



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

Kamilė Mikalaukaitė

Farmacinės chemijos
Magistro baigiamasis darbas

**AMILOIDOFILINIŲ MOLEKULIŲ SĄVEIKOS SU
AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ PAVIRŠIUMI TYRIMAS**

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas Smirnovas

Darbo konsultantas:

Mantas Žiaunys

Vilnius, 2021

Turinys

Santrumpos	4
Įvadas.....	5
1. Literatūros apžvalga	6
1.1. Amiloidiniai baltymai ir jų atradimo istorija	6
1.2. Insulinas	7
1.3. Lizocimas	9
1.4. Prioniniai baltymai.....	10
1.5. Alfa-sinukleinas	12
1.6. Amiloidozės	14
1.7. Baltymų agregacija	15
1.8. Tioflavinas-T.....	16
1.9. Kongo raudonasis.....	18
1.10. ANS.....	19
1.11. Dapoksilas	20
1.12. Metileno mėlis.....	21
2. Medžiagos ir metodai	23
2.1. Laboratorinė įranga.....	23
2.2. Medžiagos	23
2.3. Buferiniai tirpalai	23
2.4. Metodai	24
2.4.1. Amilodinių fibrilių paruošimas	24
2.4.2. Dažų tirpalų paruošimas	26
2.4.3. Dažų sąveikos absorbcijos tyrimas.....	26
2.4.4. Prijungtų dažų koncentracijos nustatymas ir spektrų korekcija	26
2.4.5. Dažų sąveikos fluorescencijos tyrimas.....	27
2.4.6. Fibrilių su ThT ir CR titravimas	28
2.4.7. Joninės jėgos poveikio tyrimas.....	28
2.4.8. Vidinio filtro korekcija ir EEM maksimumo pozicijos skaičiavimas	28
2.4.9. Furje-transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos tyrimas.....	29
3. Rezultatai.....	30
3.1. Dažų sąveikos absorbcijos tyrimas	30
3.2. Dažų sąveikos fluorescencijos tyrimas	43
3.3. ThT ir CR sąveikos tyrimas	47
3.4. Joninės jėgos poveikio tyrimas	50
Išvados	58

SANTRAUKA.....	59
SUMMARY.....	60
Literatūros sąrašas	61

Santrumpos

ANS – 1-anilinaftaleno-8-sulfonatas

A β – amiloidas β

AD – Alzheimerio liga

ATTR – Transtiretino agregacijos sukeliama amiloidozė

α -, β -, γ -syn – α -, β -, γ -sinukleinas

BMR – branduolių magnetinis rezonansas

CR – Kongo raudonasis

CNS – centrinė nervų sistema

Dap - dapoksilas

ER – endoplazminis tinklas

GPI – glikozilfosfatidilinozitolio inkaras

GuHCl – guanidino hidrochloridas

HEWL – vištos kiaušinio baltymo lizocimas

MB – metileno mėlis

NAC – „non-amyloid-beta“ komponentas

PrP^C – natyvus ląstelinis prioninis baltymas

PrP^{Sc} – patogeninis (Scrapie) prioninis baltymas

PRNP – prioninį baltymą koduojantis genas

PTM – posttransliacinė modifikacija

Scrapie – avių spongiforminė encefalopatija

SNCA – sinukleiną koduojantis genas

ThT – tioflavinas-T

Įvadas

Pirmieji amiloidinių baltymų agregacijos ir jų sukeltamų amiloidozių atvejai buvo pastebėti net XVII amžiuje, tačiau mokslininkams prireikė nemažai laiko, kad suprastų kas yra šių ligų sukėlėjas. Pačių baltymų agregacija amiloidinių fibrilių forma yra siejama su įvairiais sutrikimais, tame tarpe ir plačiai paplitusiomis neurodegeneracinėmis ligomis, kaip Alzheimerio, Parkinsono ligos ar transmissinės spongiforminės encefalopatijos. Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 30 baltymų, kurių agregacija sukelia ligas žinduoliuose.

Amiloidogeniniai baltymai yra grupė baltymų ar peptidų, kurie tarpusavyje skiriasi tiek dydžiais, tiek aminorūgščių sekomis, tačiau visi jie pasižymi polinkiu tam tikromis sąlygomis pakeisti savo konformaciją. Šių pokyčių metu baltymo struktūroje pradeda dominuoti ne α -spiralės, tačiau β -klostės. Tokiu būdu susidariusi baltymo forma tampa netirpi, dalinai atspari proteazėms ir linkusi formuoti amiloidines fibriles.

Norint ištirti agregacijos mechanizmus ar susidariusių agregatų struktūras, bei įvertinti kuriamų junginių slopinimo efektą, dažniausiai yra naudojami įvairūs amiloidofiliniai dažai. Vienas dažniausiai naudojamų fluorescencinių dažų šiems tyrimams yra tioflavinas-T, kuriam prisijungus prie susidariusių baltymų amiloidinių fibrilių paviršiaus yra stebimas fluorescencijos intensyvumo kvantinės išiegos padidėjimas. Toks efektas yra labai palankus stebėti baltymų agregacijos kinetiką ir įvertinti slopinklių veikimą. Be ThT tyrimams taip pat naudojami ir kiti dažai, kaip Kongo raudonasis, metileno mėlis, dapoksilas ar ANS. Todėl šiame darbe buvo norima įvertinti ar tyrimuose yra galimas dviejų dažų naudojimas vienu metu ir ar yra stebimos jų tarpusavio sąveikos, kurios gali nulemti gaunamus rezultatus, bei kaip aplinkos sąlygos gali pakeisti vieno dažniausiai naudojamo dažo ThT sąveiką su amiloidinėmis fibrilėmis.

Darbo tikslas – ištirti penkių amiloidofilinių molekulių ir jų kombinacijų sąveiką su amiloidinėmis fibrilėmis, bei joninės jėgos įtaką tioflavino-T jungimuisi prie agregatų paviršiaus.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti kaip amiloidofilinės molekulės sąveikauja tarpusavyje ir su amiloidinėmis fibrilėmis.
2. Ištirti kokią įtaką šios molekulės daro viena kitos spektrinėms savybėms joms esant ant amiloidinių fibrilių paviršiaus.
3. Nustatyti joninės jėgos įtaką tioflavino-T jungimuisi prie fibrilių ir jo fluorescencijos emisijos intensyvumui.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Amiloidiniai baltymai ir jų atradimo istorija

Amiloidiniai baltymai yra grupė viduląstelinių arba ekstraląstelinių peptidų ir baltymų, kurie tarpusavyje yra nepanašūs nei savo dydžiais ar aminorūgščių sekomis ir randami beveik visuose gyvuosiuose organizmuose, tame tarpe bakterijose, grybuose, bestuburiuose ir žinduoliuose, atliekantys gyvybiškai svarbią funkciją arba kaip patogenai ¹. Tačiau šie baltymai panašūs tuo, kad tam tikrose sąlygose jie keičia savo natyvią konformaciją, blogai susilanksto ir sudaro netirpias ir atsparias proteazėms fibrilines struktūras, kuriose gausu β -klosčių. Tokie baltymų ar peptidų agregatai yra vadinami amiloidais, kurie yra siejami su grupe neišgydomų ligų – amiloidozių ². Pats terminas amiloidas reiškia „panašus į krakmolą“ („starch-like“) ir yra dviejų žodžių darinys iš lotynų kalbos žodžio „amylum“ ir graikų kalbos žodžio „amylon“, reiškiančio krakmolą. Šis terminas pirmiausia buvo pristatytas 1838 metais M. Shleiden, tačiau jis tuomet kalbėjo apie krakmolo sankaupas randamas augalų ląstelėse ³.

