



**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

Biochemijos studijų programos II kurso studentas

Dominykas Veiveris

**SULFONAMIDŲ IR ALFA-SINUKLEINO POVEIKIS SUPEROKSIDO  
DISMUTAZĖS-1 AGREGACIJAI**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovas

Vytautas Smirnovas

Vilnius, 2022

Baigiamasis darbas

**SULFONAMIDŲ IR ALFA-SINUKLEINO POVEIKIS SUPEROKSIDO  
DISMUTAZĖS-1 AGREGACIJAI**

Darbas paruoštas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto

Amiloidų tyrimo sektoriuje

Studentas:

Dominykas Veiveris

---

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas Smirnovas

---

Vilnius, 2022

# Turinys

Santrumpos .....	5
Įvadas .....	6
1. Literatūros apžvalga .....	7
1.1. Superoksido dismutazės .....	8
1.2. Neurodegeneracinės ligos .....	9
1.3. Amiotrofinė lateralinė sklerozė .....	10
1.3.1. Ligos simptomai ir naudojami vaistai .....	11
1.3.2. Rizikos veiksniai .....	13
1.3.3. SOD1 vaidmuo ALS, ligos mechanizmas .....	13
1.4. Amiloidinė baltymų agregacija .....	14
1.4.1. Baltymų susilankstymas .....	14
1.4.2. Agregacijos mechanizmas .....	15
1.4.3. Aplinkos veiksnių įtaka agregacijai .....	17
1.4.4. Agregatų struktūra .....	17
1.5. Agregacijos slopikliai .....	18
1.6. SOD1 agregacijos slopikliai .....	19
1.7. Alfa-sinukleinas .....	19
1.8. Agregacijos tyrimai <i>in vitro</i> .....	20
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	23
2.1. Medžiagos ir laboratorinė įranga .....	23
2.1.1. Laboratorinė įranga .....	23
2.1.2. Medžiagos .....	24
2.1.3. Tirpalai .....	24
2.1.4. Ląstelės .....	25
2.1.5. Konstruktas .....	25
2.1.6. Tirpalai .....	25
2.2. Metodai .....	25
2.2.1. Plazmidinės DNR transformacija .....	25
2.2.2. Baltymo sintezė .....	26
2.2.3. Superoksido dismutazės-1 gryninimas .....	26
2.2.4. Alfa-sinukleino gryninimas .....	26

2.2.5. Baltymų elektroforezė .....	27
2.2.6. Amiloidinių fibrilių gaminimas ir agregacijos kinetikos tyrimai.....	27
2.2.7. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija .....	28
2.2.8. Atominės jėgos mikroskopija .....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	29
3.1. Alfa-sinukleino poveikis SOD1 amiloidinei agregacijai .....	29
3.2. Sulfonamidų įtaka SOD1 amiloidinei agregacijai .....	32
3.3. AV20-07-2 įtaka SOD1 agregacijai su alfa-sinukleinu .....	40
Išvados .....	44
Santrauka .....	45
Summary .....	46
Literatūros sąrašas .....	47

## Santrumpos

AA/BAA – akrilamidas/bisakrilamidas

AFM – atominės jėgos mikroskopija

ALS – amiotrofinė lateralinė sklerozė

APS – amonio persulfatas

APTES – 3-aminopropil-trietoksisilanas

ASyn –  $\alpha$ -sinukleinas

Bcl-2 – antiapoptotinis baltymas B-ląstelių limfoma 2

C9ORF72 – 9 chromosomos atviras skaitymo rėmelis 72

CCS – superoksido dismutazę 1 sulankstantis šaperonas

DMSO - dimetilsulfoksidai

DTT – ditionitritolis

EAAT – sužadinas aminorūgščių transporteris

EDTA – etilendiaminotetraacetato rūgštis

FUS – RNR prisijungiantis baltymas (ang. *Fused in sarcoma*)

GPP – gyvybinis plaučių tūris

IMAC – metalo jonais imobilizuotas afininės chromatografijos sorbentas

LB – mitybinė Luria-Bertani terpė

NDS – natrio dodecilsulfatas

S.O.C. – mitybinė terpė (ang. *Super Optimal Broth*)

SDS-PAGE – elektroforezė poliakrilamido gelyje naudojant natrio dodecilsulfatą

SOD – superoksido dismutazė

SOD1 – vario/cinko superoksido dismutazė

TEMED - tetraetilmetilendiaminas

TBP-43 – TAR DNR prijungiantis baltymas 43

ThT – tioflavinas T

## IVADAS

Neurodegeneracinės ligos – lėtinės nervų sistemos ligos, kuriomis sergantiems žmonėms pasireiškia judėjimo, kalbėjimo, mąstymo bei kvėpavimo sutrikimai. Dažniausiai šiomis ligomis suserga vyresnio amžiaus žmonės, o gyvenimo trukmė po diagnozės įprastai trunka tik iki kelerių metų. Neurodegeneracines ligas sieja baltymų agregatų sankaupos nervų sistemos ląstelėse arba šalia jų. Tokio tipo dariniai sutrikdo normalią ląstelės veiklą užtikrinančius procesus bei nulemia ląstelių žūtį. Baltymų amiloidiniams agregatams būdinga iš  $\beta$ -klosčių sudaryta struktūra, atspari detergentams, bei baltymus skaidantiems fermentams. Susidarančios baltymų fibrilės būna kelių nanometrų pločio ir gali užaugti iki kelių mikrometrų ilgio. Kai kuriais atvejais smegenyse aptinkami neurofibriliniai dariniai, sudaryti iš skirtingų baltymų. Tai nulemia amiloidogeninių baltymų tarpusavio sąveika agregacijos metu. Nustatyta, jog vieno baltymo agregacija gali būti inicijuojama kito baltymo fibrilėmis. Tokiu atveju gali pasikeisti agregacijos laikas bei susidarančių darinių konformacijos, dėl ko gali sustiprėti amiloidinių ligų simptomai bei progresavimo greitis. Viena iš amiloidų sukeltų neurodegeneracinių ligų yra amiotrofinė lateralinė sklerozė (ALS), kurios metu žūva sergančių asmenų motoriniai neuronai ir dėl to suprastėja ligonių raumenų veikla. Ši liga siejama su superoksido dismutazės-1 (SOD1) amiloidine agregacija, kuri vyksta dėl atsiradusių mutacijų šį baltymą koduojančiame gene, susidarant neteisingą erdvinę struktūrą suformuojančioms baltymo molekulėms. Kol kas vaistų, galinčių pilnai išgydyti ALS, nėra, tačiau yra bandoma sukurti preparatus, galinčius slopinti SOD1 agregatų susidarymą. Dažnu atveju slopiklių ieškoma tarp rinkoje esančių bei kitų amiloidus formuojančių baltymų agregaciją slopinančiu poveikiu pasižymėjusių junginių. Vieni iš tokių junginių – sulfonamido funkcinę grupę turinčios medžiagos, tarp kurių yra Alzheimerio ligą sukeliančio amiloido- $\beta$  peptido agregaciją lėtinančių preparatų.

Šio darbo metu siekiama ištirti Parkinsono ligos metu amiloidinius darinius suformuojančio baltymo alfa-sinukleino (ASyn) monomerų ir agregatų įtaką SOD1 amiloidinei agregacijai. Taip pat bus bandoma nustatyti sulfonamidų poveikį SOD1 agregatų susidarymui bei išsiaiškinti, ar šis poveikis pasikeičia, kuomet SOD1 agreguoja kartu su ASyn.

Darbo tikslas: Ištirti sulfonamidų ir alfa-sinukleino poveikį SOD1 amiloidinei agregacijai.

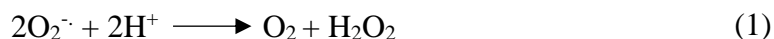
Uždaviniai:

1. Ištirti ASyn monomerų ir agregatų įtaką SOD1 amiloidinei agregacijai.
2. Atlikti 64 sulfonamidų įtakos SOD1 amiloidinei agregacijai tyrimą.
3. Nustatyti, kaip pasikeičia sulfonamidų poveikis SOD1 agregacijai, kai į tirpalą pridedama ASyn.

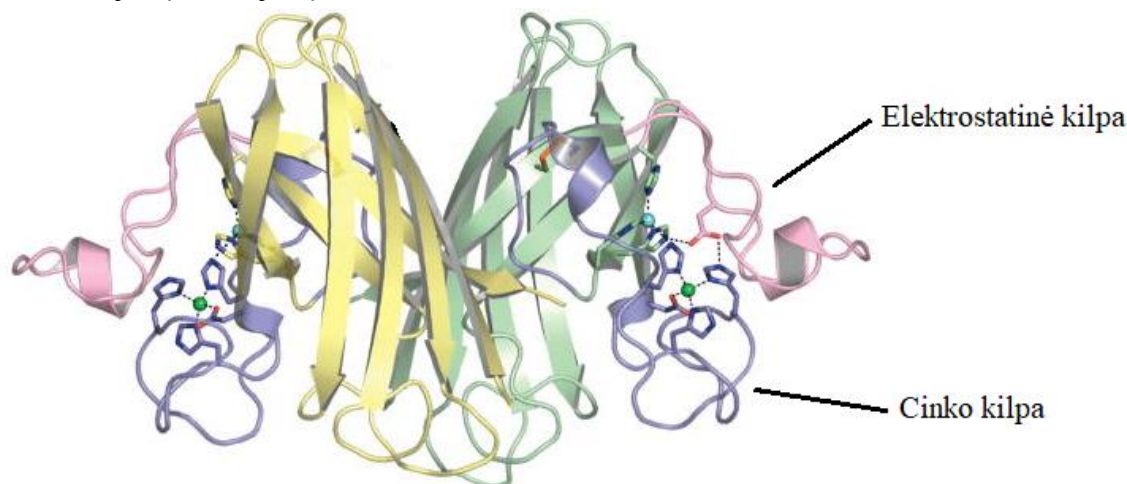
# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Superoksido dismutazės

Superoksido dismutazės (SOD) – grupė metalofermentų, saugančių ląsteles nuo reaktyvių deguonies formų (superoksido  $O_2^-$  radikalų) toksiškumo, katalizuojant jų virstimą į deguonies ir vandenilio peroksido molekules:



SOD pagal aktyviuosiuose centruose esančius metalo jonus skirstomos į keturias grupes: Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD ir Ni-SOD (Wright *et al*, 2019). Superoksido dismutazė-1 (Cu/Zn SOD; SOD1) – iš dviejų identiškų subvienetų sudarytas 32 kDa fermentas (1.1 pav.), esantis mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje ir citozolyje. Kiekvieną iš subvienetų sudaro  $\beta$ -statinės struktūra, kurią suformuoja 8 antilygiagrečiai susijungiančios  $\beta$ -klostės bei dvi funkciškai svarbios kilpos. Elektrostatinė kilpa sudaryta iš polinių ir krūvį turinčių aminorūgščių, kurių elektrostatinė sąveika su aktyviojo centro aminorūgštėmis, orientuotomis aplink vario joną, padidina fermentinės reakcijos efektyvumą. Oksidacijos-redukcijos reakcijoje dalyvaujantis vario jonas esant oksiduotoje (Cu(II)) formoje koordinuojamas keturių histidino šoninių grupių, redukuotoje (Cu(I)) – trijų, o cinko kilpoje esančios trys histidino ir viena aspartato šoninė grupė koordinuoja baltymo struktūrą stabilizuojantį cinko joną (Seetharaman *et al*, 2009).



**1.1 pav.** SOD1 erdvinė struktūra (pagal Seetharaman *et al*, 2009). Žydra spalva žymėtas  $Cu^{2+}$  jonas, žalia –  $Zn^{2+}$  jonas, pažymėtos aminorūgštys, koordinuojančios metalo jonus.

SOD1 būdingi keli potransliacinio brendimo etapai. Pirmiausia, monomerinė apoSOD1<sup>2SH</sup> prisijungia cinko atomą, vėliau įvyksta baltymo dimerizacija. Tuomet prijungiamas vario atomas ir galiausiai oksiduojamos 57-oje ir 146-oje pozicijoje esančių cisteinų šoninės grupės, tarp kurių susidaro baltymo struktūrą stabilizuojantis disulfidinis tiltelis. Visus SOD1 brendimo etapus atlieka vario šaperonas CCS (Culik *et al*, 2018).

Eukariotuose aptinkama ir mitochondrijose esanti mangano jonus prisijungianti SOD2 bei užląstelinėje erdvėje esanti tetramerinė vario/cinko superoksido dismutazė (SOD3) (Mohammedi *et al.*, 2014; Parascandolo ir Laukkanen, 2021). Tuo tarpu Ni-SOD būdinga tik prokariotiniams organizmams, išskyrus žaliuosius dumblius, o Fe-SOD aptinkama bakterijose, archėjose, augalų chloroplastuose bei protistų citozolyje ir mitochondrijose (Sheng *et al.*, 2014; Miller, 2017).

## 1.2. Neurodegeneracinės ligos

Neurodegeneracinės ligos – tai lėtinės nervų sistemos ligos, pasižyminčios progresyvia neuronų žūtimi, kurią sukelia smegenyse susidarančios amiloidinių agregatų sankaupos (Gitler *et al.*, 2017). Neurodegeneracinių ligų skirstymą apibūdina keli aspektai:

- Klinikiniai simptomai, kuriuos nulemia tam tikrame anatominiame regione įvykstantys nervinio audinio ląstelių funkcijų sutrikimai ir žūtis. Nors ligai progresuojant pacientams pasireiškia daugelis įvairių sutrikimų vienu metu, klinikinė ligos požymių klasifikacija svarbi ankstyvųjų simptomų nustatymui ir gydymui. Ligų patofiziologiniai požymiai gali skirtis – vienoms ligoms būdingi atminties ir kognityvinių procesų sutrikimai, siejami su hipokampo, limbinės sistemos, neokortekso bei entortinės smegenų žievės (ang. *Entorhinal cortex*) pažeidimais, kitos ligos sukelia judėjimo, kalbėjimo, kvėpavimo sutrikimus, susijusius su bazalinių ganglijų, talamo, cerebralinės smegenų žievės bei nugaros smegenų motorinių neuronų sutrikimais (Kovacs, 2017). Šių simptomų kombinacija būdinga ir jau ankstyvoje kai kurių ligų (pvz. prioninių ligų) stadijoje, o ligai progresuojant pasireiškia daugumos neurodegeneratyvinių sutrikimų atveju.
- Ląstelinės patologijos: lemia, kurie ląstelių tipai patiria pažeidimus (neuronai, glijos ląstelės), kuriose ląstelių vietose arba tarpląstelinėje erdvėje kaupiasi baltyminiai agregatai (Kovacs, 2019).
- Skirtingi pakitusią erdvinę struktūrą turintys ir agregacijos procesuose dalyvaujantys amiloidogeniniai baltymai (1.1 lentelė), pagal kuriuos išskiriamos pagrindinės neurodegeneracinių ligų klasės: amiloidozės, alfa-sinukleopatijos (alfa-sinukleinas), prioninės ligos (prioninis baltymas), tauopatijos (tau baltymas), TDP-43 proteinopatijos (TAR DNR prijungiantis baltymas-43) ir kt. (Biagioni *et al.*, 2013; Ganguly ir Jog, 2020; Boer *et al.*, 2020).



1.1 lentelė. Amiloidogeniniai baltymai ir jų sukelti neurodegeneratyviniai sutrikimai (pagal Eftekharzadeh *et al*, 2016; Tee *et al*, 2018).

Amiloidas $\beta$	Alzheimerio liga
Alfa-sinukleinas	Parkinsono liga Demensija su Lewy kūneliais Daugybinės sistemos atrofija
Hantinginas	Hantingtono liga
Lizocimas	Paveldima sisteminė amiloidozė
Prioninis baltymas	Creutzfeldto-Jakobo liga Gertsmanno-Strausslerio-Scheinkerio sindromas
Tau	Progresuojantis supranuklearinis paralyžius Picko liga Globulinė glijos tauopatija
TDP-43	Pirminė lateralinė sklerozė Progresyvi raumenų atrofija
Transtiretinis	Paveldima amiloidinė polineuropatija
Superoksido dismutazė-1	Amiotrofinė lateralinė sklerozė

### 1.3. Amiotrofinė lateralinė sklerozė

Amiotrofinė lateralinė sklerozė (ALS), dar vadinama Lu Gerigo liga (pavadinta žymaus XX a. beisbolo žaidėjo, sirgusio šia liga, vardu), – plačiai paplitusi neurodegeneracinė liga, pasižyminti progresyvia motorinių neuronų žūtimi. Dauguma atvejų liga pasireiškia spontaniškai (90-95%), o ALS paveldėjimo atvejai sudaro tik nedidelę dalį visų ligos atvejų (5-10%) (Zarei *et al*, 2015). Tačiau tiek spontaniškos, tiek paveldėtos ALS yra susijusi su genetinėmis mutacijomis baltymus koduojančiuose genuose (1.2 lentelė), kurių šiuo metu nustatyta virš 40. Šios mutacijos sutrikdo tiek baltymų, atsakingų už įvairių ląstelinių procesų (RNR stabilumo, funkcionalumo palaikymą, proteostazę, baltymų kokybės kontrolę, citoskeleto dinamiškumo palaikymą, autofagijos valdymą) veiklą, tiek koduojamų baltymų erdvinę struktūrą ir susilankstymo procesus, ko pasekoje formuojasi netirpios pakitusią konformaciją įgyjusių baltymų sankaupos, besikaupiančias motoriniuose neuronuose ir nulemiančias jų funkcionalumo praradimą ir žūtį (Taylor *et al*, 2016).

1.2 lentelė. Su ALS susiję genai, jų koduojami baltymai ir funkcijos (pagal Taylor *et al*, 2016).

Genas	Baltymas	Vaidmuo ląstelėje
<i>SOD1</i>	Cu/Zn superoksido dismuatzė	Oksidacinio streso mažinimas
<i>DCTN1</i>	Dinaktino subvienetas 1	Dineino motorinio komplekso komponentas
<i>ANG</i>	Angiogeninas	Ribonukleacija
<i>TARDBP</i>	TDP-43	Sąveika su DNR, RNR
<i>FUS, HNRNPA, MATR3</i>	FUS, hnRNPA1, Matrinas 3	Sąveika su RNR
<i>VCP</i>	Endoplazminio tinklo ATPazė	Ubikvitino segregacija
<i>OPTN, UBQLN2, SQSTM1</i>	Optineurinas, ubikvilinas 2, sekvestosoma 1	Autofagijos adaptorius
<i>C9orf72</i>	C9orf72	Guanino nukleotidų mainų veiksnys
<i>PFN1</i>	Profilinas 1	Sąveika su aktinu
<i>TUBA4A</i>	Tubulino $\alpha$ -4A grandinė	Mikrovamzdelių komponentas
<i>TBK1</i>	Serino / treonino baltymų kinazė TBK1	Autofagijos ir uždegimo reguliacija

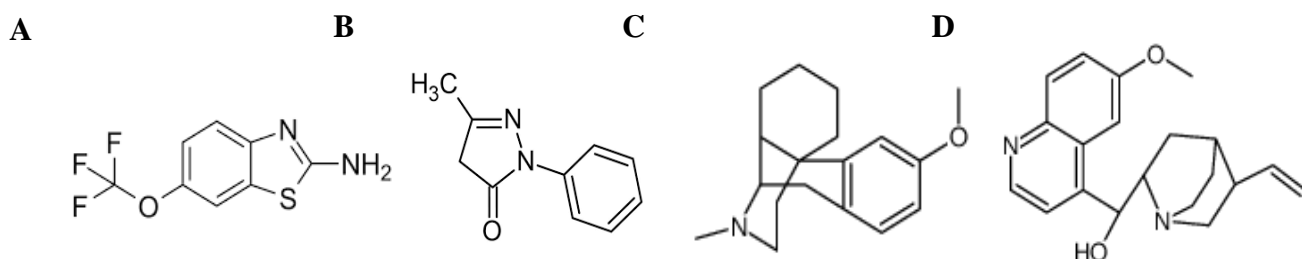
Pagal statistikos duomenis, dešimtajame XX a. dešimtmetyje sergančiųjų ALS rodiklis siekė 1,5 – 2,7 atvejo 100 000 gyventojų per metus, XXI a. pirmajame dešimtmetyje 2,7 atvejo 100 000 gyventojų per metus, o 2015 metais ALS sirgo 222 801 žmogus (~3 atvejai 100 000 gyventojų). Dėl didėjančio vyresnio amžiaus žmonių populiacijos kiekio prognozuojama, jog šis skaičius ateityje nuolat didės ir 2040 m. galėtų pasiekti 375 000 atvejų visame pasaulyje (Arthur *et al*, 2016). Pastebėta, jog tikimybė susirgti ALS gali priklausyti nuo rasės, geografinio regiono ar lyties (vyrai ALS serga dažniau), tačiau pagrindinis veiksnys nulemiantis ALS pasireiškimą – pacientų amžius (Aktekin ir Uysal, 2020). ALS susergama vidutiniškai esant 50–65 metų amžiaus, o ligos pasireiškimo tikimybė senstant didėja su kiekvienais metais, tad sulaukusių 80 metų amžiaus arba vyresnių žmonių tarpe vyrams ALS pasireiškia apie 10,2 atvejo 100 000 gyventojų per metus, tarp moterų šis rodiklis siekia apie 6,1 (Talbot *et al*, 2016).

