,7,3',4',5'-Pentahidroksiflavonas	-	-	-	-
	18	3,6,2',4',5'-Pentahidroksiflavonas	-	-	-	-
	19	Kvercetas	-	-	+	+
	20	3,7,3',4',5'-Pentahidroksiflavonas	-	+	-	-
	21	Miricetas	-	-	-	-

3.1 lentelė (2 dalis). Flavonų įtakos MoPrP ir Aβ agregacijai tyrimo rezultatų suvestinė.

	Nr.	Į reakcijos mišinį įdėto flavono pavadinimas	Aβ + MoPrP23-143		Aβ + MoPrP89-230	
			Slopina agregacija	Mažiau citotoksiška	Slopina agregacija	Mažiau citotoksiška
Oksiduoti	1	5,6-Dihidroksiflavonas			-	+
	2	7,8-Dihidroksiflavonas			+	+
	3	3',4'-Dihidroksiflavonas			-	+
	4	2',3'-Dihidroksiflavonas			+	-
	5	6,2',3'-Trihidroksiflavonas			+	-
	6	7,8,2'-Trihidroksiflavonas			+	-
	7	6,3',4'-Trihidroksiflavonas			-	-
	8	7,8,3'-Trihidroksiflavonas			+	-
	9	7,8,4'-Trihidroksiflavonas			+	-
	10	7,3',4'-Trihidroksiflavonas			-	+
	11	Skutelareinas			+	+
	12	3,6,3',4'-Tetrahidroksiflavonas			-	-
	13	3,7,8,2'-Tetrahidroksiflavonas			+	-
	14	6,7,3',4'-Tetrahidroksiflavonas			-	-
	15	Luteolinas			-	-
	16	7,8,3',4'-Tetrahidroksiflavonas			+	-
	17	5,7,3',4',5'-Pentahidroksiflavonas			-	-
	18	3,6,2',4',5'-Pentahidroksiflavonas			+	-
	19	Kvercetas			-	-
	20	3,7,3',4',5'-Pentahidroksiflavonas			+	-
	21	Miricetas			-	-

IŠVADOS

1. Pelės prioninio baltymo mutantai MoPrP89-230 ir MoPrP23-143 pasižymi A β 42 agregaciją slopinančiu poveikiu;
2. Slopinančiu A β +MoPrP23-143 agregacijos proceso poveikiu pasižymėjo aštuoni flavonai, tik vienas iš jų taip pat mažino ir susidarantių agregatų toksiškumą ląstelėms (SH-SY5Y);
3. Devyni neoksiduoti flavonai mažino A β +MoPrP89-230 agregacijos produktų citotoksiškumą, o vienas junginys taip pat ir lėtino agregaciją, ir didino ląstelių gyvybingumą;
4. Vienuolika tyrimo metu naudotų oksiduotų flavonų lėtino A β +MoPrP89-230 amiloidinių fibrilių susidarymą, o du iš jų taip pat didino ir ląstelių gyvybingumą.

Santrauka

Gyvuose organizmuose agregacijos procesą gali veikti sąveikos, susidaranti tarp įvairių, skirtingas funkcijas atliekančių baltymų. Alzheimerio ligos atveju yra svarbi koagregacija tarp su liga asocijuoto baltymo A β 42 ir ląstelinio PrP. Nors šių baltymų koagregacija vyksta lėčiau nei vieno A β , susidarę agregatai pasižymi citotoksiškumu. Amiloidiniai slopikliai gali veikti stabilizuodami baltymo struktūrą, inhibuodami amiloidinių fibrilių ilgėjimo procesus ar mažindami toksišką poveikį ląstelėms.