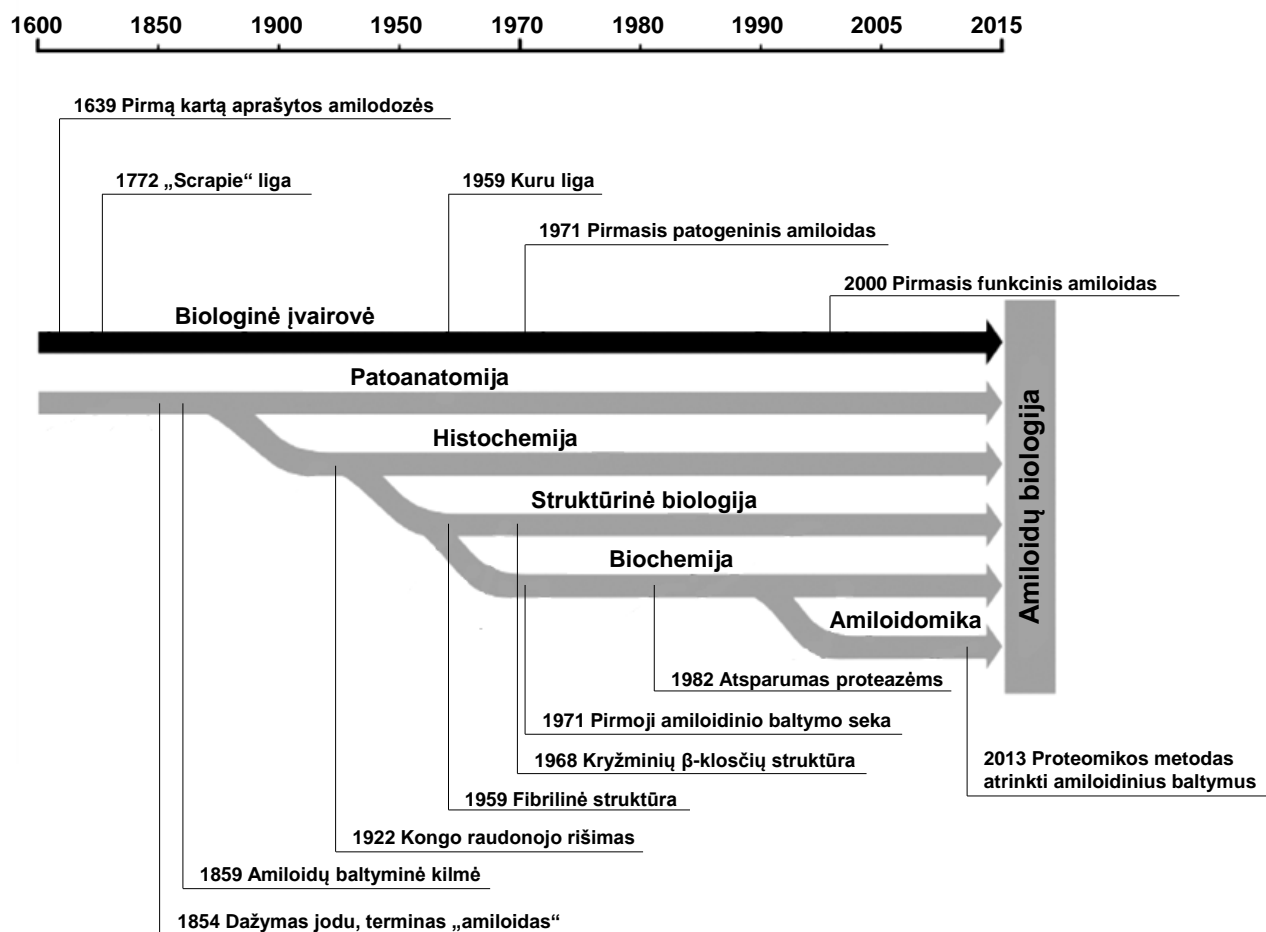
Pati amiloidų atradimo istorija prasideda net XVII amžiuje, kuomet gydytojas ir dramaturgas Nicolao Fontano (tikroji pavardė Fonteyn) atliekant paauglės autopsiją pastebėjo, jog jos blužnis buvo padidėjusi ir pilna baltos medžiagos sankaupų. Kiek vėliau jis šį reiškinį vėl pastebėjo atliekant moters autopsiją, tačiau šį kartą blužnis buvo labai pakitusi, jog gydytojas susidūrė su sunkumais ją pašalinant peiliu, rašoma, kad netgi buvo girdimas panašus į medžio pjovimo garsas ⁴. Šiuos amiloidozių atvejus Fontano 1639 metais aprašė savo knygoje ir manoma, kad tai yra pirmasis šaltinis, kuriame buvo paminėtos organų paveikiančios amiloidozės ⁵.

Pirmoji išsamiai aprašyta amiloidozė yra Scrapie liga. Ji buvo atrasta Anglijoje, kuomet buvo pastebėtas kai kurių avių keistas elgesys, pasikeitė eisena, atsirado niežulys ir jos ėmė kasytis į tvoras, dėl ko ir kilo ligos pavadinimas „Scrapie“ (nuo žodžio scrape – kasyti) ⁶. Tačiau kas šią ligą sukelia nebuvo aišku iki 1967 metų, kuomet Griffith iškėlė hipotezę, jog ligos sukėlėjas yra save replikuojantis baltymas. Tiesa ši hipotezė („protein-only“) buvo įrodyta tik po 15 metų (1982 m.), kuomet Prusiner su kolegomis iš infekuoto žiurkėno smegenų išgrynino patogenines daleles ir pavadino jas prionais. Iki tol buvo manoma, kad Scrapie ligą sukelia parazitai, bakterijos ir galiausiai virusas, tačiau šios hipotezės buvo paneigtos ⁷.

Vėliau XIX amžiuje atliekant tyrimus buvo pastebėti agregatai ir kituose organuose, tame tarpe kepenyse ir pradėtas naudoti terminas „vaškinės kepenys“ kalbant apie organus, kuriuose buvo atrandama dar tuomet nežinomų medžiagų sankaupos, kurios nusidažo jodu panašiai kaip ir krakmolai, todėl buvo pavadinti amiloidais ⁸. Tai buvo amiloidų istorijos lūžio taškas, nuo kurio mokslininkai pradėjo aiškintis agregatų savybes ir atsiradimo organuose priežastis. 1959 metais Cohen ir Calkins atlikus elektroninės mikroskopijos tyrimus pastebėjo, kad amiloidai turi panašias mikroskopines struktūras charakteristikas, nepriklausomai nuo baltymo rūšies ir kad visų baltymų

agregatai yra sudaryti iš filamentų arba fibrilių. Filamentai yra linę jungtis tarpusavyje ir sudaryti fibriles. Yra trys galimi amiloidų organizacijos lygiai – protofilamentai, filamentai ir fibrilės ⁹. Svarbiausi agregatų atradimų istorijos įvykiai pavaizduoti 1.1. pav.