### 1.3.1. Ligos simptomai ir naudojami vaistai

ALS simptomus nulemia ligos metu vykstantis motorinių neuronų naikinimas, sutrikdantis raumenų veiklą įvairiose kūno vietose. ALS sergantys žmonės patiria lėtinius kvėpavimo sistemos sutrikimus, kylančius dėl susilpnėjusios diafragmos ir tarpšonkaulinių raumenų veiklos (Zarei *et al*,

2015). Ligos simptomų progresavimo įvertinimui naudojamas gyvybinio plaučių pajėgumo (GPP) matas, parodantis kokį kiekį oro žmogus gali įkvėpti, lyginant su maksimaliu įkvėpamo oro kiekiu žmogui esant sveikam. GPP pasiekus 50 % pacientai pradeda jausti ligos simptomus, o nukritus žemiau, patiria rimtus kvėpavimo sutrikimus, dėl kurių plaučių pajėgumo palaikymui naudojami invaziniai ir neinvaziniai plaučių ventiliavimo metodai, ženkliai padidėja mirties tikimybė (Andrews *et al*, 2018). Progresuojant kramtymo ir rijimo raumenų veiklos sutrikimams pasireiškia disfagija, stebimas svorio kritimas, sergantiejiems pritaikomos specialios dietos ir, reikalui esant, prie virškinamojo trakto prijungiamas vamzdelis, kuriuo pacientui tiekiamas maistas. Ligos metu taip pat pasireiškia disartrijs, pasižyminti gebėjimo kalbėti silpnėjimu, dėl kurio pacientui tampa sunku komunikuoti su aplinka (Fransceschini ir Mourao, 2015).

Kol kas vaistų, galinčių pilnai išgydyti ALS nėra, o naudojami preparatai skirti ligos simptomams malšinti bei gyvenimo trukmei prailginti. Šiuo metu JAV maisto ir vaistų asociacija yra patvirtinusi keturių pagrindinių medžiagų – riluzolo (Rilutek<sup>®</sup>, Tiglutik<sup>®</sup>, Exservan<sup>®</sup>), edaravono (Radicava<sup>®</sup>), deksstrometorfano ir kvinidino (Nuedexta<sup>®</sup>) naudojimą ALS terapijoje. Riluzolas (1.3 pav. A) – 1995 m. pirmasis FDA patvirtintas preparatas nuo ALS, kuris slopindamas gliutamato išsiskyrimą iš neuronų sumažina šio neuromediatoriaus eksitotoksiškumą bei apsaugo aksonus nuo degeneracijos. Nustatyta, jog šio vaisto vartojimas gali prailginti paciento gyvenimo trukmę nuo kelių mėnesių iki vienerių metų (Hinchcliffe ir Smith, 2017). 2017 m. FDA patvirtino edaravono (1.3 pav. B) naudojimą ALS terapijoje. Nors tikslus šio vaisto mechanizmas nėra iki galo žinomas, manoma, jog edaravonas veikia kaip antioksidantas, aktyvuojantis Nrf2/HO-1 signalinį kelią, kurio metu sintetinami produktai neuronuose mažina laisvųjų deguonies radikalų kiekį ir apsaugo ląsteles nuo apoptozės (Cho ir Shukla, 2020). Dekstrometorfanas (1.3 pav. C) ir kvinidinas (1.3 pav. D) naudojami kartu, siekiant pagerinti pseudobulbarinio efekto sindromo kamuojamų ALS pacientų būklę (Yang ir Deeks, 2014).



1.3 pav. FDA patvirtintų vaistų nuo ALS struktūrinės formulės. A – riluzolas, B – edaravonas, C – deksstrometorfanas, D – kvinidinas.

### 1.3.2. Rizikos veiksniai

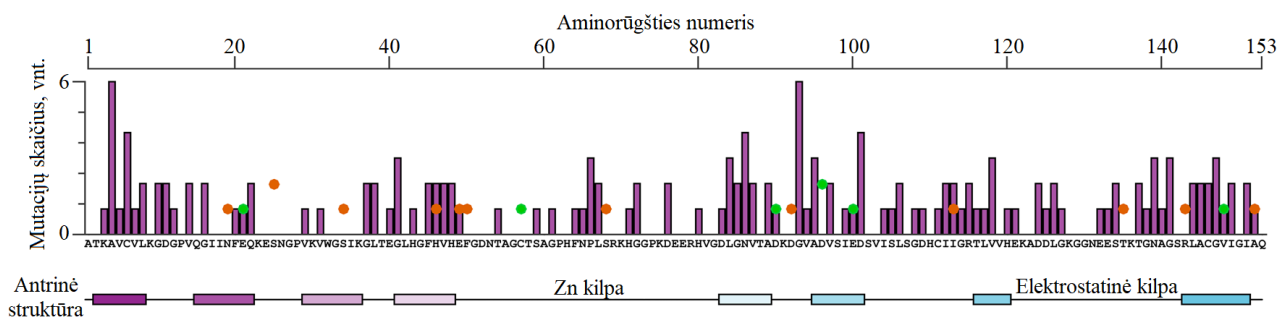
Nors ALS siejama su baltymus koduojančių genų mutacijomis, nemaža dalis šios ligos atveju yra spontaniai, kurių susidarymo priežastys nėra iki galo žinomos. Manoma, didelę įtaką spontaninei ALS turi įvairūs aplinkos veiksniai, iš kurių išskirti keli pagrindiniai:

- Rūkymas ir sunkieji metalai. Rūkymas laikomas pagrindiniu negenetiniu ALS rizikos veiksniu. Tabako gaminių dūmuose aptinkami sunkieji metalai pasižymi neurotoksiškumu, padidina oksidacinį stresą ląstelėse, sukelia uždegiminius procesus, o iškvepiamuose tabako dūmuose esantis formaldehidas siejamas su didesniu ALS pacientų mirštamumu. Tarp sunkiųjų metalų, siejamų su ALS, plačiausiai ištirtas švino poveikis sveikatai. Nustatyta, jog didesnėmis švino koncentracijomis paveikti asmenys labiau linkę susirgti ALS, o gamyklose suvirintojais dirbantiems žmonėms ligos išsivystymo tikimybė padidėja net 2,5 karto. Manoma, kad švinas, pakeisdamas kalcį ląsteliniuose procesuose, pažeidžia mitochondrijų veiklą ir prisideda prie gliutamato eksitotoksiškumo neuronuose (Menounos *et al*, 2021).
- Buitiniai chemikalai. Buvo nustatytos sąsajos tarp herbicidų, insekticidų, trąšų, pesticidų naudojimo ir padidėjusios rizikos susirgti ALS (Bonvicini *et al*, 2010).
- Radiacija. Laboratoriniai tyrimai parodė, jog neuronuose, paveiktuose ypač mažo dažnio elektromagnetine spinduliuote susidaro didesni deguonies radikalų kiekiai negu įprastomis sąlygomis. Be to, radiacija sukelia dažnesnius genetinius pokyčius bei DNR grandinių pažaidas, nulemiančias apoptozės ir nekrozės procesų vyksmus (Samano *et al*, 2012).
- Fizinis aktyvumas. Pastebėta, jog atletai potencialiai labiau linkę į ALS, nors šiuo metu nėra tiksliai žinoma, kaip fizinis krūvis siejasi su ALS, tačiau manoma, jog pagrindiniai rizikos faktoriai galėtų būti pervargimas, galvos traumos bei naudojami nelegalūs sportiniai preparatai (Hu ir Robertson, 2020).

### 1.3.3. SOD1 vaidmuo ALS, ligos mechanizmas

*SOD1* genas buvo pirmasis, tarp kurio mutacijų ir ALS 1993 m. buvo nustatytas ryšys (Rosen *et al*, 1993). Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 180 su ALS siejamų *SOD1* mutacijų. Pradžioje buvo manoma, jog ALS susergama dėl mutacijų sukkelto *SOD1* funkcionalumo praradimo, nes tuo metu jau buvo žinomas ryšys tarp oksidacinio streso ir neurodegeneracinių procesų, tačiau atlikti tyrimai su pelėmis, kurioms buvo įvesta ALS sukelianti mutacija – 93-ioje pozicijoje esantis glicinas pakeistas į alaniną, parodė padidėjusį mutantinių *SOD1* baltymų fermentinį aktyvumą, o panašūs rezultatai gauti su dar keliolika mutacijų pelėse (Sutton *et al*, 2013). Vėliau nustatyta, jog ALS sukelia mutantinių *SOD1* baltymų toksinės funkcijos įgavimas. Dėl taškinių mutacijų, atsirandančių *SOD1* gene (1.4 pav.), susidarancios baltymo molekulės sulankstomos neteisingai, o suformuoti

konformerai pasižymi struktūriniu nestabilumu, dėl kurio SOD1 monomerai sukimba tarpusavyje suformuodami netirpias amiloidines sankaupas, sutrikdančias įvairius ląstelinius procesus (Wright *et al.*, 2019).



1.4. pav. *SOD1* geno mutacijų paveiktos aminorūgštys ir jų pozicijos (pagal Wright *et al.*, 2019). Violetiniai stulpeliai žymi galimų mutacijų kiekį ties tam tikra aminorūgšties pozicija, žali taškai – ne su ALS susijusius polimorfizmus, oranžiniai taškai – nepatvirtinus su ALS susijusias mutacijas.

Nervinio signalo perdavimui svarbus gliutamas, veikiantis kaip neurotransmiteris, sintetinamas presinaptiniame aksone, pakuojamas į pūsleles ir paleidžiamas į sinapsę. Pasiekęs postsinaptinio neuroono arba glijos ląstelės membraną, gliutamas pašalinamas iš sinaptinio plyšio aminorūgštimis sužadinais transporteriais (EAAT). ALS sergančių pacientų nugaros smegenų ir motorinės žievės bei transgeninę mutantinę *SOD1* turinčių pelių nervinėse ląstelėse aptiktas sumažėjęs EAAT2 kiekis. Pastebėta, jog *SOD1* mutantai aktyvuoja kaspazę-3, kuri nukerpa C-galinį EAAT2 domeną (Boston-Howes *et al.*, 2006). EAAT2 trūkumas sutrikdo stabilios gliutamato koncentracijos sinapsėse palaikymą, o sinaptiniame plyšyje besikaupiančios gliutamato molekulės smarkiai padidina gliutamato receptorių stimuliaciją, kuriai esant smarkiai padidėja kalcio jonų transportas į aktyvuojamo motorinio neuroono vidų (Ferraiuolo *et al.*, 2011). Laisvų kalcio jonų koncentracija ALS sergančių pacientų neuronuose padidėja ir dėl sumažėjusių kalcį prijungiančių baltymų parvalbumino ir kalbidino kiekių. Be to, ALS atveju mitochondrijų išorėje ir tarpmembraninėje ertmėje kaupiasi mutantinių *SOD1* baltymų amiloidiniai agregatai, sutrikdantys  $Ca^{2+}$  homeostazę ląstelėje. Nors nėra tiksliai žinoma, kaip kalcio jonų disbalansas paveikia neuronus, pastebėta, jog gliutamato sukelta motorinių neuronų hiperstimuliacija nulemia šių ląstelių pažaidas ir žūtį (Zarei *et al.*, 2015).

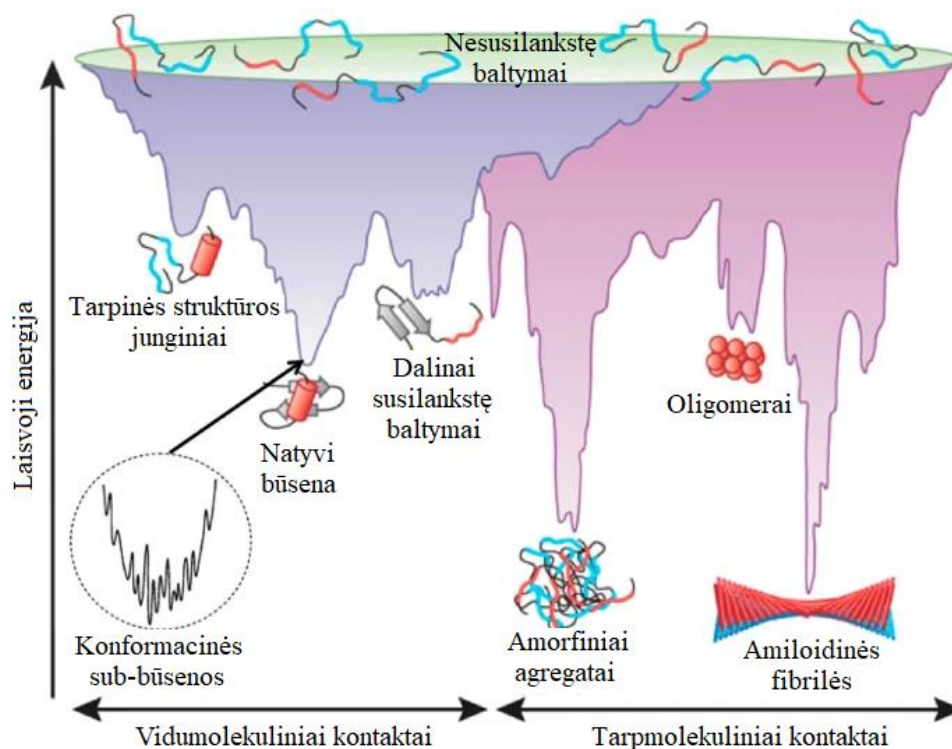
*SOD1* agregatų kaupimasis neigiamai paveikia ir kitas mitochondrijų funkcijas bei valdomus procesus. Bene svarbiausia iš jų – pagrindinės ląstelės energetinės medžiagos ATP sintezė. Nustatyta, jog *SOD1* mutacijomis pasižyminčių ALS pacientų neuronų mitochondrijose sutrikdoma elektronų pernašos grandinės I-ojo ir IV-ojo kompleksų, generuojančių ATP sintezei reikalingą  $H^+$  jonų

gradientą, veikla bei stebimi sumažėję ląstelinio ATP kiekiai (Pasinelli *et al*, 2006, Muyderman ir Chen, 2014). Neuronuose dėl agregatų kaupimosi sutrinka ne vien mitochondrijų funkcionalumas, bet ir jų transportas. Mitochondrijos įprastai transportuojamos išilgai aksonų į tas ląstelės vietas, kuriose yra išaugęs ATP ar kalcio jonų poreikis. Manoma, jog SOD1 agregatai gali blokuoti mikrovamzdeliais judančius motorinius baltymus kineziną bei dineino-dinaktino kompleksą, prie kurių mitochondrijos prisijungia. Aksonų galuose sumažėjus sinapsių veiklai vykdyti reikalingų kalcio jonų ir ATP kiekiams, sutrinka nervinio impulso perdavimas tarp motorinių neuronų (Shi *et al*, 2010). Be to, SOD1 amiloidai gali sutrikdyti ir kitų organelių bei įvairių baltymų, lipidų, RNR judėjimą neuronuose (Zarei *et al*, 2015). Galiausiai, SOD1 mutantai sąveikaudami su antiapoptotiniais Bcl-2 šeimos baltymais inicijuoja apoptozės sukeltą neuronų žūtį (Pasinelli *et al*, 2004).

## 1.4. Amiloidinė baltymų agregacija

### 1.4.1. Baltymų susilankstymas

Baltymai nuo sintezės pradžios iki degradacijos ląstelėje gali įgyti daugybę skirtingų konformacijų. Tam, kad susintetintas baltymas būtų funkcionalus, jis turi suformuoti tam tikrą erdvinę struktūrą. Nesusilankstę baltymai pasižymi didžiausia laisvąja energija ir entropine būseną (1.5 pav.).



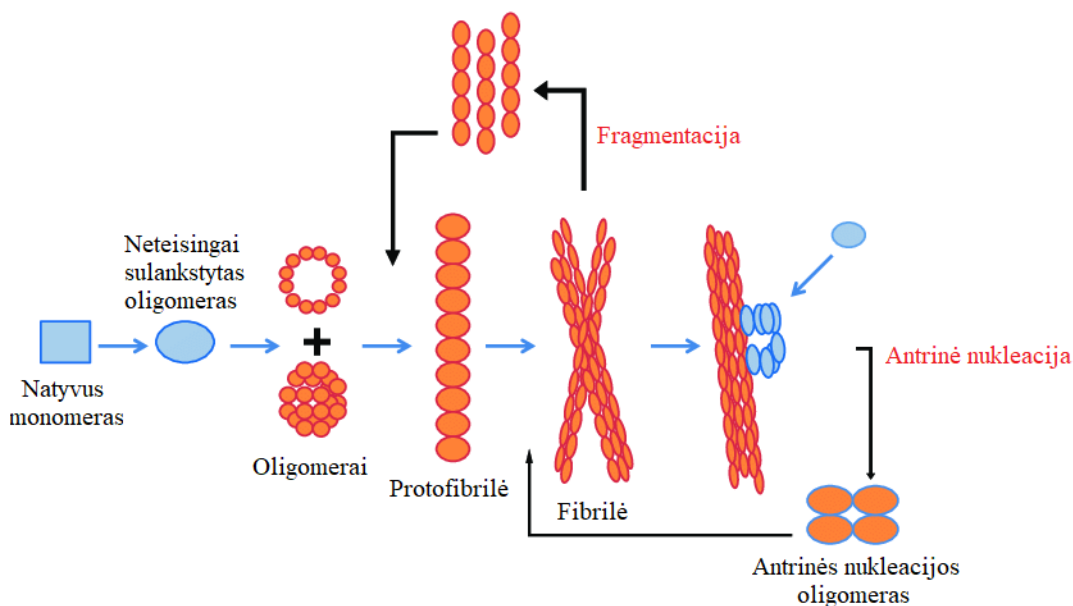
1.5. pav. Skirtingos baltymų suformuojamos erdvinės struktūros ir jų energetinės būsenos (pagal Raskatov ir Teplow, 2017).

Susilankstymo procesas vyksta skirtingiems baltymo fragmentams konformacinėje erdvėje judant laisvosios energijos ir entropijos mažėjimo kryptimi, kol suformuojama natyvi struktūra, kuri yra stabiliausia baltymo įgyjama konformacija ląstelėje (Best, 2018). Šio proceso metu tarpinės būsenos baltymo molekulės turi pereiti energetinius barjerus, o tai jiems padeda padaryti šaperonai, kurie prisijungia prie atvirų besilankstančio baltymo paviršiaus vietų ir neleidžia šiems baltymo dalims tarpusavyje sąveikauti bei sudaryti nefunkcionalias struktūras (Vahdat, 2019).

Ląstelinio streso metu, sutrikus šaperonų veiklai ar įvykus baltymo sekos pokyčiams baltymai nepilnai sulankstomi arba sulankstomi neteisingai. Tokių baltymų paviršiuje eksponuojama daugiau hidrofobinių aminorūgščių šoninių grandinių, kurios tarpusavyje sąveikauja agregatų sudarymo metu. Klaidingos struktūros baltymų susilankstymo metu, skirtingai negu natyvios būsenos molekulių atveju, perėjimai tarp tarpinės būsenos struktūrų gali vykti ir laisvosios energijos didėjimo kryptimi, tačiau pats agregacijos procesas yra termodinamiškai palankus, nes susidariusių agregatų laisvoji energija yra mažesnė nei pirminių baltymo struktūrų (Adamcik ir Mezzenga, 2018).

#### 1.4.2. Agregacijos mechanizmas

Baltymų amiloidinei agregacijai paaiškinti sukurta daug įvairių mechanizmų, tačiau visi jie pasižymi keliais esminiais žingsniais (1.6 pav.). Kaupiantis blogai susilankščiusiems baltymams pasiekama kritinė jų koncentracija ir prasideda nedidelių agregatų, vadinamų oligomerais formavimasis. Šis procesas vyksta lag fazės metu ir yra lėčiausia agregacijos stadija. Tuomet vyksta fibrilių ilgėjimas, kurios metu prie oligomerų, kurie dar vadinami agregacijos branduoliais, jungiasi kitos baltymo molekulės, o susidarantys dariniai persitvarko ir įgyja tvirtesnę  $\beta$ -klostytą struktūrą. Fibrilių ilgėjimas vyksta dviem kryptimis, kol pasiekama įsisotinimo fazė, kuomet susidaro maksimalus galimas agregatų kiekis. (Cohen *et al*, 2012).