Šio darbo tikslas buvo įvykdyti pelės prioninio baltymo mutantų (MoPrP23-143 ir MoPrP89-230) ir A β 42 agregaciją veikiant flavonais ir įvertinti susidarantių agregatų poveikį ląstelėms. Pirmiausia, buvo įvykdyta MoPrP mutantų ir A β agregacija registruojant ThT fluorescencijos intensyvumo verčių pokytį laike. Nustatyta, kad tiek MoPrP23-143, tiek MoPrP89-230 lėtina A β agregacijos procesą. Ląstelių gyvybingumo metodu nustatyta, kad ląstelių aplinkoje susidarantys agregatai daug toksiškesni nei jau suformuotos fibrilės. Nustatyti sąveikoms tarp A β ir MoPrP mutantų buvo atliktas susidariusių agregatų morfologijos tyrimas naudojant AJM. Vaizdiniuose buvo matoma, kad A β +MoPrP23-143 koagregacija vyksta agreguojant abiem baltymams, o A β +MoPrP23-143 atveju agreguoja tik A β 42. Oksiduotų ir neoksiduotų flavonų įtaka amiloidinės koagregacijos procesui taip pat buvo analizuojama registruojant ThT fluorescencijos intensyvumo vertes. Iš gautų rezultatų nustatyta, kad nedidelė dalis oksiduotų/neoksiduotų flavonų tiek slopino A β +MoPrP mutantų agregacijos procesą, tiek didino ląstelių gyvybingumą.

Exploring Effect of Flavones on Amyloid Aggregation of Mouse Prion Protein and A β 42

Summary

The protein aggregation process between proteins of different nature can be influenced by their interactions. Coaggregation between disease-associated protein A β and cellular PrP has a key role in Alzheimer's disease. Although the coaggregation process of these proteins is slower compared with a single A β , the resulting aggregates are cytotoxic. Amyloid inhibitors can act to stabilize the protein structure, inhibit amyloid fibril elongation processes, or reduce cellular toxicity.

The aim of this work was to perform the aggregation of mouse prion protein mutants (MoPrP23-143 and MoPrP89-230) and A β 42. Then the influence of flavones (and its oxidized forms) to aggregation process was evaluated as well as A β +MoPrP+flavones toxicity to cells. First, aggregation of MoPrP mutants and A β was performed by recording the change in ThT fluorescence intensity values over time. It was found that both MoPrP23-143 and MoPrP89-230 inhibit aggregation process of amyloid- β . Analysis of cell viability showed that aggregates formed in the cellular environment were more toxic than final phase amyloid fibrils. To determine the interaction between A β and MoPrP mutants, the morphology assay was performed by using AFM. The assay revealed that coaggregation of A β +MoPrP23-143 occurs upon aggregation of both proteins. In the case of A β +MoPrP89-230, only A β 42 aggregates into amyloid fibrils. The influence of oxidized and non-oxidized flavones on the amyloid coaggregation process was evaluated by aggregation halftimes (by tracking the ThT fluorescence intensity values). The results indicated that small part of the oxidized/non-oxidized flavones inhibited the aggregation process of A β +MoPrP mutants as well as increased cell viability.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abskharon, Romany, Fei Wang, Alexandre Wohlkonig, Juxin Ruan, Sameh Soror, Gabriele Giachin, Els Pardon, Wenquan Zou, Giuseppe Legname, Jiyan Ma, ir Jan Steyaert. 2019. "Structural Evidence for the Critical Role of the Prion Protein Hydrophobic Region in Forming an Infectious Prion." *PLoS Pathogens* 15(12):1–21.
2. Adamcik, Jozef ir Raffaele Mezzenga. 2012. "Study of Amyloid Fibrils via Atomic Force Microscopy." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 17(6):369–76.
3. Aguzzi, Adriano ir Anna Maria Calella. 2009. "Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases." *Physiological Reviews* 89(4):1105–52.
4. Akaishi, Tatsuhiko, Takeo Morimoto, Mami Shibao, Sayaka Watanabe, Kumiko Sakai-Kato, Naoko Utsunomiya-Tate ir Kazuho Abe. 2008. "Structural Requirements for the Flavonoid Fisetin in Inhibiting Fibril Formation of Amyloid β Protein." *Neuroscience Letters* 444(3):280–85.
5. Alseekh, Saleh, Leonardo Perez de Souza, Maria Benina ir Alisdair R. Fernie. 2020. "The Style and Substance of Plant Flavonoid Decoration; towards Defining Both Structure and Function." *Phytochemistry* 174(July 2019).
6. Anwal, Lingaraj. 2021. "A Comprehensive Review on Alzheimer's Disease." *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 10(7):1170.
7. Ayaz, Muhammad, Abdul Sadiq, Muhammad Junaid, Farhat Ullah, Muhammad Ovais, Ikram Ullah, Jawad Ahmed ir Muhammad Shahid. 2019. "Flavonoids as Prospective Neuroprotectants and Their Therapeutic Propensity in Aging Associated Neurological Disorders." *Frontiers in Aging Neuroscience* 11(JUN).
8. Baldwin, Kelly J. ir Cynthia M. Correll. 2019. "Prion Disease." *Seminars in Neurology* 39(04):428–39.
9. Baral, Pravas K., Jiang Yin, Adriano Aguzzi ir Michael N. G. James. 2019. "Transition of the Prion Protein from a Structured Cellular Form (PrPC) to the Infectious Scrapie Agent (PrPSc)." *Protein Science* 28(12):2055–63.
10. Barnham, Kevin J., Colin L. Masters ir Ashley I. Bush. 2004. "Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress." *Nature Reviews Drug Discovery* 3(3):205–14.
11. Barreca, Davide, Giuseppina Mandalari, Antonella Calderaro, Antonella Smeriglio, Domenico Trombetta, Maria Rosa Felice ir Giuseppe Gattuso. 2020. "Citrus Flavones: An Update on Sources, Biological Functions, and Health Promoting Properties." *Plants* 9(3).
12. Bernardi, Livia ir Amalia C. Bruni. 2019. "Mutations in Prion Protein Gene: Pathogenic