Šiuo metu daugiau nei 30 skirtingų amiloidogeninių baltymų yra siejami su įvairiomis žmonių ligomis. Amiloidų susidarymas yra siejamas su tokiais sutrikimais, pradedant nuo Alzheimerio ligos, kur susidarę agregatai yra lokalizuoti smegenyse iki II tipo cukrinio diabeto, kurio metu agregatai kaupiasi kasoje, be viso to agregatai yra randami ir kituose organuose kaip kepenys ar širdis ¹.



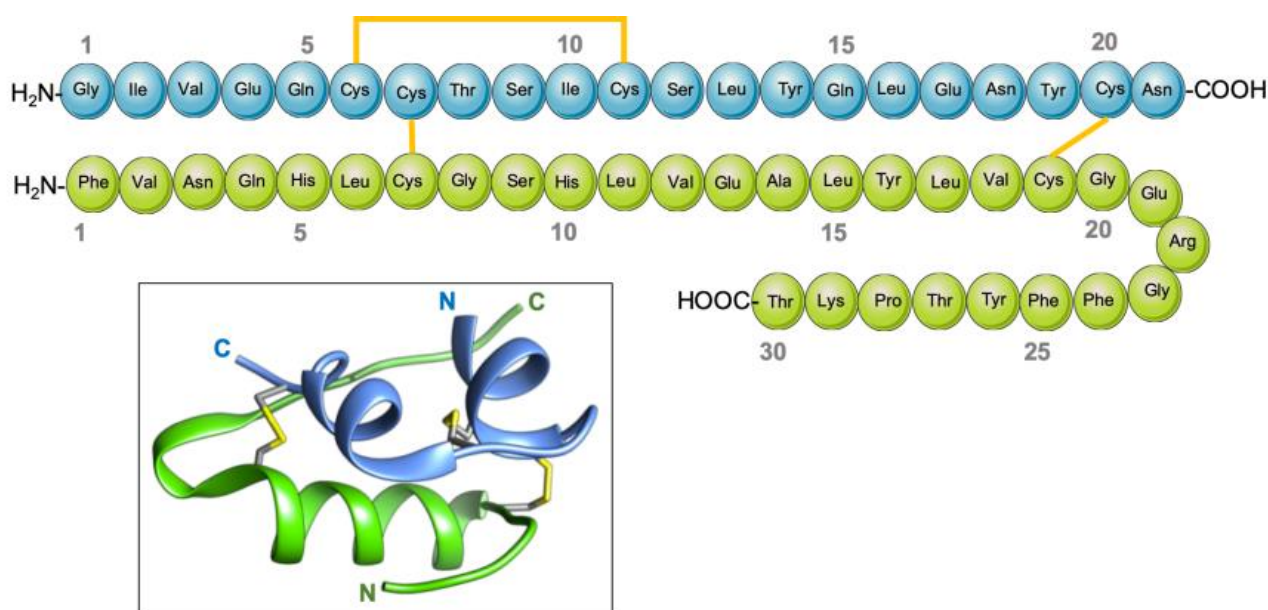
1.1. pav. Schema vaizduojanti pagrindinius atradimus amiloidų biologijoje. ²

1.2. Insulinas

Insulinas yra mažas polipeptidinis hormonas, sudarytas iš dviejų polipeptidinių grandinių, kurių antrinėje struktūroje dominuoja α -spiralės, baltymui esant natyvios formos ¹⁰. Insulinas kaip hormonas organizme atlieka svarbią reguliacinę funkciją karbohidratų, riebalų ir baltymų metabolizme ¹¹. Šio baltymo viena grandinė sudaryta iš 21 aminorūgšties, o antroji – 30. Jos tarpusavyje yra sujungtos dviem disulfidiniams tilteliais ir 1 disulfidinis tiltelis jungia dvi A grandinės pozicijas (6 ir 11 aminorūgštis) (1.2. pav.) ¹². Šis hormonas yra gaminamas kasos Langerhanso salelių β -ląstelėse, kur yra saugomas Zn^{2+} - turinčio heksamero forma ¹³. Jis yra sudarytas iš trijų insulino dimerų, laikomų kartu dviejų cinko jonų. Patekęs į kraują heksameras iš pradžių suyra į dimerus, o

vėliau į monomerus, neturinčius cinko jonų, nes tai yra vienintelė insulino forma galinti patekti į kraujotaką. Be to tai yra aktyvioji hormono forma, kuri jungiasi prie insulino receptorių ir atlieka savo pagrindinę funkciją – reguliuoja gliukozės kiekį kraujyje ¹⁴. Insulino heksamero kristalinę struktūrą D. C. Hodgkin nustatė 1969 metais ir gavo Nobelio premiją chemijos srityje ¹³.

Vis dėlto insulino globulinė struktūra gali būti pakeista į neaktyvią fibrilinę formą, esant dideliame sąlygų spektrui ¹⁵. Pats molekulinis mechanizmas, kaip šio baltymo konformacija yra keičiama į nenatyrvią formą, taip susidarant fibrilėms, dar nėra iki galo suprantas, o *in vitro* eksperimentai rodo, kad gali egzistuoti keli keliai ^{16,17}. Tačiau insulino heksamerų ir dimerų disociacija į monomerinę formą yra pagrindinis žingsnis, nes fibrilės susidaro greičiau, kai monomeras yra dominuojanti rūšis, ir susidarymas yra slopinamas esant kovalentiniam dimerui ¹⁸. Insulino fibrilių susidarymas buvo pradėtas tirti kuomet pastebėta, jog I ir II tipo cukrinio diabeto atvejais žmogui suleidus insulino atsiranda netirpių jo nuosėdų aplink injekcijos vietą ir tai buvo pavadinta lokalia injekcine amiloidoze. 1940 metais Waugh pirmasis aprašė insulino amiloidines fibriles ir apibūdino nukleacijos ir elongacijos procesus¹⁹. Insulino amiloidai, panašiai kaip ir kitos amiloidinės fibrilės, pasižymi tipinėmis struktūrinėmis savybėmis, įskaitant skersmenį 8–13 nm diapazone ir ilgį iki kelių mikrometrų ¹⁵. Susidariusios fibrilės yra neišsišakojusios ir pasižymi kryžminių β-klosčių struktūra. Įdomi insulino savybė yra ta, kad trys jo disulfidiniai tilteliai yra išlaikomi *in vitro* ir *ex vivo* baltymo fibrilinėse formose ²⁰. Tokiu būdu šios jungtys turi apriboti galimus konformacinius pokyčius α-spiralėms pereinant į β-klosčių struktūrą. Be viso to *in vitro* tyrimai parodė, jog insulino fibrilės yra citotoksiškos ir kraujyje sąveikauja su eritrocitais, taip paveikiant gliukozės reguliaciją ir hiperglikemijos ar hipoglikemijos eigą ²¹.