1.6 pav. Baltymų amiloidinės agregacijos mechanizmas pagal (Verma *et al*, 2015).

Amiloidų formavimosi metu galimi ir nuo susidariusių fibrilių priklausomi antriniai agregacijos procesai – fibrilių fragmentacija bei antrinė nukleacija. Fragmentacija vyksta kuomet fibrilės suskyla į mažesnius agregatus ir dėl to pagreitėja agregacijos greitis, kadangi atsiranda daugiau laisvų galų, prie kurių gali jungtis monomerai. Be to, mažesni agregatai pasižymi didesniu citotoksiškumu, nors jų konformacijos, lyginant su ilgesnėmis fibrilėmis, išlieka nepakitusios (Wei-Feng *et al*, 2009). Manoma, jog esant trumpesniems amiloidiniams dariniams padidėja jų sąveika su ląstelės membranomis bei sumažėja sąveika tarp pačių agregatų, neuronų plazminė membrana tampa labiau pralaidi užląstelinėje erdvėje susiformavusioms trumpoms neurofibrilinėms struktūroms. Dėl to membraninės struktūros yra labiau pažeidžiamos ir ląstelėje išauga agregatų skaičius. Fibrilių fragmentacija įvyksta dėl mechaninio streso, šiluminio dalelių judėjimo ar kai kurių šaperonų veiklos (Wei-Feng *et al*, 2010). Antrinė nukleacija vyksta, kuomet agregacijos branduoliai susiformuoja ant jau tirpale esančių agregatų paviršiaus. Šis procesas paspartina agregatų susidarymą bei gali būti vienas iš dominuojančių mechanizmų agregatų kiekio padauginime amiloidinių patologijų metu (Alijanvand *et al*, 2021).

Branduolių formavimasis yra agregaciją limituojanti stadija, todėl norint sutrumpinti lag fazę, kurios metu vyksta šis procesas, į tirpalą pridedamas nedidelis kiekis jau susiformavusių agregatų, vadinamų „sėkla“. Dažnu atveju naudojama homologinė „sėkla“, sudaryta iš to paties agregacijoje dalyvaujančio baltymo molekulių, tačiau agregaciją inicijuoti gali ir iš kito baltymo agregatų suformuota „sėkla“, nors tokia heterologinė sąveika būdinga ne visoms amiloidogeninių baltymų poroms (1.7 pav.) (Subedi *et al*, 2022). Be to, skirtingų baltymų molekulių tarpusavio sąveika stebima ir koagregacijos metu, kuomet vienu metu dviejų baltymų monomerai agreguoja jungdamiesi prie tos pačios fibrilės galų arba sudaro atskirus agregatus, kurie sukimba tam tikromis paviršiaus vietomis (Bondarev *et al*, 2018). Iš skirtingų baltymų molekulių sudarytos amiloidinių agregatų sankaupos aptinkamos ir neurodegeneratyvinių ligų metu (Subedi *et al*, 2022). Tokiu būdu amiloidinės struktūros gali greičiau išplisti į aplinkines ląsteles, o prioninių ligų atveju net ir infekuoti kitus audinius ar organus (Fernandez-Borges *et al*, 2013).



1.7 pav. Homologinės ir heterologinės baltymų agregacijos schemas (pagal Bondarev *et al*, 2018).



### 1.4.3. Aplinkos veiksnių įtaka agregacijai

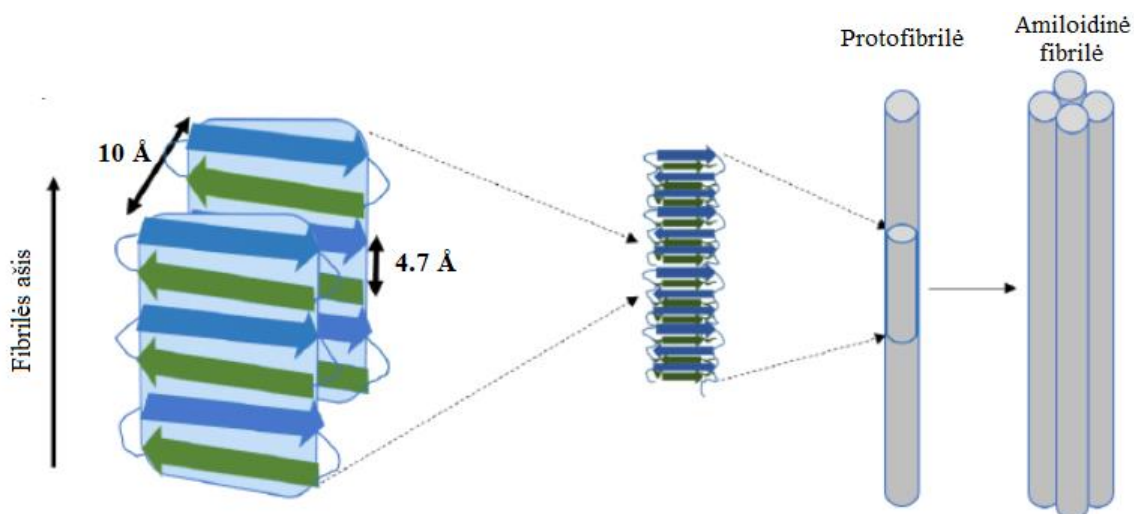
Amiloidinę baltymų agregaciją sukelia oksidacinis stresas bei mutacijos amiloidogeninius baltymus koduojančiuose genuose, tačiau veiksnių, galinčių palengvinti agregatų susidarymą yra daugiau. Baltymai lengviau agreguoja esant didelei jų koncentracijai. Esant didesniai molekulių tankumui tirpale padidėja jų tarpusavio susidūrimų skaičius ir tikimybė sukibti į agregatus. Be to, padidėjus baltymo koncentracijai, ne tik pagreitėja agregacijos procesas, bet ir padaugėja susidarančių agregatų kiekis. Baltymai suformuoja netirpius fibrilinius darinius tik pasiekus tam tikrą blogai susilanksčiusio baltymo koncentraciją. Tik viršijus šią koncentraciją agregacijos Gibso energijos pokytis tampa neigiamas, o pats procesas – energetiškai palankus vykti.

Agregatų susidarymui palanki aukšta temperatūra. Tuomet baltymas denatūruoja ir hidrofobinės aminorūgštys yra daugiau eksponuojamos į išorę. Šios aminorūgštys sąveikaudamos tarpusavyje stumia tirpale esančias vandens molekules. Sąveikai tarp baltymų molekulių agregacijos metu įtakos turi ir pH. Baltymai yra amfoterinės medžiagos, kurios turi skirtingai įkrautas aminorūgštis. Kuomet tirpalo pH yra lygus baltymo pI, monomerų krūvių suma tampa lygi 0 ir molekulės gali lengviau sąveikauti tarpusavyje dėl sumažėjusios jų tarpusavio elektrostatinės stūmos jėgos. Druskos taip pat turi įtakos baltymų agregacijai. Esant didelėms druskų koncentracijoms sumažėja baltymų solvatacija, kadangi didelė dalis vandens panaudojama druskų tirpinimui (Zaman *et al*, 2014).

### 1.4.4. Agregatų struktūra

Amiloidinės fibrilės yra 7-13 nm pločio bei kelių mikrometrų ilgio dariniai, kurių pagrindinis bruožas –  $\beta$ -klostyta struktūra (1.8 pav.). Agregacijos metu prisijungus baltymų monomerams susidarančios  $\beta$ -klostės išsidėsto išilgai fibrilės ašies ir sudaro tarpmolekulinius vandenilinius ryšius tarp aminorūgščių šoninių grupių, kurios viena nuo kitos nutolusios 4,7 Å. Fibrilės tvirtumą palaiko statmenai fibrilės ašies esančios įvairios sąveikos (vandeniliniai, elektrostatiniai ryšiai, hidrofobinė, Van der Valso sąveika,) tarp 10 Å atstumu nutolusių peptidinių grandinių (Shanmugam *et al*, 2019). Susidarančios struktūros yra standžios, tvirtos, atsparios temperatūrai, denatūrantams bei proteinazėms (Giorgetti *et al*, 2018). Amiloidiniai agregatai tarpusavyje gali skirtis protofilamentų skaičiumi, išsidėstymu erdvėje, antrinių struktūrų kiekiu bei konformacija, šie skirtumai gali pasireikšti net tarp to paties baltymo formuojamų fibrilių, o toks reiškinys vadinamas amiloidų polimorfizmu. Skirtingų agregatų susidarymas įprastai priklauso nuo baltymo koncentracijos, temperatūros, purtymo arba tirpalo sudėties, tačiau kai kurių amiloidogeninių baltymų atveju amiloidų polimorfizmas stebimas ir tomis pačiomis sąlygomis susidarančiose fibrilėse. Polimorfai

gali pasižymėti skirtingu augimo greičiu, stabilumu ar toksiškumu ląstelėms ir gali nulemti skirtingą įvairių ligų pobūdį bei progresavimo greitį (Chatani *et al*, 2021).



1.8 pav.  $\beta$ -klostyta struktūra amiloidinėse fibrilėse.

## 1.5. Agregacijos slopikliai

Amiloidinėms ligoms gydyti pasitelkiamos įvairios strategijos, kuriomis siekiama kaip įmanoma labiau sumažinti amiloidinių agregatų susidarymą. Kuriant naujus vaistinius preparatus bandoma atrasti mažos molekulinės masės junginius, kurie galėtų stabilizuoti natyvią baltymo struktūrą, sąveikautų su oligomerais ir nukreiptų juos neamiloidinių agregatų susidarymo keliais, blokuotų monomerų prisijungimą prie fibrilių galų ar vykdytų susidariusių agregatų destrukciją (Härd ir Lendel, 2012). Taip pat ieškoma junginių, kurie veiktų baltymus, kurie dalyvauja agreguojantį baltymą koduojančio geno raiškos valdyme, baltymo sintezėje arba palengvina signalo perdavimą nervinėje sistemoje.

Iš tiriamų mažos molekulinės masės junginių nemažą potencialą turi polifenoliai, kurie natūraliai aptinkami gamtoje kaip įvairių augalų antriniai metabolitai. Šiai medžiagų grupei priklauso flavanoidai, kurkuminoidai, taninai, katechinai ir kiti junginiai, kuriuos sudaro du ar daugiau hidroksilintų aromatinių žiedų. Manoma, jog šie aromatiniai žiedai sąveikauja su baltymų aromatinėmis aminorūgščių šoninėmis grupėmis, taip trukdydami fibrilių susidarymui. Be to, dauguma polifenolių veikia kaip antioksidantai, mažinantys laisvųjų deguonies radikalų kiekį ir jų daromą žalą ląstelėms. Nemažai daliai polifenolių būdingas auto-oksидacijos procesas, dėl kurio sumažėja šių medžiagų biologinis prieinamumas (Giorgetti *et al*, 2018). Tačiau kai kurie auto-oksидacijos produktai pasižymi netgi stipresniu amiloidinę agregaciją slopinančiu poveikiu negu pirminis junginys. Pavyzdžiui, tarp polifenolių literatūroje plačiai aprašyto žaliojoje arbatoje randamo (-)epigalokatechino galato (EGCG) oksidacijos produktai chinonas ir chinonoidas kovalentiškai jungiasi prie amiloidogeninių baltymų ir dar stipriau nei EGCG slopina jų agregaciją *in vitro* (Fernandez *et al*, 2021).

Kitos medžiagos, naudojamos antiamiloidinių vaistų kūrimui, yra smulkūs peptidai, kurių seka atitinka dalį amiloidogeninio baltymo sekos ir tose vietose užkloja baltymą bei slopina jo kitas tarpmolekulinės sąveikas (Jha *et al*, 2018). Taip pat siekiama sukurti įvairių antibiotikų, nanodalelių bei antikūnų panaudojimu paremtus amiloidinių ligų terapijos būdus (Piccoli *et al*, 2017; Debnath *et al*, 2017; Sevigny *et al*, 2016).

Nepaisant begalės laboratorinių tyrimų bei įdedamų pastangų siekiant sukurti vaistus nuo neurodegeneratyvinių sutrikimų, tik labai maža dalis junginių sėkmingai pereina visas klinikinių tyrimų fazes ir yra patvirtinami komerciniam naudojimui. Dėl vis dar ne iki galo suprantamo ligų patogeniškumo bei susidarančių agregatų sudėtingumo dažnu atveju vaistai nukreipiami į klaidingus taikinius, kurie neduoda norimo rezultato arba yra pasirenkama per mažai taikinių. Tačiau kol kas net ir visus tyrimus sėkmingai praėję preparatai nesugeba pilnai išgydyti neurodegeneratyvinių ligų.

## 1.6. SOD1 agregacijos slopikliai

Tyrimų, kuriais bandoma ieškoti SOD1 agregaciją slopinančių medžiagų, atlikta nemažai. Dažnu atveju vaistų ieškoma tarp tų junginių klasių ir rinkoje jau patvirtintų preparatų, kurie buvo sėkmingi kitų baltymų amiloidinės agregacijos slopinimo tyrimų metu. Eksperimentai atlikti su įvairiais SOD1 mutantais, o pasirinkti junginiai orientuojami į skirtingus taikinius. Dauguma tyrėjų ieško medžiagų, galinčių stabilizuoti baltymo dimerą, kadangi šioje būsenoje esanti SOD1 yra natyvioje formoje, o jos destabilizavimas suskylant į monomerus yra glaudžiai susijęs su didesne baltymo agregacijos tikimybe (Auclair *et al*, 2010). Kiti tyrėjai pasirenka junginius, galinčius jungtis prie baltymo monomerų ir neleisti jiems sukibti tarpusavyje (Bhatia *et al*, 2015).

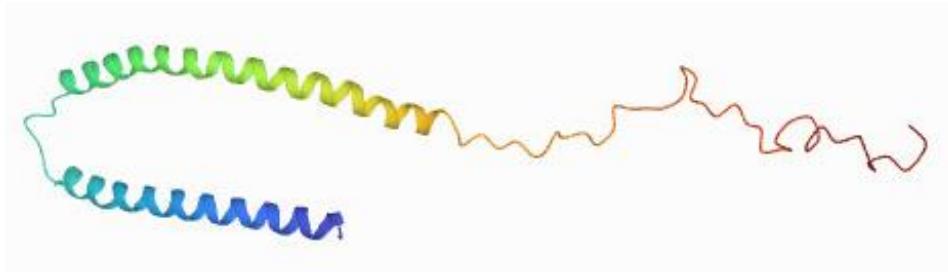
Vaistų paieškai pasirenkami skirtingi tyrimo metodai – kompiuterinis modeliavimas, SOD1 agregacijos kinetikos tyrimai *in vitro*, eksperimentai su ląstelių kultūromis ar įvairios struktūros analizės. Tačiau kol kas tarp patvirtintų vaistų nuo ALS, paminėtų 1.3.1. skyrelyje, preparatų, slopinančių SOD1 agregaciją, nėra. Literatūroje aprašomi slopiklių tyrimai paremti tik keliais metodais, tad išvados apie tų medžiagų veiksmingumą ne visada būna pilnai pagrįstos. Taikomų tyrimų siaurumas, skirtingų baltymo variantų naudojimas bei kol kas prastas supratimas apie agregacijos metu vykstančius baltymų molekulinis pokyčius ir skirtingus agregatų vaidmenis ligos patologijos metu neleidžia sukurti pilnai ALS išgydantį preparatą (Mehta *et al*, 2017).

## 1.7. Alfa-sinukleinas

Alfa-sinukleinas (ASyn) – nestruktūrizuotas 14,46 kDA baltymas, kurio gausu nervų sistemos ląstelėse (1.9 pav). Nors kol kas ASyn funkcija nėra iki galo žinoma, manoma, jog šis baltymas dalyvauja nervinio signalo perdavime, kadangi ASyn kiekiai aksonų galuose žymiai didesni nei kitose

neurono vietose. Mokslininkams kilo klausimų, kas nulemia ASyn specifiškumą lokalizuotis tik prie tam tikros ląstelės membranos vietos. Kadangi šis baltymas neturi transmembraninių domenų ir lipidinių inkarų, tikėtina, jog sąveikai su aksonų galų membranomis turi įtakos N-gale esantys septyni 11-kos nukleotidų pasikartojimai. Šiuose pasikartojimuose esanti polinė treonino šoninė grupė sutrikdo hidrofobinę sąveiką su lipidais tiek, jog ASyn specifiškai jungiasi tik prie dideliu kreivumu pasižyminčių membranų (Bendor *et al*, 2013). Pakeitus treonino molekulės nepolinėmis aminorūgštimis, ASyn prarado specifiškumą šioms neuronų membranoms bei mažoms transportinėms pūslelėms (Pranke *et al*, 2011). Pastebėta, kad sumažinus funkcionalaus ASyn kiekį aksonuose, sinaptiniame plyšyje sumažėjo dopamino koncentracija ir sutriko nervinio signalo perdavimas, kadangi esant per mažam šio neuromediatoriaus kiekiui nebuvo aktyvuoti postsinaptiniai receptoriai ir visos dopamino molekulės sugrįžo į pradinį aksoną (Nemani *et al*, 2010).

Įvairių tyrimų metu nustatyta, jog ASyn sąveikauja ir su įvairius ląstelės procesus reguliuojančiais baltymais, tad galimų šio baltymo funkcijų ląstelėje gali būti ir daugiau. Literatūroje aprašytas ASyn apoptozės slopinimo, šaperoninis, gliukozės kiekio reguliacinis, antioksidacinis bei kalmodulino valdymo aktyvumas (Emamzadeh, 2016). Tačiau ASyn plačiai žinomas kaip patologinis Parkinsono ligą sukkeliantis baltymas. Šios ligos metu agreguojančios ASyn molekulės suformuoja mažus apvalios formos klasterius, vadinamus Lewy kūneliais. Šie kūneliai, kurių sudėtyje be ASyn yra ir keli kiti baltymai, citozolyje plečiasi didėjant agregatų kiekiui, o iš išorės gali būti apjuosti papildomais neurofibrilinais tinklais, sudarytais iš agreguojančio fosforilinto tau baltymo (Kim *et al*, 2014). Lewy kūneliais užkimšti neuronai praranda savo funkcionalumą, o Parkinsono liga sergantiems asmenims sutrinka koordinacija, gebėjimas judėti, atsiranda raumenų traukuliai, dažnu atveju pasireiškia demensija. Nustatyta, jog egzistuoja ryšys tarp ASyn ir kitų amiloidogeninių baltymų. Literatūroje aprašyta ASyn sąveika su prouždegiminiu baltymu S100A9, Alzheimerio ligą sukeliančiais amiloidu- $\beta$  ir tau baltymu. (Horvath *et al*, 2018; Köppen *et al*, 2020; Torres-Garcia *et al*, 2022).



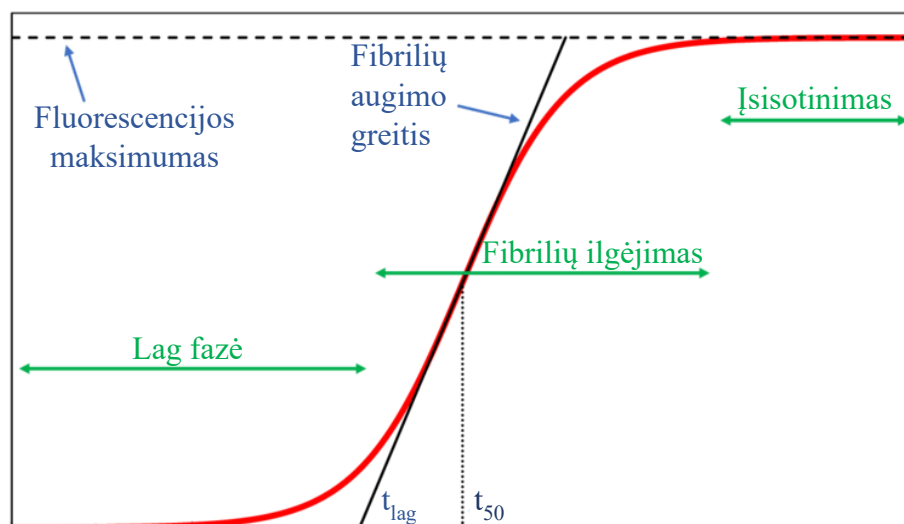
1.9 pav. ASyn erdvinė struktūra (PDB: 1XQ8)

## 1.8. Agregacijos tyrimai *in vitro*

Norint ištirti įvairių veiksnių poveikį amiloidų susidarymui, geriau suprasti galimus mechanizmus ar nustatyti susidariusių agregatų struktūras pirmiausiai atliekami *in vitro* tyrimai.