- Mechanisms in C-Terminal vs. N-Terminal Domain, a Review.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(14):3606.
13. Bijlsma, Judith, Wouter J. C. de Bruijn, Krassimir P. Velikov ir Jean Paul Vincken. 2022. “Unravelling Discolouration Caused by Iron-Flavonoid Interactions: Complexation, Oxidation, and Formation of Networks.” *Food Chemistry* 370(October 2021):131292.
 14. Blanco, Antonio ir Gustavo Blanco. 2017. “Enzymes Are Biological Catalysts.” *Medical Biochemistry* 153–75.
 15. Bondarev, Stanislav A., Kirill S. Antonets, Andrey V. Kajava, Anton A. Nizhnikov ir Galina A. Zhouravleva. 2018. “Protein Co-Aggregation Related to Amyloids: Methods of Investigation, Diversity, and Classification.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(8):1–30.
 16. Çelik, Tülay Aşkin. 2018. “Introductory Chapter: Cytotoxicity.” *Cytotoxicity* 3–6.
 17. Charco, Jorge M., Hasier Eraña, Vanessa Venegas, Sandra García-Martínez, Rafael López-Moreno, Ezequiel González-Miranda, Miguel Ángel Pérez-Castro ir Joaquín Castilla. 2017. “Recombinant PrP and Its Contribution to Research on Transmissible Spongiform Encephalopathies.” *Pathogens* 6(4):1–20.
 18. Chaudhuri, Paramita, Kailash P. Prajapati, Bibin G. Anand, Kriti Dubey ir Karunakar Kar. 2019. “Amyloid Cross-Seeding Raises New Dimensions to Understanding of Amyloidogenesis Mechanism.” *Ageing Research Reviews* 56(July):100937.
 19. Chen, Guo-fang, Ting-hai Xu, Yan Yan, Yu-ren Zhou, Yi Jiang, Karsten Melcher ir H. Eric Xu. 2017. “Amyloid Beta: Structure, Biology and Structure-Based Therapeutic Development.” *Acta Pharmacologica Sinica* 38(9):1205–35.
 20. Choi, Erika Y., Sam Sik Kang, Sang Kook Lee ir Byung Hee Han. 2020. “Polyphenolic Biflavonoids Inhibit Amyloid-Beta Fibrillation and Disaggregate Preformed Amyloid-Beta Fibrils.” *Biomolecules & Therapeutics* 28(2):145–51.
 21. Cukalevski, Risto, Xiaoting Yang, Georg Meisl, Ulrich Weininger, Katja Bernfur, Birgitta Frohm, Tuomas P. J. Knowles ir Sara Linse. 2015. “The A β 40 and A β 42 Peptides Self-Assemble into Separate Homomolecular Fibrils in Binary Mixtures but Cross-React during Primary Nucleation.” *Chemical Science* 6(7):4215–33.
 22. Dawkins, Edgar ir David H. Small. 2014. “Insights into the Physiological Function of the β -Amyloid Precursor Protein: Beyond Alzheimer’s Disease.” *Journal of Neurochemistry* 129(5):756–69.
 23. Devi, Shweta, Minal Chaturvedi, Siraj Fatima ir Smriti Priya. 2022. “Environmental Factors Modulating Protein Conformations and Their Role in Protein Aggregation Diseases.”