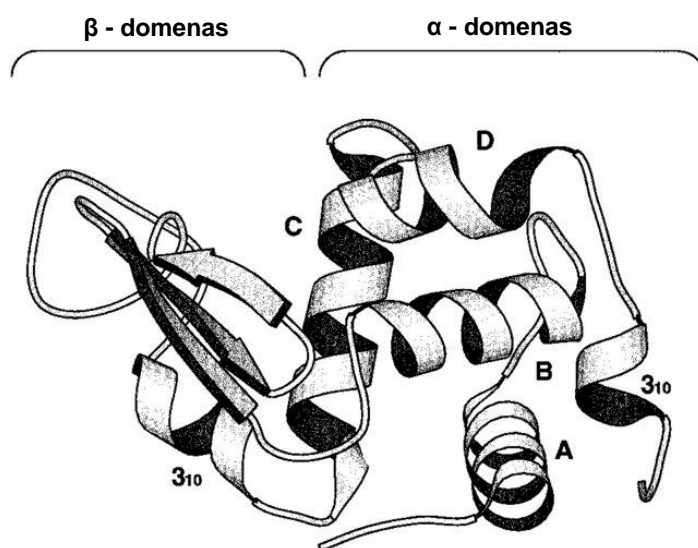
1.2. pav. Insulino grandinių aminorūgščių sekos ir baltymo struktūra. Ji sudaryta iš dviejų grandinių (A - mėlyna ir B - žalia), geltoni ryšiai rodo struktūroje susidarantiems disulfidiniams tilteliams. (pagal PDB ID: 1trz)

1.3. Lizocimas

Vištos kiaušinio baltymo lizocimas (HEWL) yra mažas globulinis fermentas, kuris dažnai yra naudojamas kaip modelinė sistema amiloidinių fibrilių susidarymo tyrimams²². Visgi pirmiausia buvo atrastas žmogaus lizocimas, kurį atrado ir suteikė jam pavadinimą Aleksandras Flemingas 1922 metais. Jis pastebėjo, gydant peršalimu sergantį pacientą, jog nosies gleivinėje yra medžiagos, kuri gali sunaikinti tam tikras bakterijas²³. Taip pat buvo nustatyta, jog šios medžiagos yra randama ir kituose kūno skysčiuose, tame tarpe ir ašarose, seilėse, kraujo serume. Be žmogaus audinių, gausus šio fermento šaltinis yra kiaušinio baltymas²².

Buvo pastebėta, kad įvairios mutacijos ir žmogaus lizocimo variantai yra susiję su paveldimais sisteminės amiloidozės atvejais ir pacientų inkstuose, kepenyse, blužnyje, limfmazgiuose ar virškinamajame trakte randamos amiloidinių agregatų sankaupos, nes šis baltymas esant tam tikroms sąlygoms yra linkęs agreguoti fibrilių forma²⁴. Dėl šios priežasties buvo pradėti aiškintis lizocimo agregacijos mechanizmai ir sąlygos. Kadangi žmogaus lizocimo variantai, kurie yra susiję su amiloidozėmis, ir vištos kiaušinio baltymo lizocimas yra ortologai ir pasižymi panašia seka, tyrimams buvo pradėta naudoti ši analogą^{25,26}.

Vištos kiaušinio baltymo lizocimas yra sudarytas iš vienos polipeptidinės grandinės (129 aminorūgštys, 14,3 kDa)²⁷. Šis baltymas panašiai kaip ir žmogaus analogo atveju yra sudarytas iš dviejų domenų – α ir β , kurie yra sujungti keturiais disulfidiniais tilteliais. α domenas turi keturias α -spirales, o β domene yra antiparalelinė β -klosčių struktūra (1.3. pav.)²⁶. Be viso to šio baltymo izoelektrinis taškas yra arti 11,3, o tai reiškia, jog jis gerai tirpsta vandenyje. Kaip fermentas lizocimas katalizuoja β -1,4 glikozidinio ryšio hidrolizę tarp N-acetilmuramo rūgšties ir N-acetilgliukozamino, kuris yra Gram-teigiamų bakterijų sienelių peptidoglikane. Šio fermento kristalinė struktūra buvo nustatyta 1965 metais²⁵.

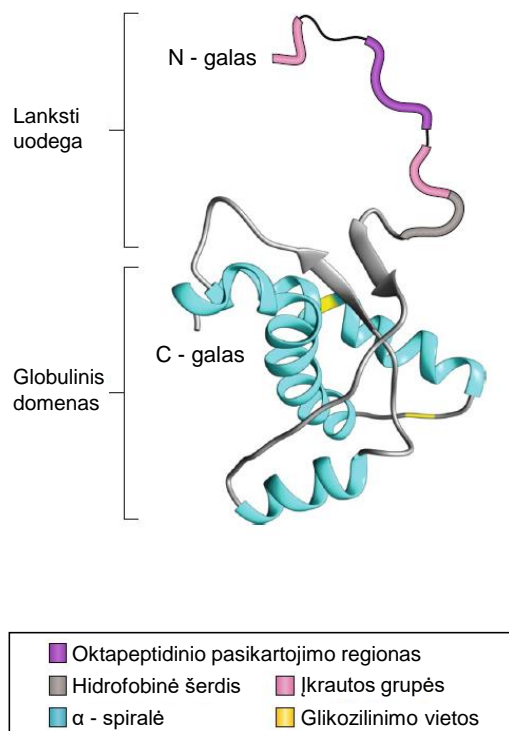


1.3. pav. Vištos kiaušinio baltymo lizocimo struktūra. Sudaryta iš dviejų domenų (α ir β). A-D raidėmis pažymėtos keturios α -spiralės.²⁸

Atliekant šio lizocimo agregacijos tyrimus buvo pastebėta, jog didinant temperatūrą ir esant rūgštinėms sąlygoms, baltymas lengvai keičia savo konformaciją ir įgauna amiloidinių fibrilių struktūrą²⁹. Be to, kitų tyrimų pagalba buvo parodyta, jog vištos kiaušinio baltymo lizocimas yra taip pat linkęs agreguoti esant koncentruotiems etanolio arba guanidino hidroklorido tirpalams, bei baltymo mėginius inkubuojant stipraus maišymo sąlygomis³⁰. Tai yra viena iš priežasčių kodėl šis fermentas yra puikus modelinis baltymas, norint tirti agregacijos mechanizmus ir charakterizuoti tarpinius amiloidų darinius²⁶.