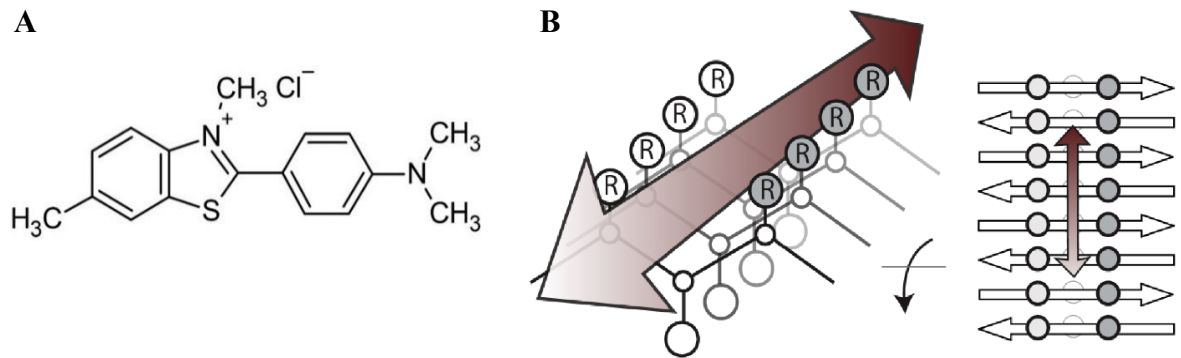
Kadangi baltymų agregacija, vykstanti amiloidinių ligų metu, savaime yra lėtas procesas, šių tyrimų metu aplinkos sąlygos pakeičiamos taip, jog procesas vyktų per optimalų laiką.

Amiloidų tyrimams svarbi agregacijos kinetikos analizė. Jos metu stebimas naudojamų dažų, prisijungiančių prie susidarančių agregatų paviršiaus, fluorescencijos emisijos intensyvumo pokytis laike. Šis pokytis leidžia stebėti visus pagrindinius agregacijos etapus bei įvertinti jų trukmę. Iš gautų kreivių skaičiuojami pagrindiniai agregacijos kinetikos parametrai – agregacijos puslaikis, parodantis per kiek laiko suagregavo pusė viso baltymo, lag fazės, kurios metu vyksta agregacijos branduolių formavimasis, trukmė, fibrilių ilgėjimo greitis, parodantis monomerų jungimosi tarpusavyje efektyvumą, bei įsisotinimo metu pasiekiamą fluorescencijos emisijos intensyvumą, kurio vertės nustato galimai nevienodus agregatų tipus pagal skirtingą jų gebėjimą prisijungti fluorescencinį dažą (1.10 pav.).



1.10 pav. Agregacijos kinetikos kreivė ir kinetiniai parametrai.  $t_{lag}$  – lag fazės trukmė,  $t_{50}$  – agregacijos puslaikis.

Kineticos tyrimuose dažniausiai naudojamas fluorescencinis dažas tioflavinas T (ThT)(1.11 pav. A). Tirpale esant nesurištomis ThT molekulėms nustatomas mažas fluorescencijos emisijos intensyvumo signalas, kadangi dėl mažo energetinio barjero tarp skirtingų ThT konformacijų vykstanti rotacija aplink C-C ryšį tarp benzilamino ir benzatiolo grupių, numalšina fotonų sukeliama ThT sužadimą. Dažui prisijungus prie agregatų molekulė imobilizuojama jų paviršiuje, rotacijai sustojus išsaugoma sužadinta būseną ir stebimas fluorescencijos emisijos intensyvumo padidėjimas (Biancalana ir Koide, 2010).



1.11 pav. ThT molekulinė formulė (1) ir išsidėstymas prisijungimo prie amiloidinių agregatų metu (2) (pagal Biancalana ir Koide, 2010).

ThT sužadinas 440 nm ilgio šviesa, o fluorescencijos emisijos maksimumas stebimas ties 480 nm. Nors dažo molekulės gali jungtis prie įvairiomis aminorūgščių sekomis pasižyminčių darinių, jos jungiasi tik prie agregatų, o ne prie ištirpusių baltymų, tad manoma, jog šį specifiškumą nulemia palankus amiloidų sudėtyje esančių  $\beta$ -klosčių sudaromas paviršius (1.11 pav. B) (Biancalana *et al.*, 2008).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos ir laboratorinė įranga

#### 2.1.1. Laboratorinė įranga

- 0,22 µm porų skersmens, 47 mm diametro filtrai „Sartorius Stedim Biotech“ (Fisher Scientific);
- 49,5 mm skersmens dializės žarna „Zella Trans Roth“ (pralaidumas 6-8 kDa);
- 96 šulinėlių mikroplokštelė „Corning“;
- Atominės jėgos mikroskopas „Bruker Dimension FastScan“;
- Autoklavas „AHS-75N“ (Raypa);
- Centrifuga „HiCen SR“, rotorai AF 6.500 ir AS 4.500 (HeroLab);
- Chromatografinė sistema „ÄKTAexplorer“ (GE Healthcare);
- Chromatografinė kolonėlė „XK26/20“ (GE Healthcare);
- Dializės žarna: 49,5 mm skersmens „Zella Trans Roth“ (pralaidumas 6-8 kDa);
- Elektroforezės aparatas „Biometra Mingel-Twin“ su „Biometra PS 300 T” srovės šaltiniu;
- Filtrai: 0,22 µm porų skersmens, 47 mm diametro „Sartorius Stedim Biotech“ (Fisher Scientific);
- Filtravimo sistema „Sigma Aldrich“;
- FTIR spektrometras „Bruker Invenio S“;
- Magnetinės maišyklės: „Scientifica ARE“ (Velp), „Maxi Direct“ (VARIOMAG);
- 96 šulinėlių mikroplokštelės „Corning“;
- Mikroplokštelių sandarinimo juosta „Nunc“;
- Mikroplokštelių skaitytuvas „BMG Labtech Clariostar Plus“;
- pH-metras „Orion DUAL STAR meter“ (Thermo Scientific);
- Purtyklė „KS 4000i“ (IKA);
- Spektrofotometras „UV-1800“ (Shimadzu Scientific Instruments);
- Svarstyklės „PCB 1000-2 (Kern)“, „TP-214“ (Denver Instruments);
- Termostatas „IB-15G“ (Fisher Scientific);
- Termostatinė purtyklė „DITABIS MHR 23“ (Fisher Scientific);
- Ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls 3100“, antgaliai – VS70/T, MS72.

### 2.1.2. Medžiagos

- AB Vilniaus degtinė: 96 % etanolis;
- Acros Organics: 99 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 99,6 % NH<sub>4</sub>Cl, 99 % glicerolis, 98,5 % NaOH, 98 % GuHCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 37 % HCl tirpalas, 50 % NaOH tirpalas, 99,5 % APS, NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O;
- Carl Roth: 99 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, kazeino hidrolizatas, TRIS, 99 % ampicilino natrio druska, Luria Broth mitybinė terpė, 99 % CH<sub>3</sub>COOH;
- Fisher Scientific: 99,5 % MgSO<sub>4</sub>, laktozė, imidazolas, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dekstrozė, TEMED, NDS, triptonas, akrilamido/bis-akrilamido 30 % tirpalas, 99% EDTA, agarozė, DMSO, DTT, molekulinės masės žymuo „EZ-RUN prestained Rec protein ladder“, elektroforezės gelių dažas „Ez-Run Protein Gel Staining Solution“;
- GE Healthcare: sorbentai „Ni Sepharose™ 6 Fast Flow“; „DEAE Sepharose™ Fast Flow“; „Superdex™ 75 prep grade“.
- Oxoid: mielių ekstraktas;
- Sigma-Aldrich: ThT, 98 % CuSO<sub>4</sub>, 98 % ZnSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O.

### 2.1.3. Mitybinės terpės

- Autoinduktyvi terpė:

2.1 lentelė. Autoinduktyvios ZYM-5052 terpės sudėtis norint paruošti 2,4 L terpės.

Kazeino hidrolizatas	24 g
Mielių ekstraktas	12 g
25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,52 g
25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,16 g
50 mM NH <sub>4</sub> Cl	6,42 g
5 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,68 g
2 mM MgSO <sub>4</sub>	1,17 g
0,5 % glicerolis	12 g
0,05 % gliukozė	1,2 g
0,2 % laktozė	4,8 g
50 mM CuSO <sub>4</sub> tirpalas	14,4 mL
50 mM ZnSO <sub>4</sub> tirpalas	14,4 mL

- LB terpė: dejonizuotame vandenyje ištirpinama 25 g LB-Medium terpės mišinio;



- S.O.C. terpės: 100 mL terpės – 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 0,05 g NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, 0,1 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 ml MgSO<sub>4</sub>, 20mM gliukozės.

Mitybinės terpės 20 min autoklavuojamos iki 121 °C įkaitintame termostate, slėgis 1 atm.

#### 2.1.4. Ląstelės

Baltymo sintezei naudotas *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) kamienas (Invitrogen).

#### 2.1.5. Konstruktas

Transformacijai naudota pET303/CT-his plazmidė su žmogaus *SOD1* genu ir pET303/CT su alfa-sinukleino genu (Invitrogen).

#### 2.1.6. Tirpalai

- Buferinis tirpalas A1: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7,5;
- Buferinis tirpalas B1: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0,5 M Imidazolas, pH 7,5;
- Buferinis tirpalas A2: 20 mM TRIS-HCl, 0,5 mM DTT, pH 8;
- Buferinis tirpalas B2: 20 mM TRIS-HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, pH 8;
- Buferinis tirpalas C: 100 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 3,8;
- Buferinis tirpalas D: 100 mM CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 3,8;
- Buferinis tirpalas E: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4;
- Buferinis tirpalas F: 20 mM TRIS-HCl, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8;
- Buferinis tirpalas G: 20 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, pH 8;
- Baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 3 g TRIS, 14,4 g glicino, 1 g NDS tirpinami 100 mL dejonizuoto vandens.
- Buferinis tirpalas H: 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

Tirpalų pH iki reikiamos vertės pridedami HCl arba NaOH tirpalais. Pagaminti tirpalai filtruojami pro 0,45 μm porų dydžio filtrus.

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Plazmidinės DNR transformacija

Į 100 μL kompetentinių ląstelių pridedama 2 μL plazmidinės DNR. Ląstelės inkubuojamos lede 30 min. Vėliau ląstelės 90 s laikomos iki 42 °C įkaitintame termostate, tada vėl inkubuojamos lede 2 min. Įpilama 400 μL S.O.C. terpės, 45 min inkubuojama 37 °C purtyklėje 220 aps./min greičiu. Po inkubacijos centrifuguojama (2 min, 20 °C, 6000 aps./min), 150 μL supernatanto nupilama, ląstelės suspenduojamos likusiame supernatanto kiekyje, išsėjamos lėkštelėje ant 100 μg/mL ampicilino turinčios LB terpės. Lėkštelės 16 val. laikomos 37 °C termostate.

### 2.2.2. Baltymo sintezė

Tikslinio baltymo sintezė vykdoma naudojant naktinę kultūrą. Į 30 mL autoklavuotos LB terpės pridedama 30  $\mu$ L ampicilino ir užsėjama viena kolonija, užaugusi po transformacijos. Kultūra auginama purtyklėje (37 °C, 220 aps./min) iki kol matuojama terpės šviesos sugertis ties 600 nm pasiekia 0,6. Tuomet 500  $\mu$ L naktinės kultūros persėjama į kolbas su 400 mL autoinduktyvios mitybinės terpės su ampicilinu ir 16 val. auginama purtyklėje (37 °C, 220 aps./min). Po inkubacijos terpės centrifuguojamos (20 min. 6000 aps./min), supernatantas nupilamas, biomasė surenkama ir užšaldoma –80 °C temperatūroje.

### 2.2.3. Superoksido dismutazės-1 gryninimas

Ląstelių biomasė mechaniškai homogenizuojama buferiniame tirpale A1. Homogenizatas laikomas lede ir 15 min ultragarsu ardomas 30 s impulsais kas 30 s. Ultragaršinimui naudojamas antgalis VS70/T, nustatoma 70% antgalio amplitudė. Tuomet biomasė 20 min centrifuguojama 4 °C 18000 aps./min. Gautas supernatantas sumaišomas su nulygsvarintu IMAC sorbentu. Sorbentas pakraunamas į koloną, kuri prijungiama prie „ÄKTAexplorer“ chromatografinės sistemos.

Toliau atliekama afininė chromatografija. Leidžiamas buferinis tirpalas A1 3 ml/min greičiu, kol išplaunami baltymai, nesąveikaujantys su sorbentu. Vėliau leidžiama 10 % buferinio tirpalo B1 koncentracija, kol išplaunami silpnas sąveikas su sorbentu sudarantys baltymai. Buferinio tirpalo B1 koncentracija padidinama iki 40 %, renkamos tikslinio baltymo frakcijos.

Surinktos frakcijos supilamos į 49,5 mm skersmens dializės žarną „Zella Trans Roth“ ir 12 val. dializuojamos buferiniame tirpale C, po to 2 val. buferiniame tirpale D. Vėliau dializė po 3 val. vykdoma dviejuose buferiniuose tirpaluose E. Po dializės baltymo tirpalas filtruojamas pro 0,22  $\mu$ m skersmens filtrą. Spektrofotometru matuojama baltymo tirpalo šviesos sugertis ( $\epsilon_{280} = 5750 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ), o koncentracija nustatoma pagal Bero-Lamberto dėsnį.

### 2.2.4. Alfa-sinukleino gryninimas

Ląstelių biomasė mechaniškai homogenizuojama buferiniame tirpale X. Homogenizatas 15 min ardomas ultragarsu. Tuomet biomasė 20 min. centrifuguojama (4 °C 18000 aps./min.), gautas supernatantas 15 min. kaitinamas 80°C ir dar kartą centrifuguojamas (4 °C 18000 aps./min.). Supernatantas nupilamas ir sumaišomas su nulygsvarintu DAEA sefarozės sorbentu. Sorbentas pakraunamas į koloną ir prijungiamas prie chromatografinės sistemos. Kolona praplauna 100 mL A2 buferiniu tirpalu, po to leidžiant laiptinį tirpalo B2 gradientą atplaunamas tikslinis baltymas. Surinktos frakcijos dializuojamos B3 buferiniame tirpale ir leidžiamas per gilfiltracinę kolonėlę, pakrautą SuperDex75 sorbentu. Baltymo koncentracija matuojama kaip aprašyta prieš tai ( $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

### 2.2.5. Baltymų elektroforezė

Pagal 2.2 lentelę pagaminamas skiriamasis gelis, kuris vėliau supilamas tarp elektroforezės plokštelių. Ant gelio viršaus užpilama distiliuoto vandens ir 45 min paliekama stingti. Sustingus skiriamajam geliui vanduo nupilamas, ruošiamas koncentruojamasis gelis, kuris supilamas tarp elektroforezės plokštelių ant skiriamojo gelio. Tarp plokštelių į koncentruojamąjį gelį įstatomos „šukos“, 30 min paliekama stingti. Geliui sustingus elektroforezės plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą, kuris iki atžymų užpildomas elektroforezės buferiniu tirpalu, išimamos „šukos“. Į susidariusius „šulinėlius“ pripilama po 10 µL paruoštų mėginių, į kraštinių „šulinėlių“ pripilama „Page Ruler Low Range Protein“ žymeklio. Elektroforezė atliekama esant 30 mA srovei ir 150 V įtampai. Pasibaigus elektroforezei, gelis 1 val. dažomas „Ez-Run Protein Gel Staining Solution“ dažais, vėliau blukinamas vandeniui.

2.2. lentelė. Elektroforezės gelių sudėtis

Gelio sudedamoji dalis	Medžiagos tūris skiriamajame gelyje (12 %)	Medžiagos tūris koncentruojamajame gelyje (4 %)
Distiliuotas vanduo	2,55 mL	1,27 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1,53 mL	–
1.5 M Tris-HCl pH 6.8	–	500 µL
40 % AA/BAA	1.83 mL	201 µL
10 % NDS	61 µL	20 µL
10 % APS	30,5 µL	10 µL
TEMED	3,65 µL	2 µL

### 2.2.6. Amiloidinių fibrilių gamyba ir agregacijos kinetikos tyrimai

SOD1 amiloidinėms fibrilėms gauti į buferinį tirpalą H pridedama 200 µM baltymo, 5 mM DTT, 0,5 M GuHCl iki galutinių koncentracijų. ASyn atveju į buferinį tirpalą H pridedama baltymo monomerų iki galutinės 200 µM koncentracijos.

Atliekant tyrimus su slopikliais į H tirpalą pridedama 200 µM baltymo, 5 mM DTT ir slopiklių, ištirpintų DMSO, iki galutinių 100 µM, 200 µM arba 400 µM koncentracijų. Paruošti mėginiai po 1 mL išpilstomi į mėgintuvėlius, kurie patalpinami į termostatinę purtyklę ir 24 val. purtomi 600 aps./min greičiu, esant 60 °C temperatūrai.

Atliekant agregacijos kinetikos tyrimus paruošiami mėginiai, kaip aprašyta prieš tai ir pridedama ThT iki galutinės 50 µM koncentracijos. Mėginiai po 100 µL išpilstomi į 96 šulinėlių

plokštėlę, kuri patalpinama į mikroplokštelių skaitytuvą, kur 24 val. purtomi 600 aps./min greičiu, esant 60 °C temperatūrai. ThT sužadinimas vyksta 440 nm ilgio bangomis, kas 5 min matuojamas fluorescencijos emisijos intensyvumas ties 480 nm ilgio bangomis.

Gauti agregacijos kinetikos duomenys normalizuojami pagal lygtį:

$$I' = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \quad (2)$$

kur  $I'$  – normalizuotas ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo dydis,  $I$  – ThT fluorescencijos emisijos intensyvumas tam tikru laiko momentu,  $I_{min}$  – minimalus ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo dydis,  $I_{max}$  – maksimalus ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo dydis.

Fibrilių ilgėjimo greitis skaičiuojamas gluodinant kinetikos kreives tiesės lygtimi:

$$y = ax + b \quad (3)$$

kur  $y$  – fluorescencijos emisijos intensyvumas laiko momentu  $x$ ,  $a$  – tiesės krypties koeficientas (fibrilių ilgėjimo greitis),  $b$  – taškas, kuriame tiesė kertą  $y$  ašį. Gluodinimas atliekamas  $x$  ašies ruože, kur  $y$  vertės yra lygios 0,4 – 0,6 maksimalios  $y$  vertės.

### 2.2.7. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija (FTIR)

Paruoštos baltymų fibrilės 10 min centrifuguojamos 11 000 aps./min greičiu. Supernatantas nupilamas, užpilama 200  $\mu$ L D<sub>2</sub>O ir centrifuguojama vėl. Plovimo sunkiu vandeniu žingsniai kartojami 3-4 kartus. Nupylus supernatanta po paskutinio plovimo užpilama 30  $\mu$ L D<sub>2</sub>O, mėginys papipetuojamas ir patalpinamas į celę tarp dviejų CaF<sub>2</sub> stiklų, atskirtų 0,05 mm storio teflonine tarpine. Nuskenuojamos 256 interferogramos, kurios vidurkinamos ir Furjė transformacija paverčiamos į sugerties spektrą. Duomenys apdorojami GRAMS/AI programa. Iš kiekvieno sugerties spektro atimami D<sub>2</sub>O ir vandens garų spektrai, duomenys normalizuojami srityje, esančioje tarp 1700  $\text{cm}^{-1}$  ir 1595  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.2.8. Atominės jėgos mikroskopija (AFM)

Ant žėručio paviršiaus užpilama 30  $\mu$ L APTES ir palaukiama 5 min. Žėrutis nuplaunamas 3 mL distiliuotu vandeniu ir nusausinamas pučiant sausą orą. Tuomet ant žėručio paviršiaus užnešama 30  $\mu$ L mėginio, palaukiama 5 min ir kartojama plovimo ir sausavimo procedūra.