- Toxicology* 465(August 2021):153049.
24. Dubey, Kriti, Bibin G. Anand, Mayur K. Temgire ir Karunakar Kar. 2014. "Evidence of Rapid Coaggregation of Globular Proteins during Amyloid Formation." *Biochemistry* 53(51):8001–4.
 25. Dugger, Brittany N. ir Dennis W. Dickson. 2017. "Pathology of Neurodegenerative Diseases." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9(7):a028035.
 26. Farhadi, Faegheh, Bahman Khameneh, Mehrdad Iranshahi ir Milad Iranshahy. 2019. "Antibacterial Activity of Flavonoids and Their Structure–Activity Relationship: An Update Review." *Phytotherapy Research* 33(1):13–40.
 27. Freshney, R. Ian. 2005. "Cytotoxicity." *Culture of Animal Cells* 359–73.
 28. Gade Malmos, Kirsten, Luis M. Blancas-Mejia, Benedikt Weber, Johannes Buchner, Marina Ramirez-Alvarado, Hironobu Naiki ir Daniel Otzen. 2017. "ThT 101: A Primer on the Use of Thioflavin T to Investigate Amyloid Formation." *Amyloid* 24(1):1–16.
 29. Grela, Ewa, Joanna Kozłowska ir Agnieszka Grabowiecka. 2018. "Current Methodology of MTT Assay in Bacteria – A Review." *Acta Histochemica* 120(4):303–11.
 30. Groveman, Bradley R., Michael A. Dolan, Lara M. Taubner, Allison Kraus, Reed B. Wickner ir Byron Caughey. 2014. "Parallel In-Register Intermolecular β -Sheet Architectures for Prion-Seeded Prion Protein (PrP) Amyloids." *Journal of Biological Chemistry* 289(35):24129–42.
 31. Hara, Hideyuki ir Suehiro Sakaguchi. 2020. "N-Terminal Regions of Prion Protein: Functions and Roles in Prion Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 21(17):1–14.
 32. Höglund, Kina ir Hugh Salter. 2013. "Molecular Biomarkers of Neurodegeneration." *Expert Review of Molecular Diagnostics* 13(8):845–61.
 33. Honda, Ryo. 2018. "Amyloid- β Peptide Induces Prion Protein Amyloid Formation: Evidence for Its Widespread Amyloidogenic Effect." *Angewandte Chemie International Edition* 57(21):6086–89.
 34. Howie, Alexander J. 2019. "Origins of a Pervasive, Erroneous Idea: The 'Green Birefringence' of Congo Red-Stained Amyloid." *International Journal of Experimental Pathology* 100(4):208–21.
 35. Hughes, Daniel ir Mark Halliday. 2017. "What Is Our Current Understanding of PrPSc-Associated Neurotoxicity and Its Molecular Underpinnings?" *Pathogens* 6(4):63.
 36. Igel-Egalon, Angélique, Vincent Béringue, Human Rezaei ir Pierre Sibille. 2018. "Prion Strains and Transmission Barrier Phenomena." *Pathogens* 7(1):1–29.
 37. Ironside, James W., Diane L. Ritchie ir Mark W. Head. 2018. "Prion Diseases." Pp. 393–403 in *Neuropathology*. Vol. 145, edited by G. G. Kovacs and I. B. T.-H. of C. N. Alafuzoff.