1.4. Prioniniai baltymai

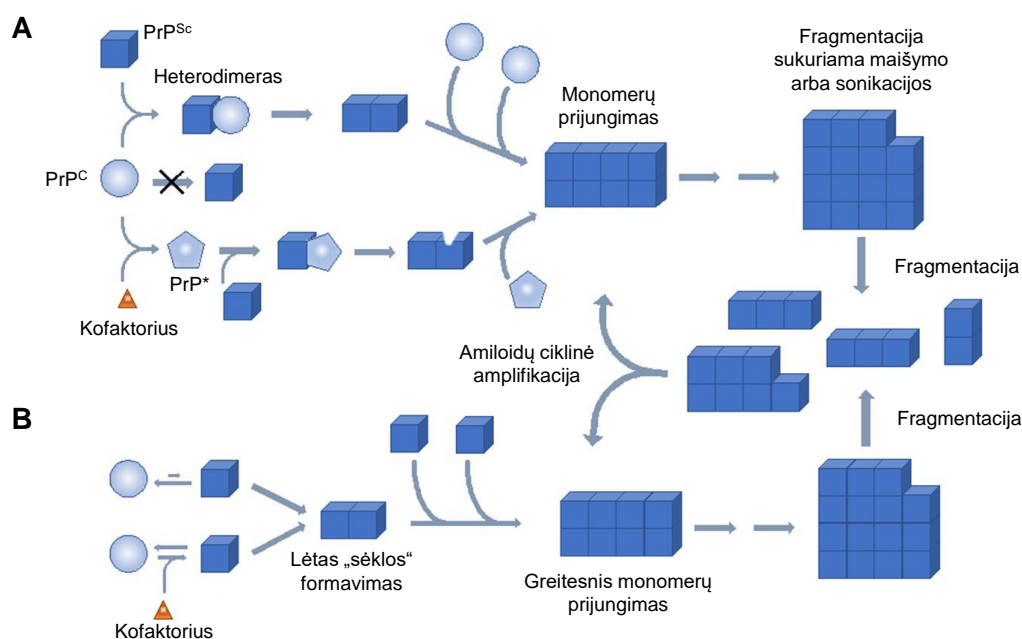
Ląsteliai prioniniai baltymai (PrP^C) yra glikoproteinai, turintys glikozilfosfatidilinozitolio (GPI) inkarą, per kurį prisijungia prie ląstelės membranos³¹. Šie baltymai yra koduojami PRNP geno, žmogaus organizme lokalizuoto 20 chromosomoje ir yra labai konservatyvūs tarp žinduolių rūšių³². Natyvios PrP^C baltymo konformacijos pokyčiai į nenatyrivą PrP^{Sc} formą yra siejami su neurodegeneracinėmis ligomis, dar vadinamomis transmissinėmis spongiforminėmis encefalopatijomis³³. Daugiausia šio baltymo yra sintetinama centrinėje nervų sistemoje (CNS), tačiau mažesniais kiekiais yra randami ir kituose organuose³⁴. Žinduolių PrP^C iš pradžių yra sintetinamas kaip polipeptidas, sudarytas iš maždaug 250 aminorūgščių, kur tiek C-, tiek N- gale yra signalinės sekos. Pirmiausia yra pašalinama N- gale esanti signalinė seka, o tuomet - C- galo seka ir toje vietoje prikabinamas GPI inkaras³⁴. Nestruktūrizuota baltymo N- galo uodega susideda iš dviejų hidrofiliųjų regionų ir pasikartojančio oktapeptido regiono³⁵. Hidrofobinė šerdis jungia lanksčią uodegą su baltymo C- gale esančia globuline dalimi. Šiame domene yra trys α -spiralinės ir dvi trumpos antiparalelinės β -klostės^{36,37}. Be viso to, baltymas globulinėje dalyje turi dvi glikozilinimo vietas ir vidinį disulfidinį tiltelį ir visos šios savybės yra būdingos tiek fiziologinės, tiek patologinės formos baltymui (1.4. pav.)³⁶. Yra manoma, kad prioninis baltymas turi bent kelias galimas funkcijas, tai yra signalinių kelių, svarbių ląstelės išgyvenimui, moduliavimas, apsauga nuo oksidacinio streso ar vario jonų jungimas³⁸. Tačiau atlikus bandymus su pelėmis, kuomet buvo išjungiamas PrP^C koduojantis genas, didelių pakitimų nebuvo pastebėta. Pelės buvo gyvybingos, vaisingos ir baltymą koduojančio geno išjungimas neparodė sukeltos didelės žalos organizmui. Todėl kokia yra tikroji natyvaus PrP^C funkcija – neaišku^{39,40}.



1.4. pav. Prioninio baltymo struktūra, sudaryta iš dviejų domenu (globulės ir lanksčios uodegos). Skirtingomis spalvomis pažymėtos struktūros dalys. ⁴¹

Infektyvi PrP^{Sc} forma yra charakterizuojama trimis pagrindinėmis savybėmis, tai yra daliniu atsparumu proteazėms, netirpumu ir dideliu β-klosčių kiekiu baltymo struktūroje (43 proc. β-klosčių) ⁸. Priešingai nei patogeninė baltymo forma, PrP^C struktūroje dominuoja α-spiralės (42 proc.), o β-klosčių sutinkama mažai (3 proc.). Be to jis yra tirpus ir labai jautrus proteazių veikimui ⁴². Visgi kokių mechanizmu natyvi baltymo forma PrP^C keičia savo konformaciją ir tampa infektyviu PrP^{Sc} dar nėra žinoma. Dar ankstyvųjų tyrimų metu buvo iškelta prionų hipotezė, kuri teigia, kad infektyvi PrP^{Sc} forma veikia kaip šablonas, kuris inicijuoja natyvios baltymo formos išsilankstymą ir patogeninės formos susidarymą ⁴³. Vėliau atliktų eksperimentų metu, naudojant iš sergančio žiurkėno smegenų izoliuotą PrP^{Sc} formą ir natyvų PrP^C, buvo gauti rezultatai patvirtinantys šią hipotezę ⁴⁴. Pagal juos buvo pateikti du agregacijos mechanizmai, kurių metu PrP^{Sc} tiesioginė arba netiesioginė fizinė sąveika su PrP^C sukelia konformacijos pokyčius. Vieno mechanizmo modelio atveju yra būtina tiesioginė sąveika tarp PrP^C ir PrP^{Sc} arba PrP*, kuri yra aktyvi tarpinė forma, susidariusi vykstant natyvios formos baltymo daliniam išsilankstymui (1.5. pav. A). Toliau pasikeitus baltymo konformacijai, susidaro polimeras, prie jo jungiasi natyvūs monomerai, taip ilgėjant struktūrai ir susidarant protofilamentams ir fibrilėms. Tačiau šis modelis neigia baltymo formos spontanių konformacijos pasikeitimą ⁴⁵. Toks reiškinys yra aprašomas antrojo agregacijos mechanizmo atveju, tačiau pasikeitimas yra energetiškai nepalankus procesas, kuris vyksta per ilgą laiką (1.5. pav. B). Pasikeitus baltymo konformacijai PrP^{Sc} sudaro polimerą, dar vadinamą „sėkla“, prie kurio toliau jungiasi PrP^{Sc} monomerai, taip ilgėjant grandinei. Kadangi šios reakcijos energijos barjeras yra

mažesnis, todėl reakcija vyksta greičiau ³⁴. Visgi abiejų modelių metu yra galima susidariusių agregatų fragmentacija arba paviršiaus-katalizuojama antrinė nukleacija, dėl ko atsiranda daugiau agregacijos centrų, prie kurių gali jungtis baltymo monomerai, taip išaugant agregacijos greičiui ⁴⁶.