Žėrutis su mėginiu patalpinamas į atominės jėgos mikroskopą. Skenavimo greitis – 0,8 Hz, plotas 5  $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ , skenavimo kokybė 1024  $\times$  1024 taškų. AFM nuotraukos apdorojamos Gwyddion programa.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

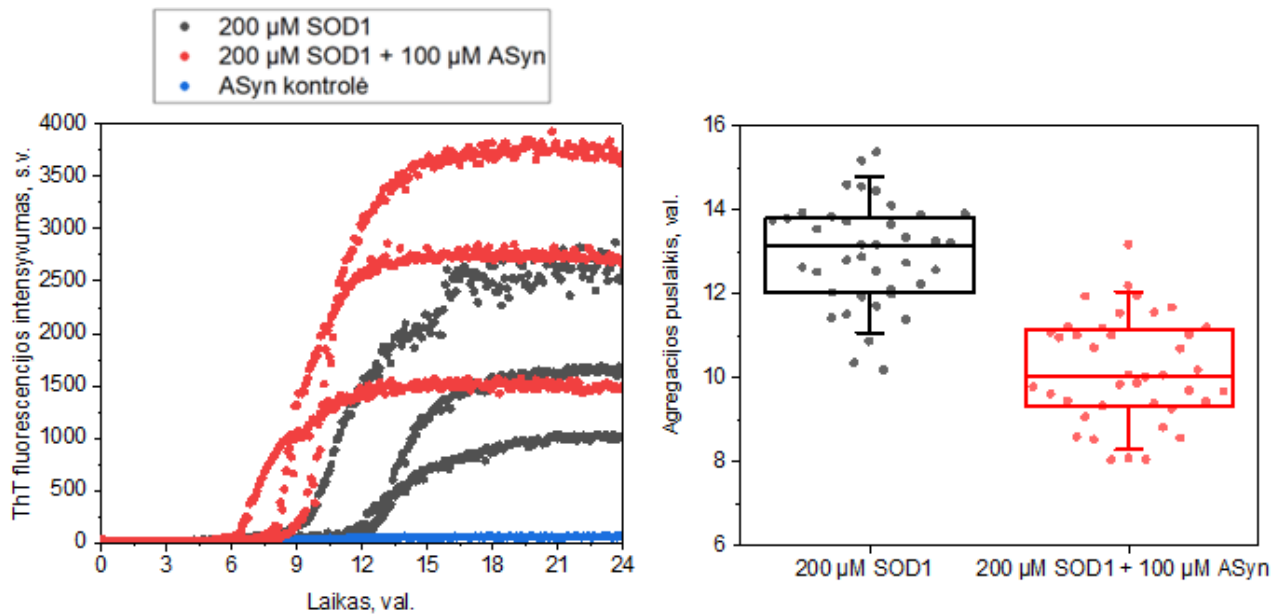
Tiriamasis darbas buvo padalintas į tris dalis. Pirmoje dalyje buvo siekima įvertinti, ar alfa-sinukleinas ir jo agregatai turi įtakos SOD1 agregacijai, kadangi yra straipsnių, aprašančių galimą šių baltymų tarpusavio sąveiką (Helferich *et al*, 2015). Antroje dalyje atlikta potencialių SOD1 agregacijos slopiklių paieška tarp sulfonamido funkcinę grupę turinčių junginių. Trečioje dalyje patikrinta, ar pasikeičia atrinktų SOD1 agregacijos slopiklių poveikis tirpale esant alfa-sinukleiniui.

#### 3.1. Alfa-sinukleino poveikis SOD1 amiloidinei agregacijai

Baltymų amiloidinei agregacijai poveikį gali turėti ne tik pavienių mažos molekulinės masės junginių, aplinkos temperatūra ar tirpalo pH. Svarbų vaidmenį atlieka ir baltyminiai agregatai, tarnaujantys kaip paviršius, prie kurio prisijungę kito baltymo monomerai sudaro fibrilinius darinius. Be to, agregacijos metu vieno baltymo molekulės gali aplipti kito baltymo agregatus ir susidaryti bendras baltymų klasteris. Dėl šių priežasčių gali pakisti amiloidinių ligų eiga bei progresavimo greitis. Vienas iš šio tyrimo objektų – Parkinsono ligos metu agregatus sudarantis baltymas alfa-sinukleinas. Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyta, jog ASyn molekulės agregacijos metu sąveikauja su amiloido  $\beta$  peptidu bei baltymais S100A9 ir tau (Horvath *et al*, 2018; Köppen *et al*, 2020; Torres-Garcia *et al*, 2022).

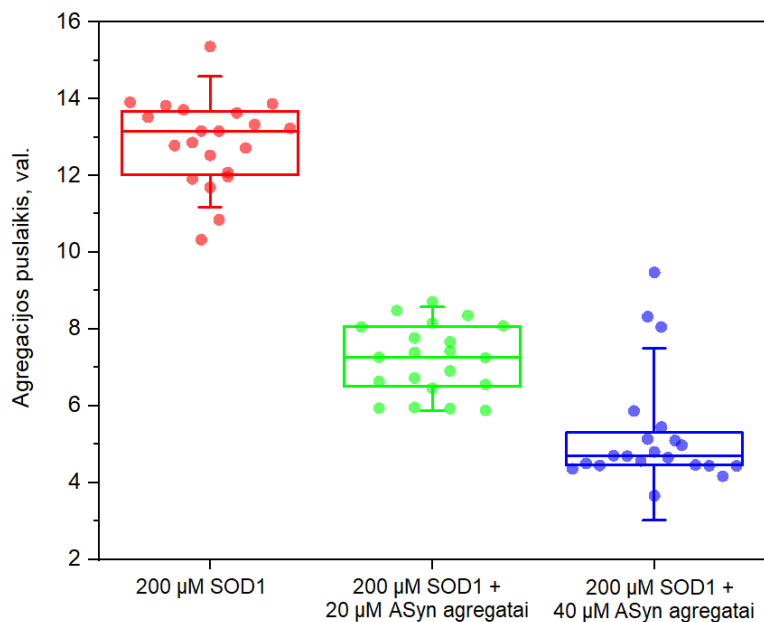
Remiantis ankstesnių darbų laboratorijoje patirtimi SOD1 agregacijos tyrimams nuspręsta naudoti 200  $\mu$ M baltymo koncentraciją į tirpalą pridėdant redukcinės medžiagos DTT ir denatūrantu GuHCl iki atitinkamai 5 mM ir 0,5 M galutinių koncentracijų (Musteikytė *et al*, 2020). DTT išardo disulfidinius tiltelius, sujungiančius SOD1 monomerus, o GuHCl palengvina baltymo agregaciją skatindamas monomerų išsilankstymą.

Tyrimo metu buvo tiriamas ASyn monomerų ir agregatų poveikis SOD1 amiloidinei agregacijai. Pirmiausia buvo atliktas agregacijos kinetikos tyrimas, kurio metu buvo matuojamas dažo ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo pokytis laike. Gautos SOD1 agregacijos kinetikos kreivės (3.1 pav. kairėje), iš jų paskaičiuoti agregacijos puslaikiai (3.1 pav. dešinėje). Rezultatai parodė, jog mėginių, į kuriuos buvo pridėta 100  $\mu$ M ASyn monomerų, agregacijos puslaikis vidutiniškai buvo daugiau nei 3 valandomis mažesnis, negu SOD1 kontrolės mėginiuose. Tuo tarpu mėginių, turinčių tik ASyn monomerus, agregacijos procesas neužfiksuotas, todėl matavimo metu SOD1 agregacijos kinetikai įtakos galėjo turėti tik ASyn monomerai.



3.1 pav. SOD1 agregacijos su ASyn kinetikos kreivės (kairėje) ir puslaikiai (dešinėje).

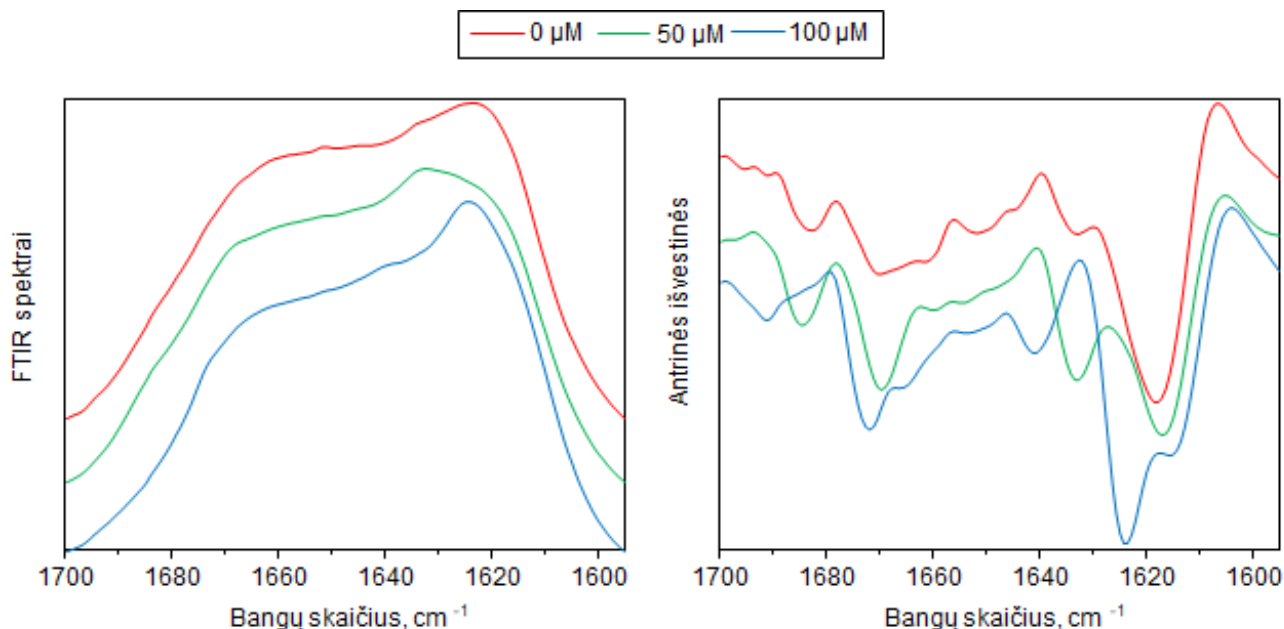
SOD1 agregaciją greitinantis poveikis dar labiau padidėjo į tirpalą vietoj ASyn monomerų pridėjus šio baltymo agregatų. Agregacijos puslaikis naudojant 20 μM ASyn fibrilių koncentraciją vidutiniškai nuo 13 val. sumažėjo iki 7 val., naudojant 40 μM ASyn fibrilių koncentraciją – iki 5 val. (3.2 pav.).



3.2 pav. SOD1 agregacijos su ASyn fibrilėmis puslaikiai.

Siekiant patikrinti, ar pakinta SOD1 agregatų struktūra į tirpalą pridėjus ASyn, pamatuojami mėginių FTIR spektrai, iš kurių paskaičiuojamos antrinės išvestinės (3.3 pav.). Gauti duomenys parodė, jog SOD1 mėginių su ASyn FTIR spektrai pasižymėjo skirtingais sugerties pikais β-klosčių

vandeniliniams ryšiams būdingame ruože ( $1640\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ ) lyginant su kontrolinio mėginio spektru. Į tirpalą pridėjus  $50\ \mu\text{M}$  ASyn šis sugerties pikas pasislinko keliais atvirkštiniais centimetrais, tuo tarpu esant  $100\ \mu\text{M}$  ASyn koncentracijai antrinė šio mėginio išvestinė pasižymėjo dviem minimumais šiame ruože.

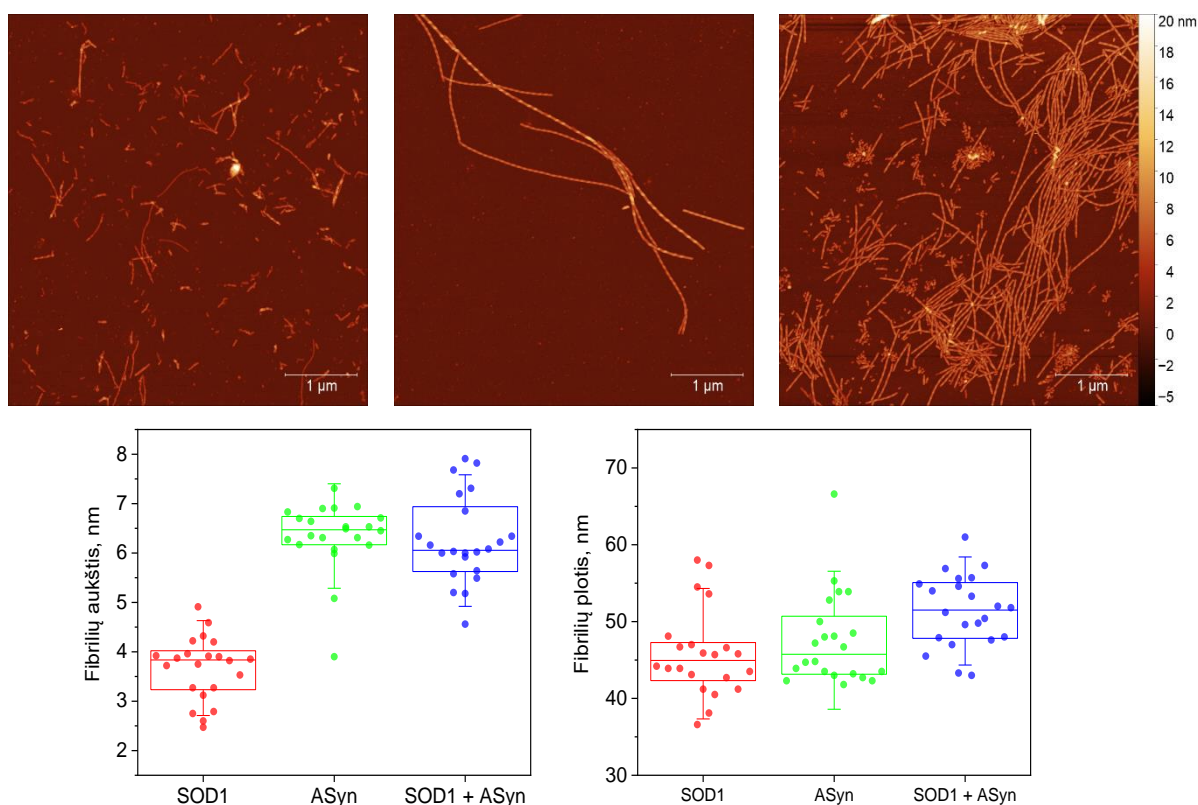


3.3 pav. SOD1 agregatų FTIR spektrai (kairėje) ir antrinės išvestinės (dešinyje) tirpale esant skirtingoms ASyn koncentracijoms.

Remiantis agregatų antrinių struktūrų analizės duomenimis kilo abejonė, ar mėginiuose nesusidarė ASyn fibrilių, kurios galėjo turėti įtakos FTIR spektrų ir jų antrinių išvestinių pokyčiams. Nors prieš tai atlikto agregacijos kinetikos tyrimo metu ASyn fibrilių susidarymas per matavimo laiką nenustatytas, tuo metu mėginiai buvo inkubuojami mikroplokštelių šulinėliuose, prie kurių sienelių susidarantys netirpūs dariniai sunkiau prilimpa negu prie sugerties spektrų matavimui ruoštų mėginių naudotų mėgintuvėlių sienelių. ASyn agregatų formavimuisi paviršius daro nemažą įtaką, tad tokie jo skirtumai skirtingų eksperimentų metu galėjo turėti įtakos pakitusiems rezultatams. Norint įvertinti susidariusių struktūrų morfologiją, agregatai buvo vizualizuoti atominės jėgos mikroskopu.

Šio tyrimo metu atskirai buvo padarytos SOD1 agregatų AFM nuotraukos tirpale esant arba nesant ASyn bei vizualizuotos atskirai pagamintos ASyn fibrilės (3.4 pav.). Iš gautų duomenų paskaičiuoti fibrilių aukščiai bei pločiai. SOD1 kontrolės atveju susidarė trumpi fibriliniai dariniai, kurių aukštis vidutiniškai siekė apie  $3,8\text{ nm}$ , plotis –  $45\text{ nm}$ . Tuo tarpu apdorojus ASyn agregatų nuotrauką, nustatyta, jog susidarė ilgesnės vidutiniškai  $6,5\text{ nm}$  aukščio bei  $42\text{ nm}$  pločio fibrilės. Be to, nuotraukoje matomas ASyn fibrilių periodiškumas – fiksuojami paviršiaus iškilimai dėl filamentų arba gijų peridiško sukimosi vienam aplink kitą. Palyginus šiuos duomenis su nuotrauka, kuri gauta

užfiksavus agregatus, susidariusius abiejų baltymų molekules talpinančiame mėginyje, duomenimis, paaiškėjo, jog susiformavo ilgos, periodiškumu pasižyminčios fibrilės, kurios vizualiai panašios į ASyn AFM nuotraukoje užfiksuotus darinius. Šių darinių aukštis vidutiniškai taip pat artimesnis ASyn fibrilių aukščiui. Nuotraukoje matomi ir smulkūs trumpi agregatai, kurie gali būti sudaryti iš SOD1 baltymo molekulių. Šie dariniai aplipę kai kurias iš ASyn fibrilinių struktūrų, tad hipotezė, teigianti, kad ASyn agregatai tarnauja kaip paviršius SOD1 fibrilių susidarymui ir pagreitina agregacijos procesą, atmesti negalima.



3.4 pav. AFM nuotraukos: SOD1 (viršuje kairėje), ASyn (viršuje viduryje), SOD1 + ASyn (viršuje dešinėje); fibrilių aukščiai (apačioje kairėje) ir pločiai (apačioje dešinėje).

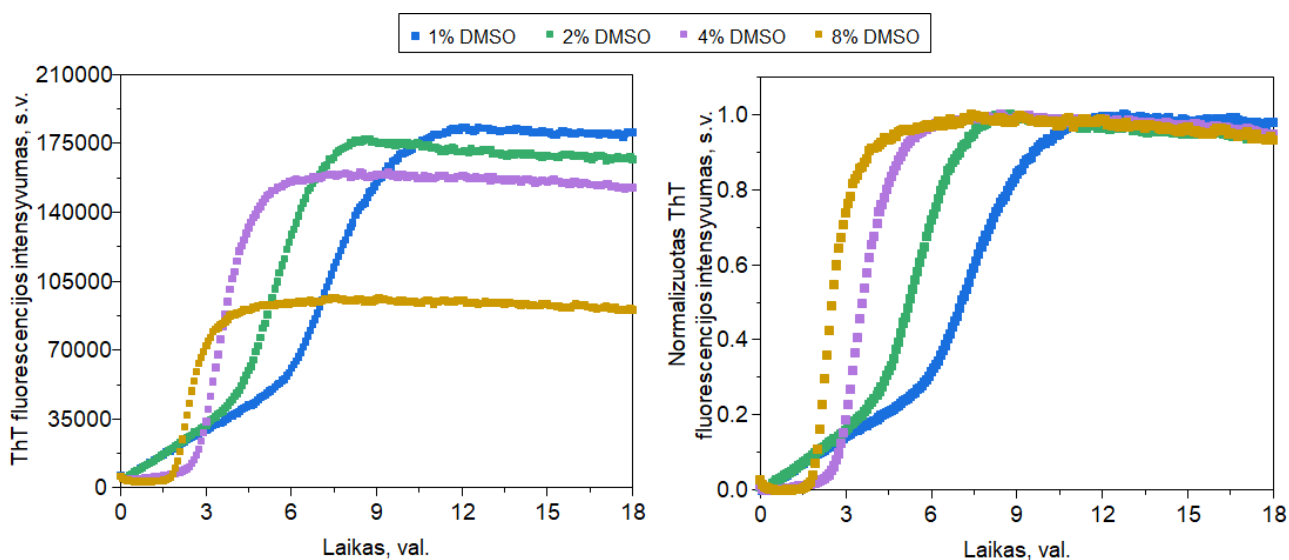
### 3.2. Sulfonamidų įtaka SOD1 amiloidinei agregacijai

Junginių, kurie galėtų slopinti baltymų amiloidinę agregaciją, ieškoma tarp įvairių organinių medžiagų – flavanoidų, katechinų, taninų ir kt. Potencialą veikti kaip agregacijos slopikliai turi ir sulfonamido grupę turintys junginiai, tarp kurių yra amiloido  $\beta$  agregatų susidarymą lėtinančių medžiagų.