- Elsevier.
38. Ivanova, Magdalena I., Yuxi Lin, Young Ho Lee, Jie Zheng ir Ayyalusamy Ramamoorthy. 2021. “Biophysical Processes Underlying Cross-Seeding in Amyloid Aggregation and Implications in Amyloid Pathology.” *Biophysical Chemistry* 269(November 2020):106507.
 39. Jarosz-Griffiths, Heledd H., Elizabeth Noble, Jo V. Rushworth ir Nigel M. Hooper. 2016. “Amyloid- β Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein.” *Journal of Biological Chemistry* 291(7):3174–83.
 40. Jiang, Nan, Andrea I. Doseff ir Erich Grotewold. 2016. “Flavones: From Biosynthesis to Health Benefits.” *Plants* 5(2):1–1256.
 41. Joe, Elizabeth ir John M. Ringman. 2019. “Cognitive Symptoms of Alzheimer’s Disease: Clinical Management and Prevention.” *The BMJ* 367:1–14.
 42. van der Kant, Rik ir Lawrence S. B. Goldstein. 2015. “Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia.” *Developmental Cell* 32(4):502–15.
 43. Kim, Mee-Ohk, Leonel T. Takada, Katherine Wong, Sven A. Forner ir Michael D. Geschwind. 2018. “Genetic PrP Prion Diseases.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10(5):a033134.
 44. Kinney, Jefferson W., Shane M. Bemiller, Andrew S. Murtishaw, Amanda M. Leisgang, Arnold M. Salazar ir Bruce T. Lamb. 2018. “Inflammation as a Central Mechanism in Alzheimer’s Disease.” *Alzheimer’s and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* 4:575–90.
 45. König, Anna S., Nadine S. Rösener, Lothar Gremer, Markus Tusche, Daniel Flender, Elke Reinartz, Wolfgang Hoyer, Philipp Neudecker, Dieter Willbold ir Henrike Heise. 2021. “Structural Details of Amyloid β Oligomers in Complex with Human Prion Protein as Revealed by Solid-State MAS NMR Spectroscopy.” *Journal of Biological Chemistry* 296:100499.
 46. Konno, Hiroki, Takahiro Watanabe-Nakayama, Takayuki Uchihashi, Momoko Okuda, Liwen Zhu, Noriyuki Kodera, Yousuke Kikuchi, Toshio Ando ir Hideki Taguchi. 2020. “Dynamics of Oligomer and Amyloid Fibril Formation by Yeast Prion Sup35 Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(14):7831–36.
 47. Kresl, Philip, Jasmin Rahimi, Ellen Gelpi, Iban Aldecoa, Gerda Ricken, Krisztina Danics, Eva Keller ir Gabor G. Kovacs. 2019. “Accumulation of Prion Protein in the Vagus Nerve in Creutzfeldt–Jakob Disease.” *Annals of Neurology* 85(5):782–87.
 48. Kumar, Anil, Arti Singh ir Ekavali. 2015. “A Review on Alzheimer’s Disease