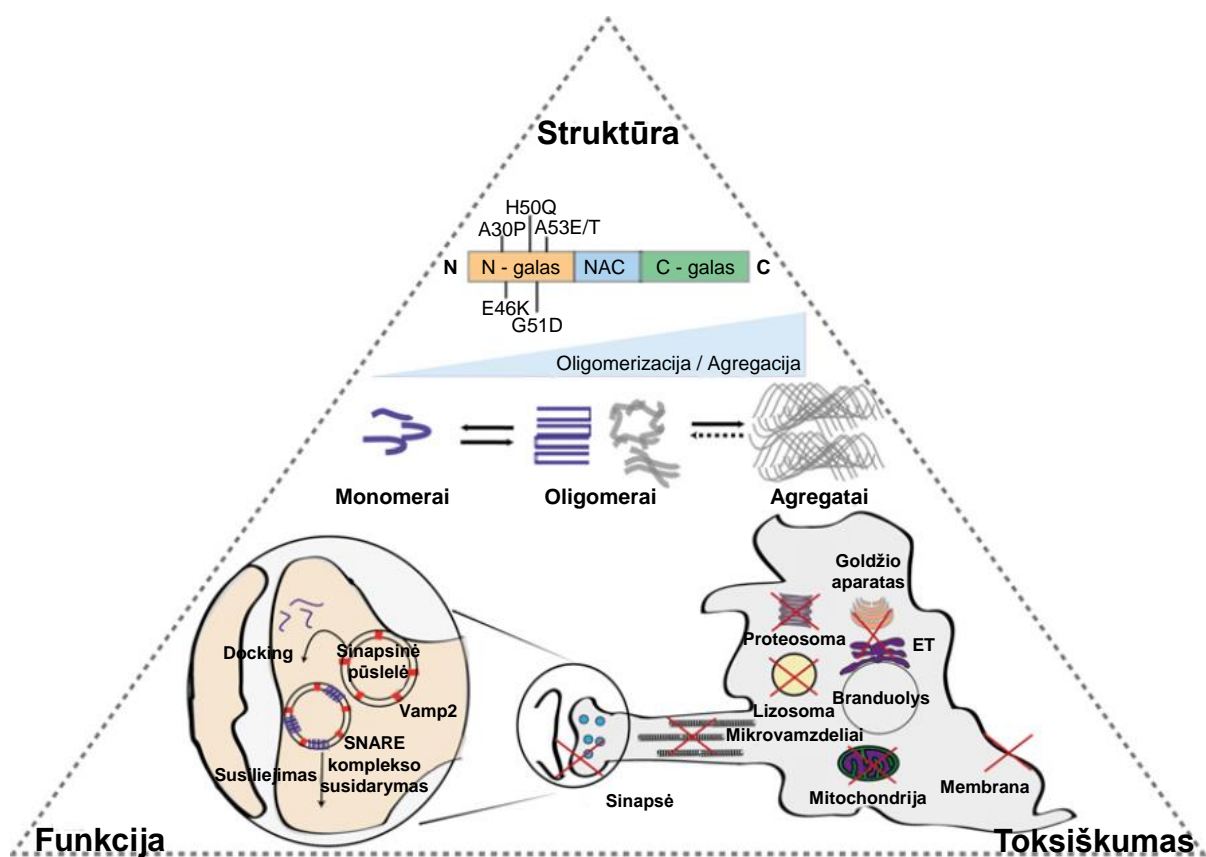
1.5. pav. Prioninių baltymų agregacijos mechanizmai. A. Agregacijos mechanizmas, kuris parodo, jog yra negalimas spontaninis PrP^C konformacijos pokytis į PrP^{Sc} formą. Tik patekęs į organizmą PrP^{Sc} sąveikauja su natyvos formos PrP^C arba tarpinės PrP*, taip keičiantis baltymo konformacijai. B. Agregacijos mechanizmas vaizduoja spontaninį procesą, kuomet natyvos formos PrP^C virsta į PrP^{Sc}. Abiejuose mechanizmuose yra galimas kofaktorių dalyvavimas ir stebima tolimesnė agregatų oligomerizacija. ⁴⁷

1.5. Alfa-sinukleinas

Alfa-sinukleinas yra baltymas, kuris priklauso sinukleino baltymų šeimai, randamai stuburiniuose gyvūnuose ⁴⁸. Šie baltymai pirmą kartą buvo atrasti 1988 metais, kuomet prancūzų kilmės mokslininkas Maroteaux tyrė Ramiojo vandenyno elektrinės rajužuvės cholinerginių neuronų branduolius ir sinapsines pūsleles ⁴⁹. Būtent dėl savo lokalizacijos baltymas ir buvo pavadintas sinukleinu („syn“ – nuo žodžio sinapsė, „nuclein“ – branduolys) ⁵⁰. Tačiau jis daugiau dėmesio sulaukė tik 1997 metais, kuomet buvo pastebėta, jog sinukleinas yra pagrindinis Lewy kūnelių ir neuritų komponentas, kurie yra kaip Parkinsono ligos ar demencijos su Lewy kūneliais žymuo ⁵¹.

Žmogaus α -sinukleinas yra mažas baltymas, kurio molekulinė masė siekia apie 14 kDa, sudarytas iš 140 aminorūgščių ir kurį koduoja SNCA genas, lokalizuotas 4 chromosomos ilgojo peties 21 pozicijoje ⁴⁹. Daugiausia šio baltymo yra sintetinama smegenyse, tačiau mažesniais kiekiais aptinkama ir kituose organuose. Be α -sinukleino yra identifikuoti ir kiti du sinukleinų šeimos nariai – β -syn, γ -syn. β -sinukleinas yra žmogaus baltymo homologas galvijų organizme, sudarytas iš 134 aminorūgščių, o γ -sinukleinas, sudarytas iš 127 aminorūgščių, randamas periferinėje nervų sistemoje ir yra homologiškas tiek α -, tiek β - sinukleinams ⁵². Visi šios baltymų šeimos nariai turi panašią

struktūrą, N- gale yra aptinkami konservatyvūs sekos (KTKEGV) pasikartojimai ir susidariusios α -spiralės. Toliau aptinkamas centrinis domenas, dar vadinamas „non-amyloid-beta“ komponentu (NAC), kuris yra hidrofobiškas ir agregacijos metu linkęs struktūrą pakeisti į β -klostes. Baltymo C-galo domene dominuoja neigiamai įkrautos aminorūgščių liekanos ir prolinas, dėl ko ši dalis suteikia baltymui lankstumo ⁵³. Šis baltymas yra linkęs tolimesnėms posttransliacinėms modifikacijoms (PTM), tokioms kaip fosforilinimas, oksidacija, acetilinimas, glikozilinimas ir kt., taip pakeičiant baltymo krūvį ir struktūrą, dėl ko gali pasikeisti jungimosi prie kitų baltymų ar lipidų afiniškumas. Daugiausiai ištirta PTM yra fosforilinimas, nes ši modifikacija yra sutinkama su sinukleinu susijusių ligų atvejais ⁵⁴.



1.6. pav. Alfa-sinukleino struktūros, funkcijos ir toksiškumo trikampis. Struktūroje pažymėti su sinukleopatijomis susiję 5 aminorūgščių pasikeitimai, atsirandantys dėl taškinių mutacijų. Manoma, kad šis baltymas dalyvauja sinapsinių pūslelių pernešimo procese. O šio baltymo agregacija gali turėti žalingą poveikį įvairių organelių veikimui. ⁵¹

Kokia yra tiksli fiziologinė α -sinukleino funkcija kol kas nežinoma, tačiau buvo iškelta hipotezė, kad jis gali būti atsakingas dėl sinapsinių pūslelių judėjimo sinapsiniame plyšyje, nes didžiausi šio baltymo kiekiai yra randami pre-sinapsiniuose neuronų galuose ⁵⁵. Bandyuose su pelėmis, kuomet buvo išjungiamas α -sinukleiną koduojantis genas, rezultatai parodė, jog ši hipotezė gali būti teisinga. Be to šių bandymų metu buvo pastebėtas ir padidėjęs išskiriamas dopamino kiekis, veikiant elektriniais dirgikliais, todėl buvo padaryta išvada, kad α -sinukleinas gali turėti įtakos neurotransmisijai ⁵⁶.