Tiriamų junginių tirpinimui naudojamas DMSO ir kadangi šis tirpiklis gali veikti kaip denatūrantas, nuspręsta tolimesnių bandymų metu nenaudoti GuHCl. Prieš atliekant bandymus su sulfonamidais

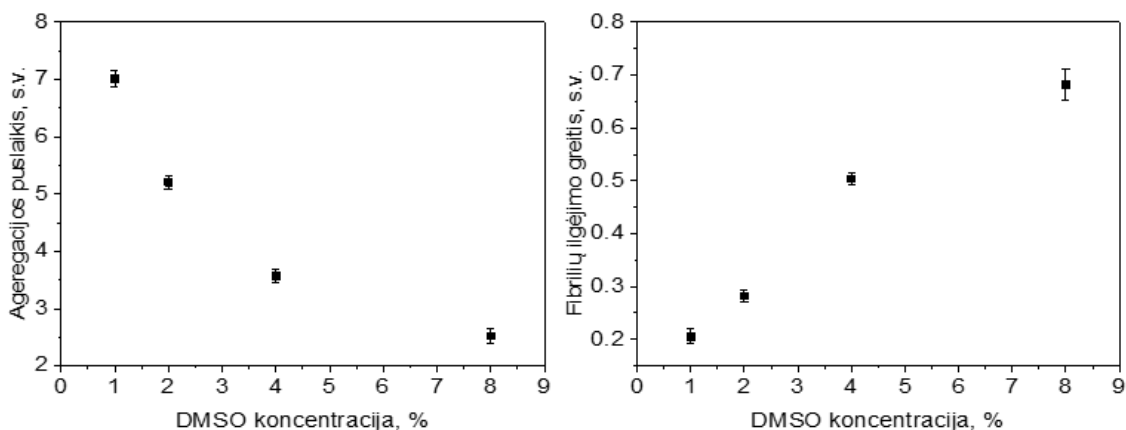


pirmiausia reikėjo patikrinti DMSO įtaką SOD1 agregacijai. Eksperimentui pasirinkti DMSO kiekiai, kurie bus įdėti į tirpalą kartu su sulfonamidais. Norint įvertinti įvairių junginių poveikį SOD1 agregacijos kinetikai naudojama fluorescencinė spektroskopija. Baltymo agregatų susidarymas stebimas periodiškai matuojant ThT fluorescencijos emisijos intensyvumą. Iš agregacijos su DMSO kinetikos tyrimo duomenų, pateiktų 3.5 pav., matosi, jog didėjant DMSO kiekiui tirpale greičiau pasiekiamas išsotinimas, t.y. greičiau įvyksta agregacijos procesas. Be to, pastebėta, jog DMSO mažina ThT fluorescencijos intensyvumą. Tai apriboja sulfonamidų koncentracijas, kurios gali būti tikrinamos, nes naudojant dideles koncentracijas su mažėja skirtumas tarp maksimalios ir minimalios ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo, o gautos vertės mažai skiriasi nuo bazinės ThT fluorescencijos.



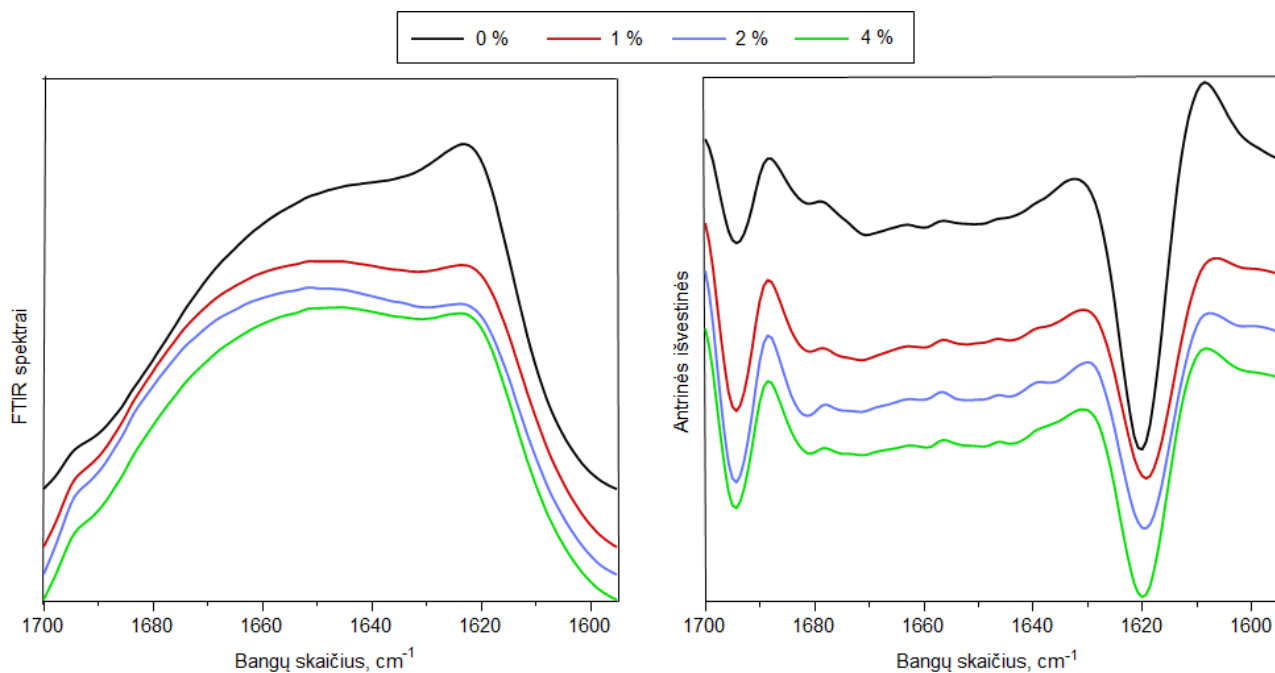
3.5 pav. SOD1 agregacijos kinetikos kreivės esant skirtingoms DMSO koncentracijoms.

Norint tiksliau įvertinti agregacijos kinetikos skirtumus gautos kreivės normalizuotos ir tuomet iš jų paskaičiuoti agregacijos puslaikiai (laikas, per kurį suagreguoja pusė baltymo), kurie parodė, kad DMSO sutrumpina laiką, per kurį suagreguoja SOD1. Taip pat buvo paskaičiuoti tiesių, išvestų per fibrilių ilgėjimo fazę atitinkamas kinetikos kreivių dalis, posvyrio koeficientai, kurie yra tiesiogiai proporcingi fibrilių ilgėjimo greičiui. Šie duomenys parodė, jog didėjant DMSO koncentracijai greičiau vyksta SOD1 fibrilių ilgėjimas (3.6 pav.).



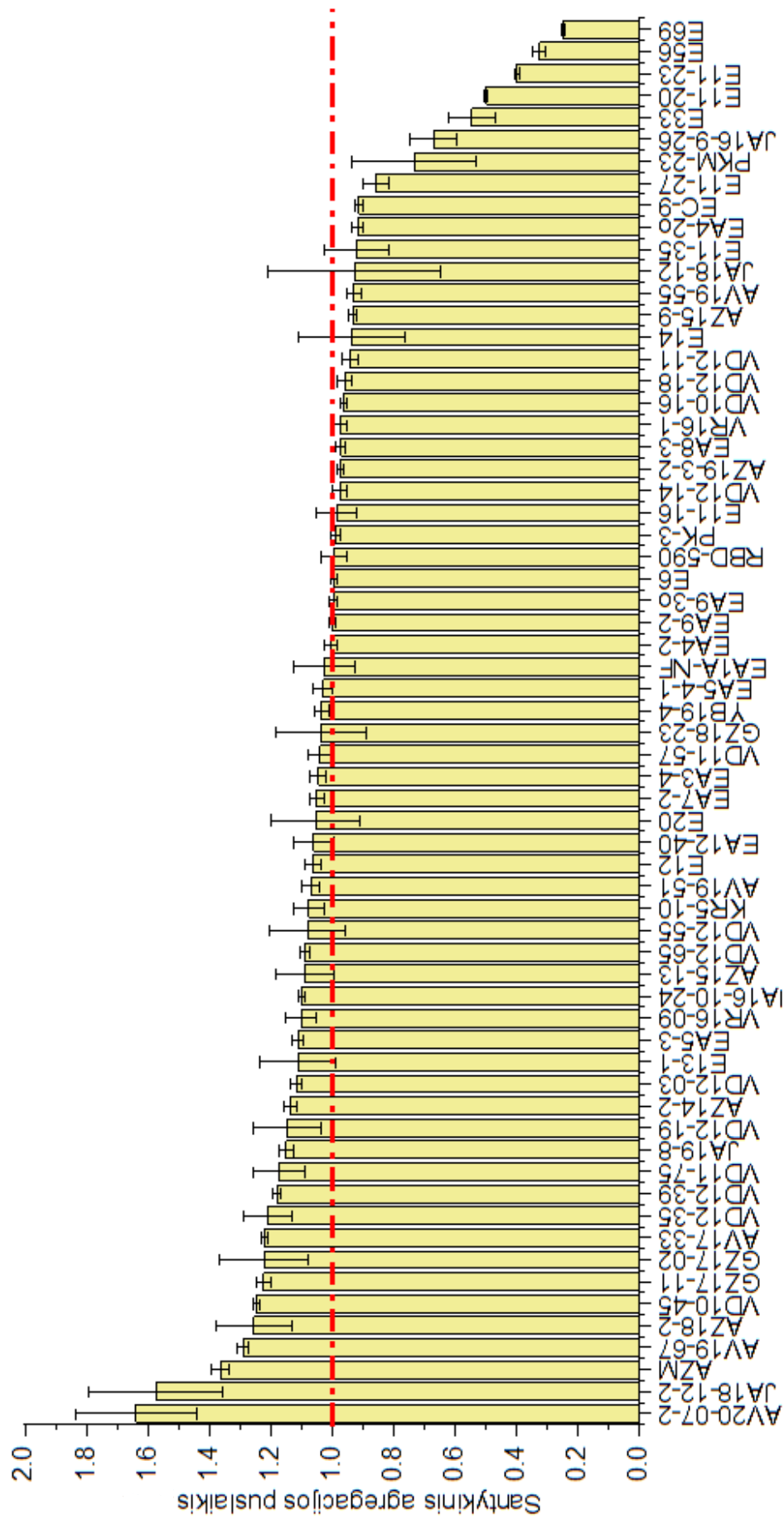
3.6 pav. SOD1 agregacijos puslaidžio ir santykinio fibrilių ilgėjimo greičio priklausomybė nuo DMSO koncentracijos.

Galiausiai nuspręsta ištirti DMSO poveikį SOD1 fibrilių antrinėms struktūroms. Jos nustatomos Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos pagalba. Tyrimų metu matuojama spindulių sugertis amido I regione ( $1700\text{ cm}^{-1} - 1595\text{ cm}^{-1}$ ). Sugerties pikų pozicijoms nustatyti ir skirtumams tarp skirtingų mėginių įvertinti iš gautų spektrų išvedamos antrinės išvestinės. Iš eksperimento duomenų matosi, jog SOD1 fibrilių atveju ties  $1624\text{ cm}^{-1}$  esantis sugerties pikas patenka į  $\beta$ -klostėms būdingą  $1640\text{ cm}^{-1} - 1620\text{ cm}^{-1}$  sugerties ruožą (3.7 pav.). Tirpale esant DMSO šio sugerties piko pozicija išlieka nepakitusi, tačiau šioje vietoje sumažėja signalo intensyvumas. Be to, sugertis santykinai padidėja nestruktūrizuotiems dariniams būdingoje srityje ties  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Tai reiškia, jog į agregacijos mišinį pridėjus DMSO galimai susidarė mažiau  $\beta$ -klosčių ir daugiau nestruktūrizuotų vietų turintys agregatai. Remiantis gautais duomenimis, tyrimų su slopikliais metu bus atsižvelgiama į DMSO kiekį tirpale pridėdant tokį patį kiekį šio tirpiklio į kontrolinius mėginius.

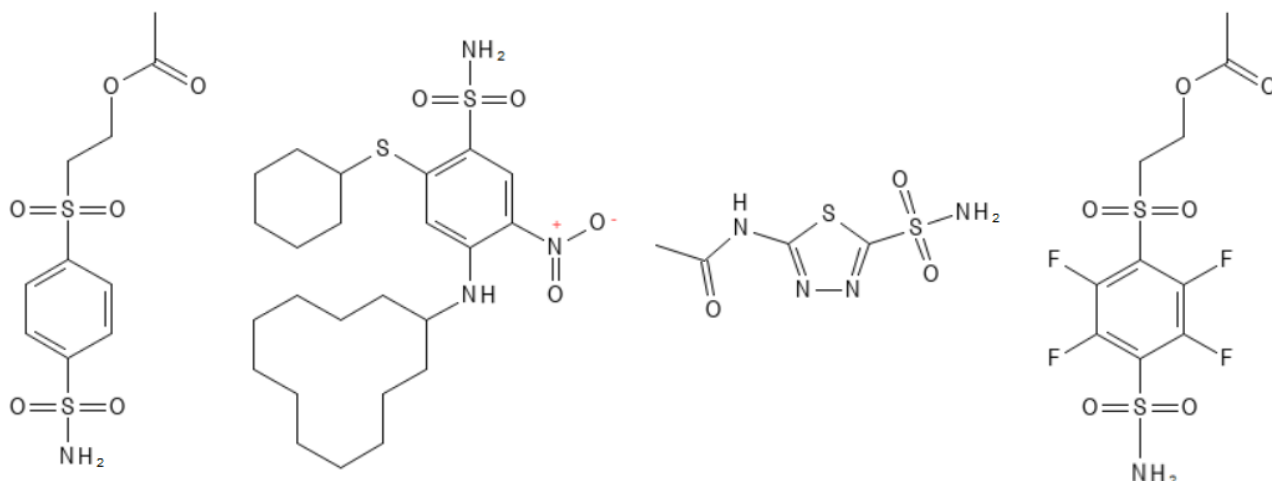


3.7 pav. SOD1 agregatų, susidariusių esant skirtingoms DMSO koncentracijoms, FTIR sugerties spektrai ir antrinės išvestinės.

SOD1 agregacijos tyrimų metu ištirtas atrinktų 64 sulfonamidų poveikis, kuomet tirpaluose baltymo-slopiklio koncentracijų santykis lygus 1:1 (200  $\mu\text{M}$  : 200  $\mu\text{M}$ ). Agregacijos slopinimo efektyvumui įvertinti iš gautų kinetikos duomenų paskaičiuoti agregacijos puslaikiai, kurie vėliau buvo padalinti iš kontrolinio mėginio agregacijos puslaikio (3.8 pav.). Bandymų metu nustatyta, jog du junginiai pasižymėjo stipriu agregaciją lėtinančiu poveikiu (didino agregacijos puslaikį daugiau nei 50 %), 24 atvejais buvo stebimas nedidelis slopinimo poveikis (didino agregacijos puslaikį iki 50 %), 21 junginys paklaidų ribose neturėjo įtakos SOD1 agregacijos greičiui. 11 junginių pasižymėjo silpnu (sumažino agregacijos puslaikį iki 1,5 karto), likę 6 – stipriu agregaciją greitinančiu poveikiu. Labiausiai SOD1 agregaciją iš sulfonamidų slopino AV20-07-02, tuo tarpu labiausiai agregatų susidarymą greitinantis junginys – E69, kuris agregacijos puslaikį sumažino net daugiau nei 4 kartais. Remiantis gautais SOD1 agregacijos kinetikos rezultatais atrinkti 4 didžiausiu agregaciją slopinančiu poveikiu pasižymėję junginiai, kurie buvo naudojami tolimesniuose eksperimentuose. Jų struktūrinės formulės pateiktos 3.9 pav.



3.8 pav. Santykiniai 200  $\mu$ M SOD1 agregacijos puslankiai tirpale esant 200  $\mu$ M sulfonamido.



**AV20-07-2**

**JA18-12-2**

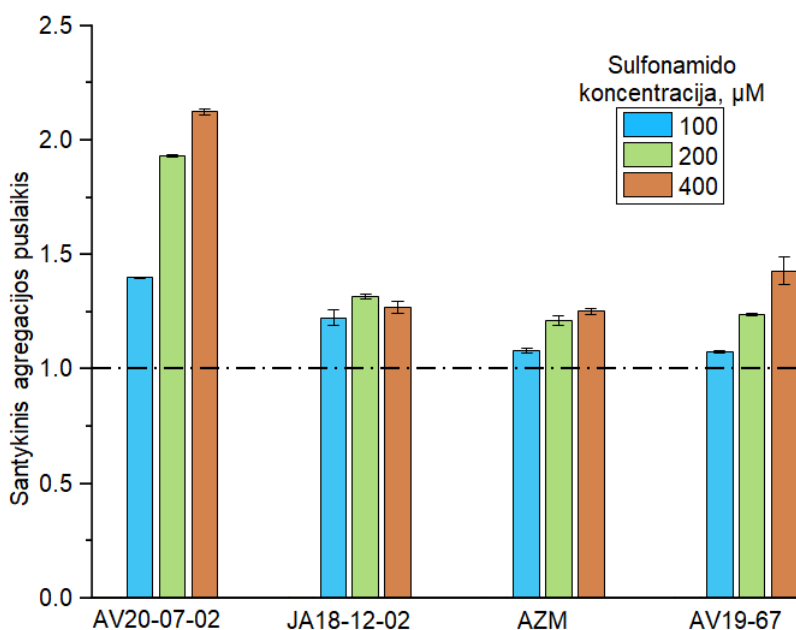
**AZM**

**AV19-67**

3.9 pav. Didžiausiu SOD1 agregaciją slopinančiu poveikiu pasižymėjusių sulfonamidų struktūrinės formulės.

Siekiant išsamiau ištirti sulfonamidų poveikį SOD1 agregacijos kinetikai buvo atlikti bandymai naudojant skirtingas atrinktų junginių koncentracijas. Tyrimo metu atsižvelgta į besikeičiantį DMSO kiekį tirpale keičiantis sulfonamidų koncentracijoms, tad kiekvienam mėginiui buvo paruošiamas kontrolinis mėginys su atitinkamu DMSO kiekiu. Iš gautų kinetikos kreivių paskaičiuoti santykiniai agregacijos puslaikiai (3.10 pav.). Pastebėta, jog didinant AV20-07-2, AZM bei AV19-67 koncentracijas didėjo SOD1 agregacijos trukmė, tuo tarpu JA18-12-2 atveju, nors ir agregacijos puslaikiai buvo didesni nei kontrolinių mėginių atveju, ryšys tarp didėjančios junginio koncentracijos ir stiprėjančio SOD1 agregacijos slopinimo efektyvumo, nebuvo nustatytas. Kaip ir buvo pastebėta prieš tai atliktame tyrime, labiausiai baltymo agregaciją slopino junginys AV20-07-2. Esant 200  $\mu$ M SOD1 ir naudojant dvigubai didesnę sulfonamido koncentraciją agregacijos puslaikis buvo daugiau nei du kartus didesnis negu mėginyje be šio junginio.

Norint geriau suvokti sulfonamidų poveikį SOD1 agregacijai, iš gautų duomenų buvo paskaičiuoti ir kiti kinetikos parametrai – santykinė lag fazės trukmė bei fibrilių ilgėjimo greitis. Palyginant šiuos dydžius su kontrolinių mėginių rezultatais galima išsiaiškinti, kurios agregacijos stadijos metu vyksta slopinimas bei nuspėti galimą slopinimo mechanizmą.



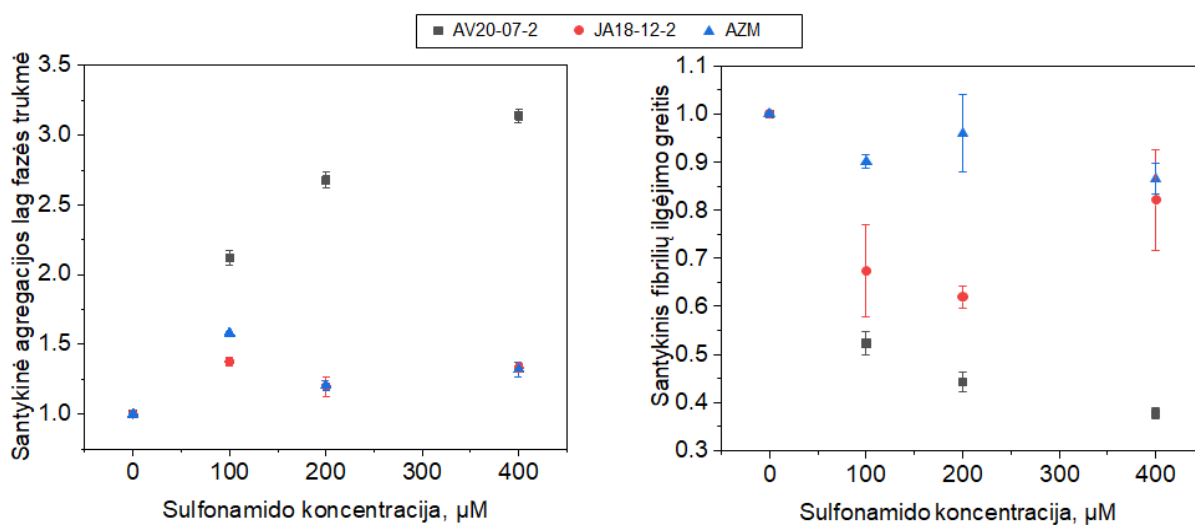
3.10 pav. 200 μM SOD1 agregacijos puslaikiai esant skirtingoms sulfonamidų koncentracijoms.

SOD1 agregacijos lag fazės trukmė – laikas, per kurį ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo kreivės nuo eksperimento pradžios pereina į eksponentinį kilimą. Lag fazės metu vyksta agregacijos branduolių susidarymas iš pavienių baltymo monomerų. Į tirpalą pridėjus 100 μM AV20-07-2 (naudojant 200 μM SOD1), šios fazės trukmė padidėjo daugiau nei 2 kartus, o pridėjus 200 μM slopiklio – daugiau nei 3 kartus (3.11 pav. kairėje). Lag fazė taip pat truko ilgiau ir didinant AV19-67 koncentracijas tirpale, tuo tarpu JA18-12-2 ir AZM atveju gautos vertės nebuvo tiesiogiai proporcingos junginio koncentracijai, nors ir visais atvejais buvo šiek tiek didesnės nei kontroliniuose mėginiuose.