- Pathophysiology and Its Management: An Update.” *Pharmacological Reports* 67(2):195–203.
49. Kumar, Santosh ir Jayant B. Udgaonkar. 2010. “Mechanisms of Amyloid Fibril Formation by Proteins.” *Current Science* 98(5):639–56.
 50. Kupfer, L., W. Hinrichs ir M. Groschup. 2009. “Prion Protein Misfolding.” *Current Molecular Medicine* 9(7):826–35.
 51. Lemkul, Justin A. ir David R. Bevan. 2012. “Morin Inhibits the Early Stages of Amyloid β -Peptide Aggregation by Altering Tertiary and Quaternary Interactions to Produce ‘off-Pathway’ Structures.” *Biochemistry* 51(30):5990–6009.
 52. Lévy, Elise, Nadine El Banna, Dorothée Baille, Amélie Heneman-Masurel, Sandrine Truchet, Human Rezaei, Meng Er Huang, Vincent Béringue, Davy Martin, and Laurence Vernis. 2019. “Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(16).
 53. Li, Haoqian, Richard Lantz ir Deguo Du. 2019. “Vibrational Approach to the Dynamics and Structure of Protein Amyloids.” *Molecules* 24(1):186.
 54. Li, Jie, Wuliji O, Wei Li, Zhi-Gang Jiang ir Hossein Ghanbari. 2013. “Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders.” *International Journal of Molecular Sciences* 14(12):24438–75.
 55. Linse, Sara. 2017. “Monomer-Dependent Secondary Nucleation in Amyloid Formation.” *Biophysical Reviews* 9(4):329–38.
 56. Lukiw, Walter J. 2022. “Recent Advances in Our Molecular and Mechanistic Understanding of Misfolded Cellular Proteins in Alzheimer’s Disease (AD) and Prion Disease (PrD).” *Biomolecules* 12(2):10–15.
 57. Ma, Tao, Jing Deng, Shaojie Ma, Weijing Zhao, Ziwei Chang, Kunqian Yu ir Jun Yang. 2019. “Structural Mechanism of Barriers to Interspecies Seeding Transmissibility of Full-Length Prion Protein Amyloid.” *ChemBioChem* 20(21):2757–66.
 58. Mahabadi, Hajar Miranzadeh ir Changiz Taghibiglou. 2020. “Cellular Prion Protein (Prpc): Putative Interacting Partners and Consequences of the Interaction.” *International Journal of Molecular Sciences* 21(19):1–38.
 59. Müller, Ulrike C., Thomas Deller ir Martin Korte. 2017. “Not Just Amyloid: Physiological Functions of the Amyloid Precursor Protein Family.” *Nature Reviews Neuroscience* 18(5):281–98.
 60. Niu, Zheng, Zhengfeng Zhang, Weijing Zhao ir Jun Yang. 2018. “Interactions between Amyloid β Peptide and Lipid Membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*

- 1860(9):1663–69.
61. O'Brien, Richard J. ir Philip C. Wong. 2011. "Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease." *Annual Review of Neuroscience* 34:185–204.
 62. Park, Seongmin, Yelim Yi ir Mi Hee Lim. 2021. "Reactivity of Flavonoids Containing a Catechol or Pyrogallol Moiety with Metal-Free and Metal-Associated Amyloid- β ." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 42(1):17–24.
 63. Pérez, Daniel R., Fred F. Damberger ir Kurt Wüthrich. 2010. "Horse Prion Protein NMR Structure and Comparisons with Related Variants of the Mouse Prion Protein." *Journal of Molecular Biology* 400(2):121–28.
 64. Präbst, Konstantin, Hannes Engelhardt, Stefan Ringgeler ir Holger Hübner. 2017. "Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin." *Methods in Molecular Biology* 1601:1–17.
 65. Qin, Zhe, Ying Sun, Baohuan Jia, Dan Wang, Yan Ma ir Gang Ma. 2017. "Kinetic Mechanism of Thioflavin T Binding onto the Amyloid Fibril of Hen Egg White Lysozyme." *Langmuir* 33(22):5398–5405.
 66. Ruggeri, Francesco Simone, Tomas Šneideris, Michele Vendruscolo ir Tuomas P. J. Knowles. 2019. "Atomic Force Microscopy for Single Molecule Characterisation of Protein Aggregation." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 664(November 2018):134–48.
 67. Sakalauskas, Andrius, Mantas Ziaunys, Ruta Snieckute ir Vytautas Smirnovas. 2021. "Autoxidation Enhances Anti-Amyloid Potential of Flavone Derivatives." *Antioxidants* 10(9):1428.
 68. Sarell, Claire J., Peter G. Stockley ir Sheena E. Radford. 2013. "Assessing the Causes and Consequences of Co-Polymerization in Amyloid Formation." *Prion* 7(5):359–68.
 69. Scheckel, Claudia ir Adriano Aguzzi. 2018. "Prions, Prionoids and Protein Misfolding Disorders." *Nature Reviews Genetics* 19(7):405–18.
 70. Sebastiao, Mathew, Noe Quittot ir Steve Bourgault. 2017. "Thioflavin T Fluorescence to Analyse Amyloid Formation Kinetics: Measurement Frequency as a Factor Explaining Irreproducibility." *Analytical Biochemistry* 532:83–86.
 71. Sharoar, Md Golam, Arjun Thapa, Mohammad Shahnawaz, Vijay Sankar Ramasamy, Eun Rhan Woo, Song Yub Shin ir Il Seon Park. 2012. "Keampferol-3-O-Rhamnoside Abrogates Amyloid Beta Toxicity by Modulating Monomers and Remodeling Oligomers and Fibrils to Non-Toxic Aggregates." *Journal of Biomedical Science* 19(1):1–13.
 72. Sigurdson, Christina J., Jason C. Bartz ir Markus Glatzel. 2019. "Cellular and Molecular Mechanisms of Prion Disease." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*