α -sinukleinas fiziologiniame pH yra nestruktūrizuotas, todėl tyrimai *in vitro* parodė, jog inkubuojant šį baltymą ilgesnį laiką, jis pakeičia savo struktūrą ir susidaro agregatai, kurių struktūroje dominuoja β - klostės. Ankstyvajame agregacijos etape baltymas yra dalinai susilanksčiusios formos, todėl tai yra esminis agregacijos faktorius ⁵⁵. BMR tyrimai rodo, jog α -sinukleino fibrilių šerdis sudaryta pagrindu nuo 30 iki 110 aminorūgščių liekanų, į kurią patenka NAC regionas ir dalis baltymo N- galo ⁵¹.

1.6. Amiloidozės

Amiloidozes sukelia neteisingas baltymų susilankstymas ir jų agregacija į fibriles. Amiloidų susikaupimas yra lokalizuotas (t.y. fibrilės susidaro ir apsiriboja 1 organu ar kūno vieta) arba sisteminės (t.y. fibriliniai agregatai kaupiasi įvairiuose kūno organuose ir audiniuose) ⁵⁷. Dabartinė amiloidozių klasifikacija remiasi pirmtako baltymo chemine charakteristika. Organams būdinga lokalizuota amiloidozė gali būti nustatyta sergant Alzheimerio liga ($A\beta$ -peptidas plokštelėse) ir II tipo cukriniu diabetu (amilinas Langerhanso salelėse) ⁵⁸.

Mazginiai lokalizuoti amiloidai yra atsitiktinai atrandami odoje, akių vokuose, krūtyse, gerklose, plaučiuose ir kituose organuose. Kolkas tokių amiloidozių gydymo būdų atrasta nėra, vienintelis šalinimo būdas yra chirurginiu būdu, tačiau šie agregatų raizginiai yra linkę po pašalinimo atsinaujinti ir yra reikalinga pakartotinė chirurginė procedūra ⁶. Priešingai nei lokalizuotų atveju, sisteminės amiloidozės pasireiškia rimtais požymiais ir simptomais, kuriuos sukelia organuose ir audiniuose progresuojanti liga. Be šios klasifikacijos amiloidozės taip pats skirstomos į paveldimas, bei įgytas. 1.1. lentelėje pažymėta keletas amiloidozių pavyzdžių.

1.1. lentelė. Amiloidozių pavyzdžiai ir skirstymas pagal paveikiamus organus, bei paveldimumą. ⁵⁷

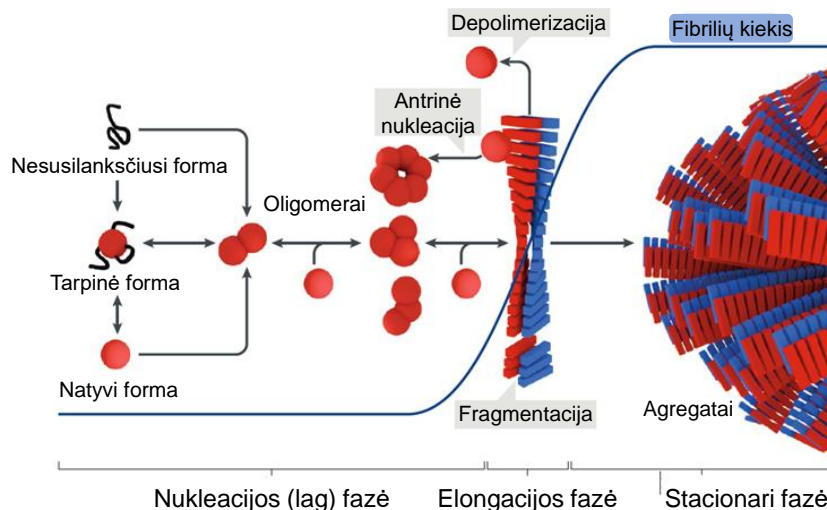
Fibrilinis baltymas	Baltymas pirmtakas	Sisteminė (S) ar lokalizuota (L)	Įgyta (I) ar paveldima (P)	Paveikiami organai
ATTR	Transtiretinas	S	P	Širdis, periferinė ir autonominė nervų sistemos
ALys	Lizocimas	S	P	Inkstai
A β	A β peptidas	L	I	CNS
APrP	Prioninis baltymas	L	I	CNS
AA	(Apo) serumo amiloidas A	S	I	Visi organai, išskyrus CNS
AGel	Gelsolinas	S	P	Periferinė nervų sistema, inkstai, širdis
A β 2M	β_2 mikroglobulinas	S	P	Autonominė nervų sistema

Atlikus vyresnių žmonių autopsijas, buvo pastebėta, kad maždaug 70 proc. mirties atvejų yra susiję su ATTR⁵⁸. Be to, neurodegeneracinės ligos, tokios kaip Alzheimerio, Parkinsono ir Hantingtono ligos, bei amiotrofinė lateralinė sklerozė, kurių pagrindinis požymis yra netinkamai susilanksčiusių baltymų sankaupos, yra susijusios su amžiumi ir dažniau sutinkamos vyresnio amžiaus žmonių grupėse⁵⁷.

1.7. Baltymų agregacija

Amiloidų susidarymas yra nuo nukleacijos priklausoma polimerizacijos reakcija. Tokio tipo reakcijos prasideda nuo pradinės lag fazės, kuomet iš monomerinio baltymo susidaro agregacijos branduoliai ir tai yra reakcijos greitį limituojanti reakcija, nes natyvos ar dalinai susilanksčiusios formos baltymui ar peptidui pakeisti konformaciją į β -klosčių struktūrą yra termodinamiškai nepalanki reakcija (1.7. pav.)⁵⁹. Toliau po šios stadijos vyksta elongacijos fazė. Ji prasideda kuomet yra susidarę kritinio dydžio branduoliai, todėl galimas tolimesnis monomerų jungimasis prie susidariusių branduolių⁶⁰. Ši reakcija yra palanki, nes susidariusių fibrilių termodinaminis stabilumas yra didesnis lyginant su nestabiliu/išsilanksčiosiu natyviu baltymu²². Šios stadijos metu vyksta šablono inicijuotas konformacijos pokytis. Reakcija baigiasi įsotinimu (plateau), kuomet fibrilės nebeilgėja ir yra pasiekiamas pusiausvyra tarp agregatų ir monomerų⁶¹. Elongacijos fazės metu taip pat vyksta ir antriniai agregacijos procesai – fragmentacija, kuomet fibrilės lūžinėja į mažesnes dalis, susidaro daugiau naujų fibrilių galų arba vyksta fibrilių paviršiaus katalizuojama antrinė nukleacija, kai monomerai agreguoja ant fibrilių paviršiaus, tokiu būdu padidinant reakcijos greitį⁶².

Vykstant spontaninei baltymo agregacijai yra stebima sigmoidinės formos fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko⁵⁹. Taip pat yra galima ir „sėklos“ inicijuota agregacija. Jos metu mėginyje jau yra susidariusių agregatų, kurie dažnai yra skaldomi ultragarsu, tam kad reakcija vyktų greičiau ir mėginyje būtų daugiau nukleacijos branduolių. Tokiu būdu yra labai sutrumpinama lag fazė ir fibrilių koncentracijos priklausomybė nuo laiko tampa eksponentės formos²².