Matuojant fibrilių eksponentinio augimo greitį nustatyta, jog šio dydžio vertės didėja, kuomet yra didinamos sulfonamidų AV20-07-2 bei AV19-67 koncentracijos, o JA18-12-2 ir AZM, kaip ir lag fazės trukmės atveju, turėjo įtakos lėtesniam fibrilių formavimuisi, tačiau šis efektas nuo junginio koncentracijos nėra priklausomas (3.11 pav. dešinėje.). Remiantis gautais duomenimis galima teigti, jog SOD1 agregacijos puslaikių didėjimas pridėnant į mišinį sulfonamidų priklauso tiek nuo ilgesnės lag fazės, tiek dėl lėtesnės fibrilių ilgėjimo stadijos. Naudojamų slopiklių molekulės galimai sąveikauja su baltymo monomerais trukdydamos jų jungimąsi tarpusavyje formuojant agregacijos branduolius bei prikibimą prie besiformuojančio fibrilinio darinio galų.

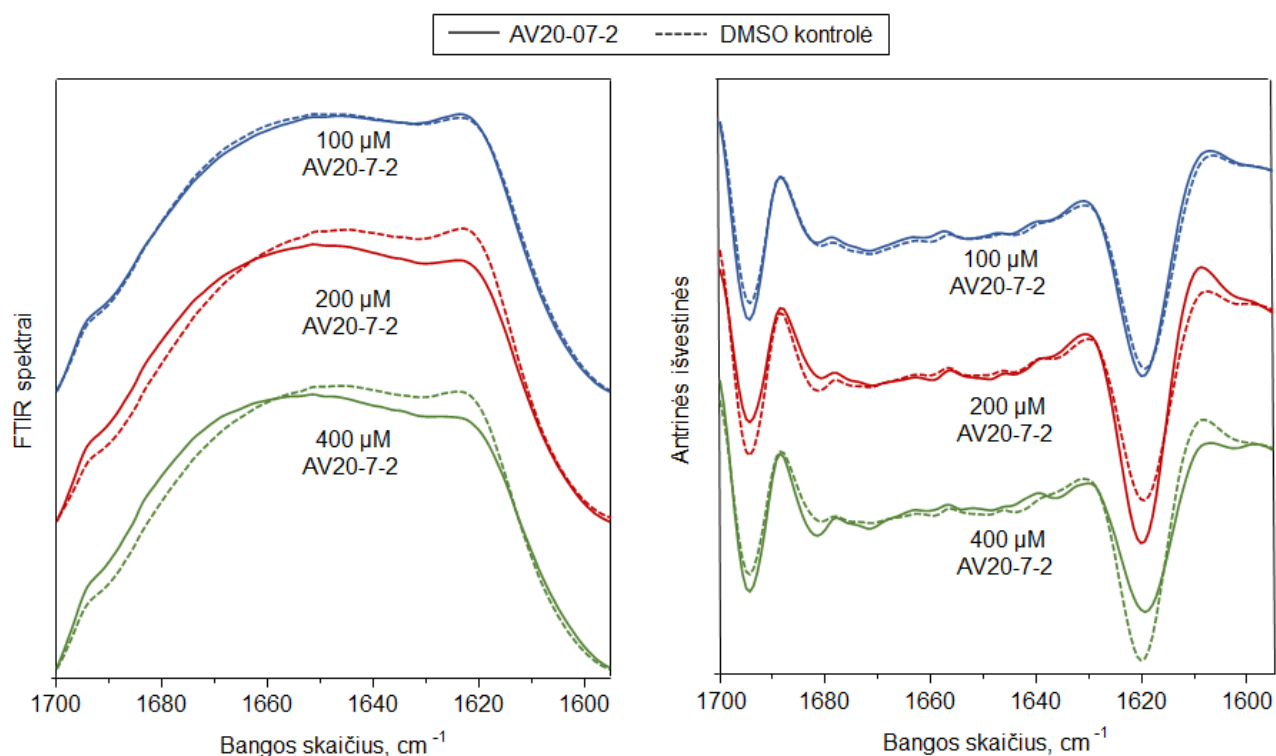
Įvairių agregacijos stadijų slopinimo efektas ne visų sulfonamidų atveju priklausė nuo didėjančios junginio koncentracijos. Taip gali būti dėl nevienodų sąveikų su baltymu keičiantis šių medžiagų koncentracijai. Esant didesniam sulfonamidų kiekiui tame pačiame tūryje gali padidėti vandenilinių ryšių kiekis tarp šių slopiklių molekulių. Tokiu atveju sumažėja jų sąveika su baltymo

molekulėmis ir agregacijos procesas vyksta lengviau. Panašus reiškinys buvo aprašytas tiriant amiloido  $\beta$  agregacijos slopinimą žaliojoje arbatoje aptinkamu EGCG (Wang *et al*, 2012).



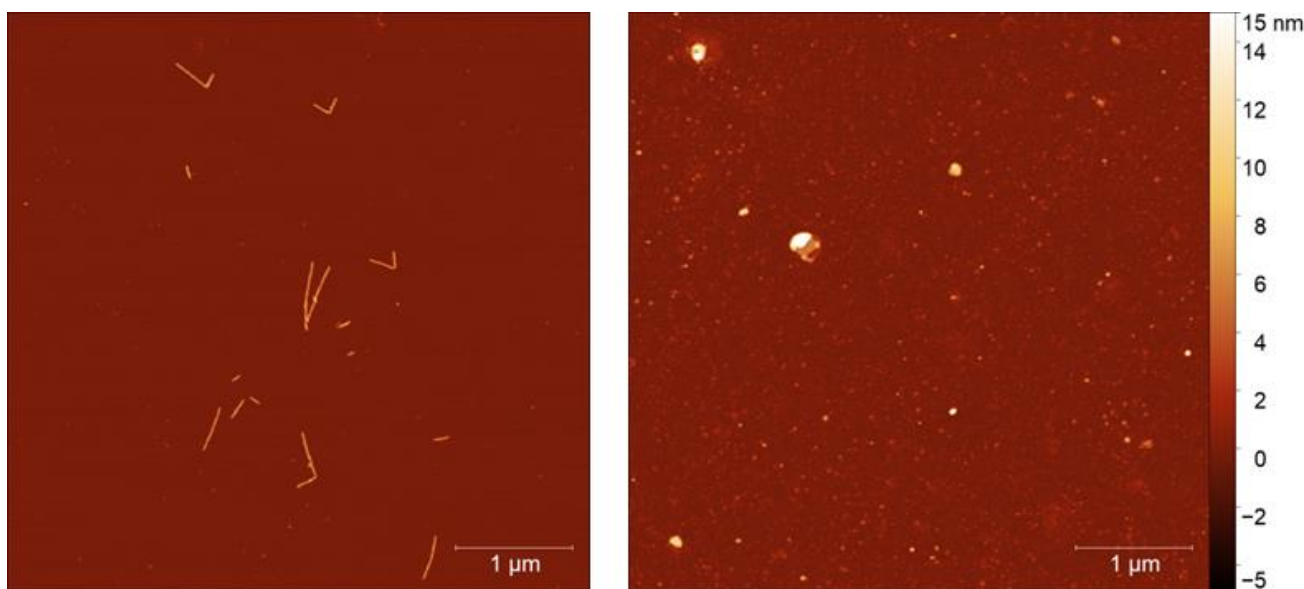
3.11 pav. SOD1 agregacijos santykinė lag fazės trukmė (kairėje) ir fibrilių ilgėjimo greitis (dešinėje) esant skirtingoms sulfonamidų koncentracijoms.

Vėliau buvo nuspręsta patikrinti didžiausiu SOD1 agregaciją slopinančiu poveikiu pasižymėjusio junginio AV20-07-2 poveikį agregatų antrinėms struktūroms. Lyginant gautus FTIR sugerties spektrus ir antrines išvestines, galima teigti, jog šis sulfonamidas neturėjo ryškios įtakos susidarantiems SOD1 fibrilių struktūrai (3.12 pav.). Visuose AV20-07-2 mėginiuose buvo užfiksuotas panašaus intensyvumo sugerties pikas ties  $1624\text{ cm}^{-1}$ .



3.12 pav. SOD1 agregatų, gautų naudojant skirtingas AV20-07-2 koncentracijas, FTIR sugerties spektrai ir antrinės išvestinės. Punktyrinėmis linijomis žymimi kontrolinių mėginių duomenys.

AV20-07-2 poveikio SOD1 agregatų morfologijai įvertinti taikyta atominės jėgos mikroskopija. Iš padarytų AFM nuotraukų matosi, jog pridėjus sulfonamido susidarė smulkios apvalios formos baltymų sankaupos (3.13 pav. dešinėje), tuo tarpu įprastomis SOD1 agregacijos sąlygomis susiformavo nedideli amiloidinių fibrilių pavidalo dariniai (3.13 pav. kairėje).

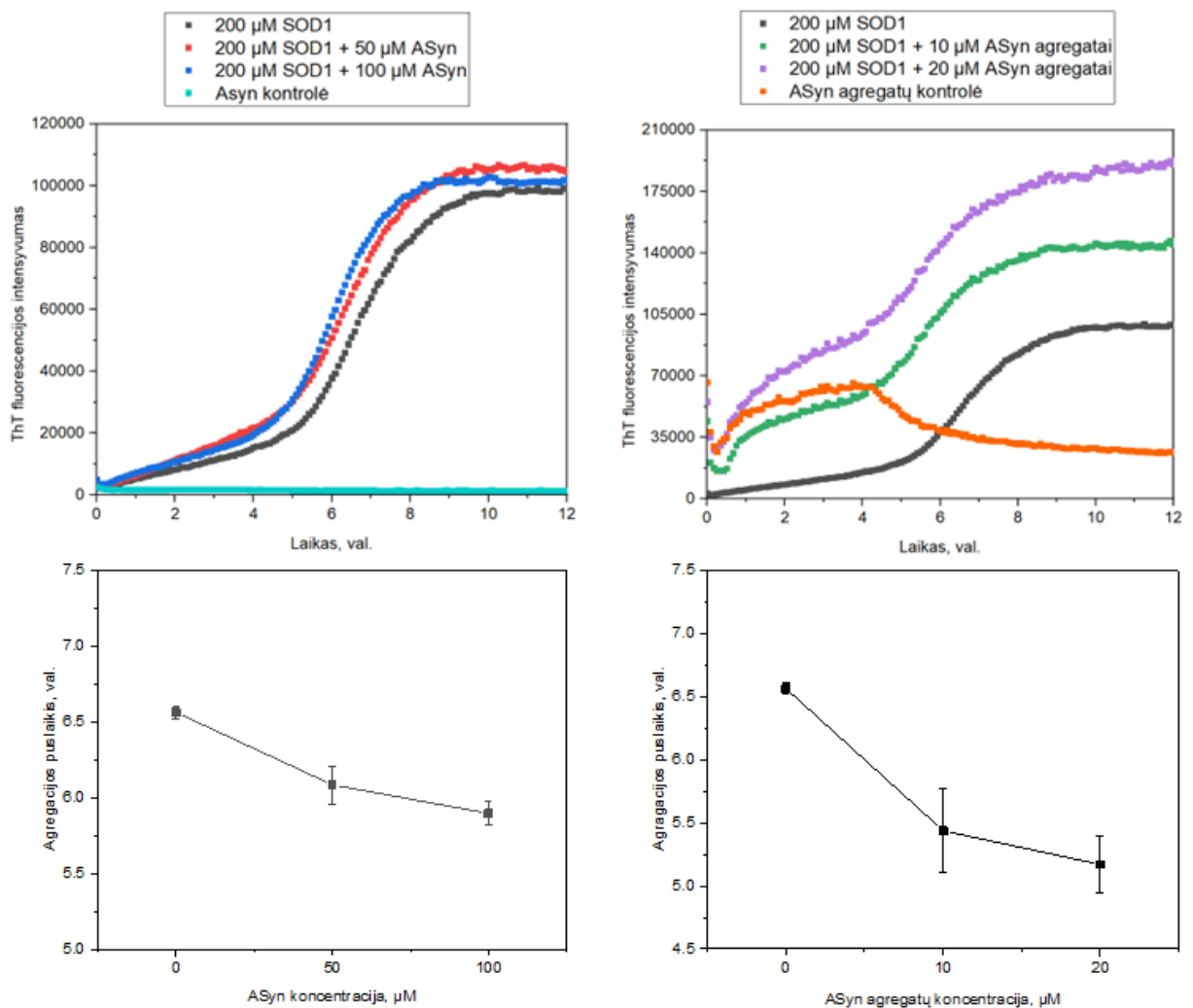


3.13 pav. SOD1 agregatų AFM nuotraukos: be AV20-07-2 (kairėje); su 200  $\mu$ M AV20-07-2 (dešinėje).

### 3.3. AV20-07-2 įtaka SOD1 agregacijai su alfa-sinukleinu

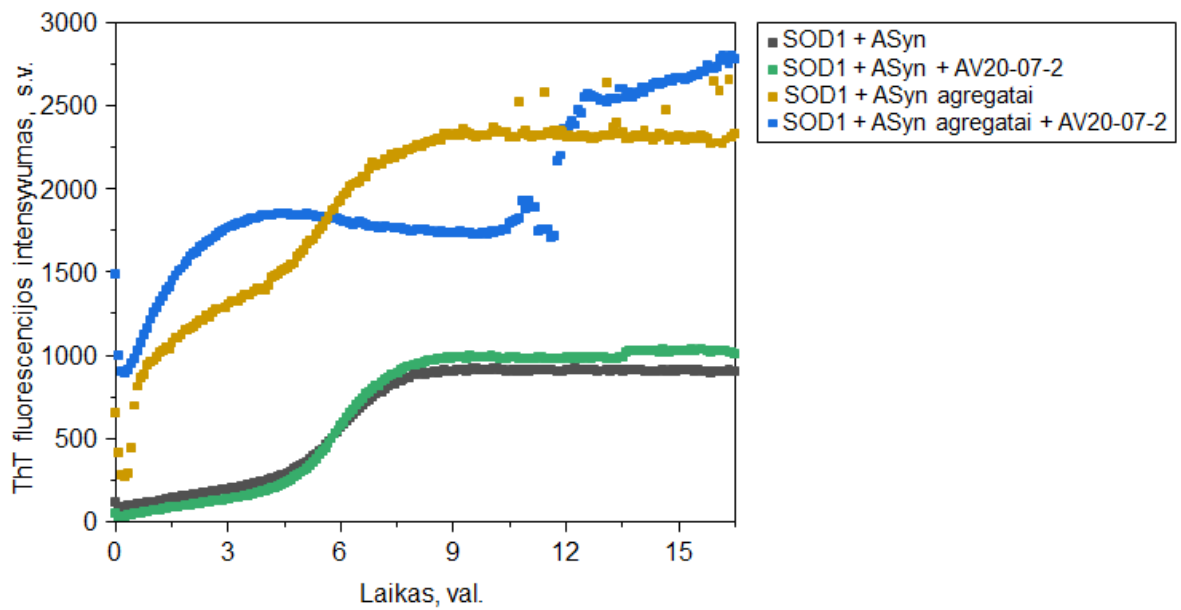
Paskutiniame šio tiriamojo darbo etape nuspręsta sujungti anksčiau tirtus procesus - SOD1 agregacijos slopinimą sulfonamidais ir agregaciją su ASyn. Bandymų metu siekta nustatyti, ar labiausiai SOD1 fibrilių susidarymą stabdantis junginys AV20-07-2 turės įtakos šio baltymo agregacijai su ASyn. Tačiau pirmiausiai reikėjo patikrinti kaip SOD1 agregacija su ASyn vyksta, kuomet vietoj GuHCl naudojamas DMSO. Gauti duomenys parodė, jog didėjant ASyn koncentracijai šio baltymo poveikis SOD1 agregacijai buvo silpnesnis lyginant su prieš tai gautais rezultatais (3.14 pav.). ASyn monomerai fibrilių susidarymo puslaikį sutrumpino mažiau nei valanda, ASyn agregatų atveju – iki pusantros valandos. Taip gali būti dėl to, jog, kaip išsiaiškinta prieš tai, tirpale esantis DMSO greitina SOD1 agregaciją, todėl ASyn poveikis gali būti nebe toks pastebimas.





3.14 pav. SOD1 agregacijos su ASyn monomerais (viršuje kairėje) ir agregatais (viršuje dešinėje) kinetikos kreivės ir agregacijos puslaikiai (atitinkamai apačioje kairėje ir dešinėje).

Į mėginius su 200 μM SOD1 ir 100 μM ASyn monomerų ir į tuos, kuriuose buvo 200 μM SOD1 ir 40 μM ASyn agregatų buvo pridėta 200 μM AV20-07-2. Atlikus agregacijos kinetikos tyrimą paaiškėjo, jog šis sulfonamidas neturėjo įtakos SOD1 agregacijai su ASyn monomerais, gautos identiškios ThT fluorescencijos intensyvumo kreivės. Tuo tarpu SOD1 agregacijos su ASyn fibrilėmis stebimi du staigūs ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo kilimai. Pirmasis iš jų abiem atvejais matomas eksperimento pradžioje vyksta dėl pridėtų ASyn agregatų. Antrasis matavimo verčių kilimas pridėjus sulfonamido vyksta keliomis valandomis vėliau. Taigi, AV20-07-2 pridėjimas į tirpalą SOD1 agregaciją slopino net ir esant ASyn agregatams. Gali būti ir taip, jog dalis SOD1 molekulių prikibo prie ASyn fibrilių dar tyrimo pradžioje, o dalis suagregavo žymiai, kadangi pradžioje buvo užfiksuotos didesnės ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo vertės nei kontrolinio mėginio atveju, tačiau antrasis verčių didėjimas vyko vėliau. ASyn monomerų atveju pridėtas sulfonamidas proceso kinetikai poveikio neturėjo.



3.15 pav. SOD1 agregacijos su ASyn monomerais, fibrilėmis ir sulfonamidu AV20-07-2 kinetikos kreivės.

## **Išvados**

1. ASyn fibrilės pasižymi didesniu SOD1 agregaciją skatinančiu poveikiu nei monomerinis ASyn.
2. Labiausiai SOD1 agregaciją slopina sulfonamidas AV20-07-2, labiausiai greitina – E69.
3. AV20-07-2 lėtina SOD1 agregaciją su ASyn fibrilėmis, tačiau neturi poveikio, kuomet SOD1 agreguoja tirpale esant ASyn monomerams.

**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

Biochemijos studijų programos II kurso studentas

Dominykas Veiveris

**SULFONAMIDŲ IR ALFA-SINUKLEINO POVEIKIS SUPEROKSIDO  
DISMUTAZĖS-1 AGREGACIJAI**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Santrauka

Amiotrofinė lateralinė sklerozė (ALS) – neurodegeneracinė liga, siejama su neteisingai susilanksčiusių superoksido dismutazės-1 (SOD1) molekulių agregacija, dėl kurios smegenyse kaupiasi netirpūs neurofibriliniai dariniai, sukeliantys motorinių neuronų žūtį. Kol kas nėra vaisto, pilnai išgydančio šią ligą, tačiau tyrimų metu aktyviai ieškoma junginių, galinčių slopinti SOD1 amiloidinės agregacijos procesą. Kai kurių neurodegeneracinių ligų atveju aptinkami agregatų sankaupos, sudarytos iš skirtingų baltymų molekulių, tad manoma, jog įtakos SOD1 agregacijai ALS metu gali turėti ir kiti amiloidogeniai baltymai.

Šio darbo metu buvo ištirtas 64 sulfonamidų poveikis SOD1 fibrilių susidarymui ir nustatyta, jog iš jų labiausiai agregaciją slopina junginys AV20-07-2, o labiausiai greitina – E69. Taip pat buvo parodyta, jog Parkinsono ligos metu netirpius baltyminius darinius formuojantis baltymas alfa-sinukleinas greitina SOD1 agregacijos procesą. Tyrimų metu paaiškėjo, jog į SOD1 tirpalą pridėjus ASyn monomerų, sulfonamidas AV20-07-2 praranda gebėjimą slopinti SOD1 amiloidinę agregaciją, tačiau naudojant ASyn fibriles agregacijos slopinimas išlieka. Pamatavus visų mėginių FTIR sugerties spektrus, buvo nustatyta, kad SOD1 fibrilių antrinė struktūra išliko tokia pati visų bandymų metu, o atsirandantys pokyčiai tarp sugerties spektro verčių yra dėl nevienodo ASyn agregatų kiekio tirpale.