- 14(1):497–516.
73. Singh, Manjinder, Maninder Kaur ir Om Silakari. 2014. “Flavones: An Important Scaffold for Medicinal Chemistry.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 84:206–39.
74. Sneideris, Tomas, Katažyna Milto ir Vytautas Smirnovas. 2015. “Polymorphism of Amyloid-like Fibrils Can Be Defined by the Concentration of Seeds.” *PeerJ* 2015(8).
75. Solanki, Isha, Priyanka Parihar, Mohammad Lukman Mansuri ir Mordhwaj S. Parihar. 2015. “Flavonoid-Based Therapies in the Early Management of Neurodegenerative Diseases.” *Advances in Nutrition* 6(1):64–72.
76. Stockert, Juan C., Alfonso Blázquez-Castro, Magdalena Cañete, Richard W. Horobin ir Ángeles Villanueva. 2012. “MTT Assay for Cell Viability: Intracellular Localization of the Formazan Product Is in Lipid Droplets.” *Acta Histochemica* 114(8):785–96.
77. Stylianou, Andreas, Stylianos Vasileios Kontomaris, Colin Grant ir Eleni Alexandratou. 2019. “Atomic Force Microscopy on Biological Materials Related to Pathological Conditions.” *Scanning* 2019.
78. Taguchi, Yuzuru ir Noriyuki Nishida. 2017. “Secondary-Structure Prediction Revisited: Theoretical β -Sheet Propensity and Coil Propensity Represent Structures of Amyloids and Aid in Elucidating Phenomena Involved in Interspecies Transmission of Prions.” *PLoS ONE* 12(2):1–18.
79. Tan, Junfeng, Wouter J. C. De Bruijn, Annemiek Van Zadelhoff, Zhi Lin ir Jean Paul Vincken. 2020. “Browning of Epicatechin (EC) and Epigallocatechin (EGC) by Auto-Oxidation.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(47):13879–87.
80. Terry, Cassandra ir Jonathan D. F. Wadsworth. 2019. “Recent Advances in Understanding Mammalian Prion Structure: A Mini Review.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12(July):1–7.
81. Verma, Meenakshi, Abhishek Vats ir Vibha Taneja. 2015. “Toxic Species in Amyloid Disorders: Oligomers or Mature Fibrils.” *Annals of Indian Academy of Neurology* 18(2):138–45.
82. Verma, Smita, Velayutham Ravichandiran ir Nihar Ranjan. 2021. “Beyond Amyloid Proteins: Thioflavin T in Nucleic Acid Recognition.” *Biochimie* 190:111–23.
83. Wang, Jian Bo, Yi Min Wang ir Cheng Ming Zeng. 2011. “Quercetin Inhibits Amyloid Fibrillation of Bovine Insulin and Destabilizes Preformed Fibrils.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415(4):675–79.
84. Wang, Tian yang, Qing Li ir Kai shun Bi. 2018. “Bioactive Flavonoids in Medicinal Plants: Structure, Activity and Biological Fate.” *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 13(1):12–