Vilnius, 2022

**VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER**

II<sup>nd</sup> year student of biochemistry

Dominykas Veiveris

**THE EFFECT OF SULFONAMIDES AND ALPHA-SYNUCLEIN ON  
SUPEROXIDE DISMUTASE-1 AGGREGATION**

Master Thesis

Summary

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease related amyloid aggregation of misfolded molecules of superoxide dismutase-1 (SOD1), leading to accumulation of insoluble neurofibrillar tangles in motor neurons. Currently, there is no medicine that could fully cure ALS, although scientists are actively searching for compounds that would inhibit amyloid aggregation of SOD1. There is a hypothesis that other amyloid proteins could affect SOD1 aggregation as well, because there are known cases of neurofibrillar clusters composed of molecules of different proteins.

During this work the effect of 64 sulfonamides on SOD1 aggregation was examined and it was shown that SOD1 aggregation is most inhibited when the compound AV20-07-2 is being used while E69 stimulates the aggregation process the most. There was also shown that alpha-synuclein (ASyn), a protein involved in Parkinson's disease pathology, act as a SOD1 aggregation accelerator. However, when ASyn monomers were added to SOD1 solution, AV20-07-2 lost its capability of inhibiting SOD1 aggregation although the aggregation inhibitory effect was maintained when ASyn aggregates were used. FTIR spectra of formed aggregates showed no significant difference in the secondary structures between SOD1 fibrils while the change of absorption values might be caused by unequal quantity of ASyn aggregates in the samples.

Vilnius, 2022

## Literatūros sąrašas

- Aktekin MR, Uysal H. Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *nd.* 2020 Oct 13;26(3):187–96.
- Andrews JA, Meng L, Kulke SF, Rudnicki SA, Wolff AA, Bozik ME, et al. Association Between Decline in Slow Vital Capacity and Respiratory Insufficiency, Use of Assisted Ventilation, Tracheostomy, or Death in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2018 Jan 1;75(1):58.
- Arthur KC, Calvo A, Price TR, Geiger JT, Chiò A, Traynor BJ. Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nat Commun.* 2016 Nov;7(1):12408.
- Auclair JR, Boggio KJ, Petsko GA, Ringe D, Agar JN. Strategies for stabilizing superoxide dismutase (SOD1), the protein destabilized in the most common form of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Dec 14;107(50):21394–9.
- Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The Function of  $\alpha$ -Synuclein. *Neuron.* 2013 Sep;79(6):1044–66.
- Bhatia NK, Srivastava A, Katyal N, Jain N, Khan MAI, Kundu B, et al. Curcumin binds to the pre-fibrillar aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and alters its amyloidogenic pathway resulting in reduced cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2015 May;1854(5):426–36.
- Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2010 Jul;1804(7):1405–12.
- Biancalana M, Makabe K, Koide A, Koide S. Aromatic Cross-Strand Ladders Control the Structure and Stability of  $\beta$ -rich Peptide Self-Assembly Mimics. 2009;19.
- Bondarev S, Antonets K, Kajava A, Nizhnikov A, Zhouravleva G. Protein Co-Aggregation Related to Amyloids: Methods of Investigation, Diversity, and Classification. *IJMS.* 2018 Aug 4;19(8):2292.
- Bonvicini F, Marcello N, Mandrioli J, Pietrini V, Vinceti M. Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. :4.
- Boston-Howes W, Gibb SL, Williams EO, Pasinelli P, Brown RH, Trotti D. Caspase-3 Cleaves and Inactivates the Glutamate Transporter EAAT2. *Journal of Biological Chemistry.* 2006 May;281(20):14076–84.
- Chatani E, Yuzu K, Ohhashi Y, Goto Y. Current Understanding of the Structure, Stability and Dynamic Properties of Amyloid Fibrils. *IJMS.* 2021 Apr 21;22(9):4349.
- Cho H, Shukla S. Role of Edaravone as a Treatment Option for Patients with Amyotrophic

Lateral Sclerosis. *Pharmaceuticals*. 2020 Dec 31;14(1):29.

- Cohen SIA, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TPJ. From Macroscopic Measurements to Microscopic Mechanisms of Protein Aggregation. *Journal of Molecular Biology*. 2012 Aug;421(2–3):160–71.
- Culik RM, Sekhar A, Nagesh J, Deol H, Rumfeldt JAO, Meiering EM, et al. Effects of maturation on the conformational free-energy landscape of SOD1. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2018 Mar 13 [cited 2022 May 30];115(11). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1721022115>
- da Costa Franceschini A, Mourão LF. Dysarthria and dysphagia in Amyotrophic Lateral Sclerosis with spinal onset: A study of quality of life related to swallowing. Brogårdh C, Lexell J, editors. *NRE*. 2015 Feb 25;36(1):127–34.
- de Boer EMJ, Orié VK, Williams T, Baker MR, De Oliveira HM, Polvikoski T, et al. TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2021 Jan;92(1):86–95.
- Debnath K, Pradhan N, Singh BK, Jana NR, Jana NR. Poly(trehalose) Nanoparticles Prevent Amyloid Aggregation and Suppress Polyglutamine Aggregation in a Huntington's Disease Model Mouse. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Jul 19;9(28):24126–39.
- Eftekhazadeh B. Structural studies on the mechanism of protein aggregation in age related neurodegenerative diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2016;13.
- Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2016;9.
- Fernandes L, Cardim-Pires TR, Foguel D, Palhano FL. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-Gallate in Amyloid Aggregation and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci*. 2021 Sep 14;15:718188.
- Fernández-Borges N, Eraña H, Elezgarai SR, Harrathi C, Gayosso M, Castilla J. Infectivity versus Seeding in Neurodegenerative Diseases Sharing a Prion-Like Mechanism. *International Journal of Cell Biology*. 2013;2013:1–9.
- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2011 Nov;7(11):616–30.
- Ganguly J, Jog M. Tauopathy and Movement Disorders—Unveiling the Chameleons and Mimics. *Front Neurol*. 2020 Nov 5;11:599384.
- Giorgetti S, Greco C, Tortora P, Aprile FA. Targeting Amyloid Aggregation: An Overview of Strategies and Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2018;27.
- Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new

hope. 2017;4.

- Hadi Alijanvand S, Peduzzo A, Buell AK. Secondary Nucleation and the Conservation of Structural Characteristics of Amyloid Fibril Strains. *Front Mol Biosci.* 2021 Apr 16;8:669994.
- Helferich AM, Ruf WP, Grozdanov V, Freischmidt A, Feiler MS, Zondler L, et al.  $\alpha$ -synuclein interacts with SOD1 and promotes its oligomerization. *Mol Neurodegeneration.* 2015 Dec;10(1):66.
- Hinchcliffe M, Smith A. extension of median survival times in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease.* :10.
- Horvath I, Iashchishyn IA, Moskalenko RA, Wang C, Wärmländer SKTS, Wallin C, et al. Co-aggregation of pro-inflammatory S100A9 with  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease: ex vivo and in vitro studies. *J Neuroinflammation.* 2018 Dec;15(1):172.
- Jha A, Kumar MG, Gopi HN, Paknikar KM. Inhibition of  $\beta$ -Amyloid aggregation Through a Designed  $\beta$ -hairpin Peptide. :35.
- Khan R, Ahmad E, Zaman M, Qadeer A, Rabbani G. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *IJN.* 2014 Feb;899.
- Kim WS, Kågedal K, Halliday GM. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alz Res Therapy.* 2014 Oct;6(5–8):73.
- Köppen J, Schulze A, Machner L, Wermann M, Eichentopf R, Guthardt M, et al. Amyloid-Beta Peptides Trigger Aggregation of Alpha-Synuclein In Vitro. 2020;18.
- Kovacs GG. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. :7.
- Kovacs GG. Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. :11.
- Kovacs GG. Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. *J Clin Pathol.* 2019 Nov;72(11):725–35.
- Mehta D, Jackson R, Paul G, Shi J, Sabbagh M. Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2017 Jun 3;26(6):735–9.
- Menounos S, Hansbro PM, Diwan AD, Das A. Pathophysiological Correlation between Cigarette Smoking and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *NeuroSci.* 2021 Apr 20;2(2):120–34.
- Mezzenga R, Adamcik J. The Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape. *Angewandte Chemie International Edition.* :16.
- Miller AF. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters.* 2012 Mar 9;586(5):585–95.
- Mohammedi K, Bellili-Muñoz N, Driss F, Roussel R, Seta N, Fumeron F, et al. Manganese Superoxide Dismutase (SOD2) Polymorphisms, Plasma Advanced Oxidation Protein



- Products (AOPP) Concentration and Risk of Kidney Complications in Subjects with Type 1 Diabetes. Drossopoulou G, editor. PLoS ONE. 2014 May 12;9(5):e96916.
- Musteikyte G, Ziaunys M, Smirnovas V. Methylene blue inhibits nucleation and elongation of SOD1 amyloid fibrils. PeerJ. 2020 Aug 14;8:e9719.
  - Natale G., Biagioni F., Vivacqua G. The neurobiology of dysautonomia in Parkinson's disease. Archives Italiennes de Biologie. 2014;(4):203–18.
  - Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Chaudhry FA, et al. Increased Expression of Alpha-Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering After Endocytosis. 2011;25.
  - Parascandolo A, Laukkanen MO. SOD3 Is a Non-Mutagenic Growth Regulator Affecting Cell Migration and Proliferation Signal Transduction. 2021;12.
  - Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated SOD1 Mutant Proteins Bind and Aggregate with Bcl-2 in Spinal Cord Mitochondria. :12.
  - Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. 2006;14.
  - Physical activity as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis-findings from three large European cohorts. Journal of Neurology. 2020;3.
  - Piccoli GB. Doxycycline treatment in dialysis related amyloidosis: discrepancy between antalgic effect and inflammation, studied with FDG-positron emission tomography: a case report. 2017;6.
  - Pranke IM, Morello V, Bigay J, Gibson K, Verbavatz JM, Antony B, et al.  $\alpha$ -Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. :15.
  - Seetharaman SV, Prudencio M, Karch C, Holloway SP, Borchelt DR, Hart PJ. Immature Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. Exp Biol Med (Maywood). 2009 Oct;234(10):1140–54.
  - Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. Nature. 2016 Sep 1;537(7618):50–6.
  - Shanmugam N, Baker MODG, Ball SR, Steain M, Pham CLL, Sunde M. Microbial functional amyloids serve diverse purposes for structure, adhesion and defence. Biophys Rev. 2019 Jun;11(3):287–302.
  - Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, et al. Superoxide

- Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem Rev.* 2014 Apr 9;114(7):3854–918.
- Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2010 Jan;1802(1):45–51.
  - Subedi S, Sasidharan S, Nag N, Saudagar P, Tripathi T. Amyloid Cross-Seeding: Mechanism, Implication, and Inhibition. *Molecules.* 2022 Mar 8;27(6):1776.
  - Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In: *Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2022 May 30]. p. 225–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029732000136>*
  - Taneja V, Verma M, Vats A. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann Indian Acad Neurol.* 2015;18(2):138.
  - Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature.* 2016 Nov 10;539(7628):197–206.
  - Tee BL, Longoria Ibarrola EM, Geschwind MD. Prion Diseases. *Neurologic Clinics.* 2018 Nov;36(4):865–97.
  - Torres-Garcia L, P. Domingues JM, Brandi E, Haikal C, Mudannayake JM, Brás IC, et al. Monitoring the interactions between alpha-synuclein and Tau in vitro and in vivo using bimolecular fluorescence complementation. *Sci Rep.* 2022 Dec;12(1):2987.
  - Vahdat Shariatpanahi A. The Importance of Macrophages, Lipid Membranes and Seeding in Experimental AA Amyloidosis [Internet]. Linköping: Linköping University Electronic Press; 2019 [cited 2022 May 30]. (Linköping University Medical Dissertations; vol. 1687). Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:liu:diva-159658>
  - Wright GSA. Bacterial Evolutionary Precursors of Eukaryotic Copper–Zinc Superoxide Dismutases. Echave J, editor. *Molecular Biology and Evolution.* 2021 Aug 23;38(9):3789–803.
  - Xue WF, Hellewell AL, Gosal WS, Homans SW, Hewitt EW, Radford SE. Fibril Fragmentation Enhances Amyloid Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry.* 2009 Dec;284(49):34272–82.
  - Xue WF, Hellewell AL, Hewitt EW, Radford SE. Fibril fragmentation in amyloid assembly and cytotoxicity: When size matters. *Prion.* 2010 Jan;4(1):20–5.
  - Yang LPH, Deeks ED. Dextromethorphan/Quinidine: A Review of Its Use in Adults with Pseudobulbar Affect. *Drugs.* 2015 Jan;75(1):83–90.
  - Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surgical Neurology International.* 2015;23.

4 lentelė. Sulfonamidų pavadinimai.

<b>Kodas</b>	<b>Junginio pavadinimas</b>
AV20-07-2	2-((4-sulfamoilfenil)sulfonil)etil acetatas
JA18-12-2	4-(ciklododecilamino)-2-cikloheksilsulfanil-5-nitro-benzensulfonamidas
AZM	Acetazolamidas
AV19-67	2-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-(metilsulfonil)fenil)sulfonil)etil acetatas
AZ-18-2	2-[(4-fluorofenil)sulfonilamino]-3-metil-butano hidroksaminė rūgštis
VD10-45	4-[(4,5-difenil-1H-imidazol-2-il)sulfanil]-2,3,5,6-tetrafluorobenzen-1-sulfonamidas
GZ17-11	N-[2-[2-(ciklooktilamino)-3,5,6-trifluoro-4-(metilsulfamoil)fenil]sulfoniletil]acetamidas
GZ17-2	N-(2-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-(N-metilsulfamoil)fenil)tio)etil)acetamidas
AV17-33	N-(2-((2,6-bis(ciklooktilamino)-3,5-difluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)etil)acetamidas
VD12-35	2-(ciklododecilamino)-3,5,6-trifluorobenzen-1-sulfonamidas
VD12-39	3-(ciklododecilamino)-2,5,6-trifluoro-4-(2-feniletanosulfonil)benzen-1-sulfonamide
VD11-75	2,3,5-trifluoro-4-[(2-feniletil)sulfanil]-6-[[2-(2R)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-il]amino]benzen-1-sulfonamidas
JA19-8	Metil-4-izopentilsulfinil-3-sulfamoil-benzoatas
VD12-19	2-(ciklododecilamino)-3,5,6-trifluoro-4-[(2-hidroksietil)sulfanil]benzen-1-sulfonamidas
AZ14-2	Metil-3-[[2-(butilkarbamoil)-5-chloro-4-sulfamoilfenil]sulfanil]propanoatas

4 lentelės tęsinys

<b>Kodas</b>	<b>Junginio pavadinimas</b>
VD12-3	3-(ciklododecilamino)-2,5,6-trifluoro-4-(2-hidroksietanosulfonil)benzen-1-sulfonamidas
E13-1	N-(5-chloro-2-metil-4-sulfamoilfenil)acetamidas
EA5-3	N-butil-4-chloro-2-(cikloheksilsulfanil)-5-sulfamoilbenzamidas
VR16-09	4-(2-([3-(ciklododecilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil]sulfanil)etil)benzoinė rūgštis
JA16-10-24	2-[3-(ciklooktilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoil-fenil]sulfaniletilamonio chloridas
AZ15-13	5-[2-(1H-1,3-benzodiazol-1-il)acetil]-2-chloro-4-[(2-feniletil)sulfanil]benzen-1-sulfonamidas
VD12-65	3-(ciklododecilamino)-2,6-difluoro-4-(2-hidroksietanosulfonil)-5-[[2-(4-hidroksifenil)etil]amino]benzen-1-sulfonamidas
VD12-55	3-(butilamino)-5-(ciklododecilamino)-2,6-difluoro-4-(2-hidroksietanosulfonil)benzen-1-sulfonamidas
KR5-10	4-[(2-([N'-(1E)-(4-bromofenil)metiliden]hidrazinokarbonil)etil)amino]benzen-1-sulfonamidas
AV19-51	2-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-(N-metilsulfamoil)fenil)tio)etilo acetatas
E12	2-chloro-5-[2-(2-etil-1H-1,3-benzodiazol-1-il)acetil]benzen-1-sulfonamidas
EA12-4o	4-[(4-chloro-2-fenilmetanosulfonil-5-sulfamoilfenil)formamido]butano rūgštis
E20	2-chloro-5-[2-[2-(morfolinometil)benzimidazol-1-il]acetil]benzensulfonamidas
EA7-2	2-chloro-5-(morfolin-4-karbonil)-4-(fenilsulfanil)benzen-1-sulfonamidas

4 lentelės tęsinys.

<b>Kodas</b>	<b>Junginio pavadinimas</b>
EA3-4	2-(benzilsulfanil)-4-chloro-N-(2-hidroksietil)-5-sulfamoilbenzamidą
VD11-57	3,5-bis(ciklooktilamino)-2,6-difluoro-4-[(2-feniletil)sulfanil]benzen-1-sulfonamidą
GZ18-23	3-((2-(ciklooktilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propano rūgštis
YB19-4	4-(1-adamantilsulfanil)-N-butil-3-sulfamoil-benzamidą
EA5-4-1	2,4-bis(benzilsulfanil)-N-butil-5-sulfamoilbenzamidą
EA1A-NF	4-chloro-2-(1-naftilsulfanil)-5-sulfamoil-benzamidą
EA4-2	4-chloro-N-(3-hidroksipropil)-2-(fenilsulfanil)-5-sulfamoilbenzamidą
EA9-2	4-chloro-N-cikloheksil-2-(fenilsulfanil)-5-sulfamoilbenzamidą
EA9-3o	4-chloro-2-(cikloheksanesulfonil)-N-cikloheksil-5-sulfamoilbenzamidą
E6	2-chloro-5-{2-[2-(hidroksimetil)-1H-1,3-benzodiazol-1-il]acetil}benzen-1-sulfonamidą
RBD-590	5-[2,4-dihidroksi-5-(propan-2-il)fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-tionas
E11-16	4-{2-[(5-butilpirimidin-2-il)sulfanil]acetil}-2-chlorobenzen-1-sulfonamidą
VD12-14	2-(ciklooktilamino)-3,5,6-trifluoro-4-{[2-(4-hidroksifenil)etil]amino}benzen-1-sulfonamidą
EA8-3	4-chloro-2-(cikloheksilsulfanil)-N-(2-metoksietil)-5-sulfamoilbenzamidą
VR16-1	2-(4-{[2-(butilkarbamoil)-5-chloro-4-sulfamoilfenil]sulfanil}fenil)acto rūgštis
VD10-16	4-(benzilamino)-2,3,5,6-tetrafluorobenzen-1-sulfonamidą

<b>Kodas</b>	<b>Junginio pavadinimas</b>
VD12-11	2,3,5-trifluoro-6-[[1R,2S)-2-hidroksi-1,2-difeniletil]amino]-4-[(2-hidroksiethyl)sulfanil]benzen-1-sulfonamidas
E14	5-[2-(2-butyl-1H-1,3-benzodiazol-1-il)acetil]-2-chlorobenzen-1-sulfonamidas
AZ15-9	5-[2-(1H-1,3-benzodiazol-1-il)acetil]-2,4-dichlorobenzen-1-sulfonamidas
AV19-55	2-((2-(ciklooktilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)ethyl propionatas
JA18-12	6-chloro-1-ciklododecil-benzimidazol-5-sulfonamidas
E11-35	3-[2-(6,7-dihidro-1H-[1,4]dioksino[2,3-f]benzimidazol-2-ilsulfanil)acetil]benzenesulfonamidas
EA4-2o	2-(benzensulfonil)-4-chloro-N-(3-hidroksipropil)-5-sulfamoilbenzamidazidas
EC9	(3-nitro-4-chinolil)hidrazinas
E11-27	3-{2-[(4-tert-butyl-6-okso-1,6-dihidropirimidin-2-il)sulfanil]acetil}benzen-1-sulfonamidas
JA16-9-26	N-[2-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoyl-phenyl)sulfonylethyl]acetamide
E33	5-{2-[(5-benzil-4-metil-6-okso-1,6-dihidropirimidin-2-il)sulfanil]acetil}-2-chlorobenzen-1-sulfonamidas
E11-20	4-{2-[(5-benzil-4-metil-6-okso-1,6-dihidropirimidin-2-il)sulfanil]acetil}-2-chlorobenzen-1-sulfonamidas
E11-23	Etil-6-okso-2-[[2-okso-2-(3-sulfamoilfenil)etil]sulfanil]-1,6-dihidropirimidin-5-karboxilatas
E56	2-chloro-5-[(benzimidazo[1,2-c][1,2,3]tiadiazol-3-ilsulfanil)acetil]benzensulfonamidas
E69	4-[(benzimidazo[1,2-c][1,2,3]tiadiazol-3-ilsulfanil)acetil]benzensulfonamidas