- 23.
85. Wang, Xiang, Yujia Cao, Siyu Chen, Jiachen Lin, Jinsong Bian ir Dejian Huang. 2021. “Anti-Inflammation Activity of Flavones and Their Structure-Activity Relationship.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69(26):7285–7302.
86. Watts, Joel C., Matthew E. C. Bourkas ir Hamza Arshad. 2018. “The Function of the Cellular Prion Protein in Health and Disease.” *Acta Neuropathologica* 135(2):159–78.
87. Weis, Serge, Michael Sonnberger, Andreas Dunzinger, Eva Voglmayr, Martin Aichholzer, Raimund Kleiser ir Peter Strasser. 2019. “Neurodegenerative Diseases: Alzheimer Disease (AD).” Pp. 897–931 in *Imaging Brain Diseases*, edited by S. Weis, M. Sonnberger, A. Dunzinger, E. Voglmayr, M. Aichholzer, R. Kleiser, and P. Strasser. Vienna: Springer Vienna.
88. Whidden, Mark, Allison Ho, Magdalena I. Ivanova ir Santiago Schnell. 2014. “Competitive Inhibition Reaction Mechanisms for the Two-Step Model of Protein Aggregation.” *Biophysical Chemistry* 193–194:9–19.
89. Wilkins, Heather M. ir Russell H. Swerdlow. 2017. “Amyloid Precursor Protein Processing and Bioenergetics.” *Brain Research Bulletin* 133:71–79.
90. Willbold, Dieter, Birgit Strodel, Gunnar F. Schröder, Wolfgang Hoyer ir Henrike Heise. 2021. “Amyloid-Type Protein Aggregation and Prion-like Properties of Amyloids.” *Chemical Reviews* 121(13):8285–8307.
91. Wille, Holger ir Jesús R. Requena. 2018. “The Structure of PrP^{Sc} Prions.” *Pathogens* 7(1):1–11.
92. Yonekura-Sakakibara, Keiko, Yasuhiro Higashi ir Ryo Nakabayashi. 2019. “The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism.” *Frontiers in Plant Science* 10(August):1–16.
93. Zaman, Masihuz, Asra Nasir Khan, Wahiduzzaman, Syed Mohammad Zakariya ir Rizwan Hasan Khan. 2019. “Protein Misfolding, Aggregation and Mechanism of Amyloid Cytotoxicity: An Overview and Therapeutic Strategies to Inhibit Aggregation.” *International Journal of Biological Macromolecules* 134:1022–37.
94. Zeng, Yue Qin, Yin Bo Cui, Juan Hua Gu, Chen Liang ir Xin Fu Zhou. 2018. “Scutellarin Mitigates A β -Induced Neurotoxicity and Improves Behavior Impairments in AD Mice.” *Molecules* 23(4):1–12.
95. Zhang, Yuan, Yanfang Zhao, Lei Zhang, Wanpeng Yu, Yu Wang ir Wenguang Chang. 2019. “Cellular Prion Protein as a Receptor of Toxic Amyloid-B42 Oligomers Is Important for Alzheimer’s Disease.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13(July):1–9.
96. Zhu, Min, Shubo Han ir Anthony L. Fink. 2013. “Oxidized Quercetin Inhibits α -Synuclein

- Fibrillization.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830(4):2872–81.
97. Ziaunys, Mantas ir Vytautas Smirnovas. 2019. “Additional Thioflavin-T Binding Mode in Insulin Fibril Inner Core Region.” *Journal of Physical Chemistry B* 123(41):8727–32.

PRIEDAI

1 lentelė. Flavonų sąrašas.

Numeris	Pavadinimas
1	5,6-Dihidroksiflavonas
2	7,8-Dihidroksiflavonas
3	3',4'-Dihidroksiflavonas
4	2',3'-Dihidroksiflavonas
5	6,2',3'-Trihidroksiflavonas
6	7,8,2'-Trihidroksiflavonas
7	6,3',4'-Trihidroksiflavonas
8	7,8,3'-Trihidroksiflavonas
9	7,8,4'-Trihidroksiflavonas
10	7,3',4'-Trihidroksiflavonas
11	Skutelareinas, 5,6,7,4'-Tetrahidroksiflavonas
12	3,6,3',4'-Tetrahidroksiflavonas
13	3,7,8,2'-Tetrahidroksiflavonas
14	6,7,3',4'-Tetrahidroksiflavonas
15	Luteolinas, 5,7,3',4'-Tetrahidroksiflavonas
16	7,8,3',4'-Tetrahidroksiflavonas
17	5,7,3',4',5'-Pentahidroksiflavonas
18	3,6,2',4',5'-Pentahidroksiflavonas
19	Kvercetas, 3,5,7,3',4'-Pentahidroksiflavonas
20	3,7,3',4',5'-Pentahidroksiflavonas
21	Miricetas, 3,5,7,3',4',5'-Heksahidroksiflavonas