1.7. pav. Amiloidinių agregatų formavimo schema. Ji parodo, kaip natyvos formos baltymas oligomerizuojasi, sudaro agregacijos branduolius ir amiloidines fibriles ir kaip keičiasi fibrilių kiekis, priklausomai nuo agregacijos fazės (mėlyna kreivė).⁸

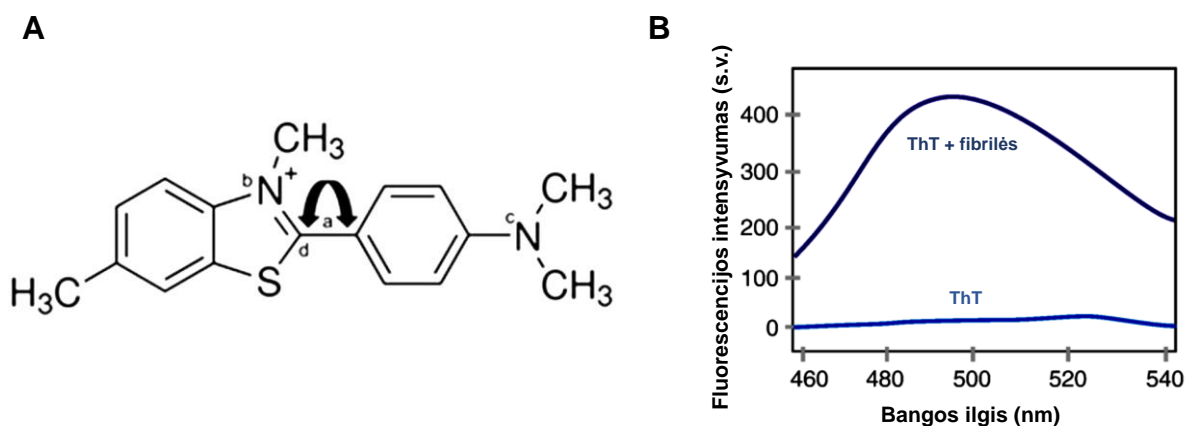
Amiloidinių fibrilių formavimas yra kompleksiškas procesas, kuris priklauso nuo baltymo rūšies, t.y. aminorūgščių sekos, tačiau didelę poveikį turi ir aplinkos faktoriai. Net mažiausi aplinkos sąlygų pokyčiai gali turėti įtakos visoms agregacijos stadijoms, taip pasikeičiant agregacijos mechanizmui ir susidarančių amiloidinių fibrilių struktūrai⁶³. Manoma, kad toks konformacinis pasikeitimas, dar vadinamas polimorfizmu, yra bendra savybė visiems amiloidiniams baltymams, kuri gali nulemti ir skirtingus ligos fenotipus⁶⁴. Tyrimai rodo, jog dėl aplinkos temperatūros, tirpalo pH, joninės jėgos, baltymo koncentracijos ir purtymo būdo gali pasikeisti susidariusių amiloidinių fibrilių stabilumas ar savireplikacijos greitis⁶³. Be to aplinkos sąlygų pokyčiai taip pat gali turėti įtakos ir tiriamų agregacijos slopiklių efektyvumui⁶⁵.

1.8. Tioflavinas-T

Benzotiazolo dažo tioflavino-T (ThT) fluorescencijos intensyvumo tyrimas yra vienas dažniausiai naudojamų metodų, tirti amiloidinių fibrilių, kurios yra Alzheimerio, Parkinsono ligų ar kitų amiloidozijų žymuo, susidarymą. Pagrindinis ThT privalumas yra šio fluorescencinio dažo specifiskumas amiloidinių baltymų agregatams⁶⁶. Yra manoma, jog šis dažas beveik nesąveikauja su baltymais, kurie yra natyvos formos, nesusilankstę ar dalinai susilankščiusios būsenos, bei su amorfiniais agregatais ar baltymų oligomerais⁶⁷. Nepaisant to, jog naujausi tyrimai parodė, jog pasitaiko keletas išimčių iš šios taisyklės (nustatyta, kad ThT jungiasi su acetilcholinesteraze, serumo albuminiais ir net α -spiraline poli (L-glutamato rūgštimi)), tačiau tik sąveikaujant šiam dažui su amiloidinėmis fibrilėmis yra stebimas labai stiprus (dešimtis tūkstančių kartų) fluorescencijos kvantinės išeigos padidėjimas, lyginant fluorescencijos intensyvumą, kuomet dažas yra neprisijungęs prie agregatų vandeniniame tirpale⁶⁸. Tioflavinas-T, dar žinomas kaip „Basic Yellow 1” ar CI 49005,

yra gaunamas metilinant dehidrotiotoluidiną metanolyje, esant druskos arba sieros rūgštims, 160-170 °C temperatūrai ir slėgiui ⁶⁰. Pirmieji šio dažo panaudojimą amiloidinių agregatų susidarymo tyrimui histologiniuose mėginiuose 1959 metais parodė Vassar ir Culling ⁶⁷. Po trisdešimties metų Naiki su kolegomis pirmieji kiekybiškai įvertino amiloidinių fibrilių susidarymą *in vitro*, spektrofotometriniu būdu nustatė ThT fluorescencijos emisiją ir pastebėjo tiesioginę fluorescencijos emisijos priklausomybę nuo fibrilių koncentracijos. Nuo to laiko ThT tapo vienu plačiausiai naudojamų „aukso standartų“ selektyviai nustatant ir analizuojant fibrilių susidarymą tiek *in vivo*, tiek *in vitro* ⁶⁸.

Tioflavinas-T susideda iš dimetilinto benzotiazolo žiedo, sujungto su dimetilamino benzilo žiedu per vieną C – C ryšį (a), kuris leidžia dviem žiedams pasisukti vienas kito atžvilgiu. Kiti svarbūs ThT struktūros bruožai yra teigiamas krūvis benzotiazolo žiede (b), tretinė dimetilamino grupė ant benzilo žiedo (c) ir reaktyvioji anglis benzotiazolo žiede, jungiančiame su benzilo žiedu (d) (1.8. pav. A) ⁶⁰. Vandenyje jis efektyviai išsklaido sužadinimo energiją benzotiazolo ir dimetilamino benzilo žiedams sukantis vienas kito atžvilgiu, taip sukeldamas nefluorescuojančią būseną ⁶⁹. Kuomet dažas yra pridėdamas į mėginius, turinčius β-klosčių struktūra pasižyminčių agregatų, ThT stipriai fluorescuoja esant sužadinimui 440 nm bangos ilgyje ir emisijos maksimumas yra 490 nm (1.8. pav. B) ⁶⁶. Esant vandeninei aplinkai be struktūrų, prie kurių galėtų jungtis, dažas fluorescuoja silpnai, kuomet yra mažesni sužadinimo ir emisijos maksimumo bangos ilgiai atitinkamai 350 ir 440 nm ⁷⁰. Nors sąveikos tarp ThT ir amiloidinių fibrilių mechanizmas tebėra nepilnai suprantamas, plačiausiai pripažinta teorija yra, kad ThT molekulės patenka į β-klosčių griovelius ir sąveikaudamos su hidrofobinėmis baltymo aminorūgščių liekanomis imobilizuoja žiedus ir neleidžia jiems sukis vienas kito atžvilgiu per bendrą jungtį, dėl ko yra gaunama didelė fluorescencijos kvantinė išeiga ⁶⁷. Vis dėlto paskutinių tyrimų metu buvo pastebėta, jog egzistuoja daugiau nei vienas ThT jungimosi prie fibrilių būdas ir jie nevienodai pakeičia dažo fluorescencijos kvantinę išeigą, dėl ko tiksliai įvertinti susidariusių fibrilių koncentraciją pagal fluorescencijos pokytį negalima ⁷¹.



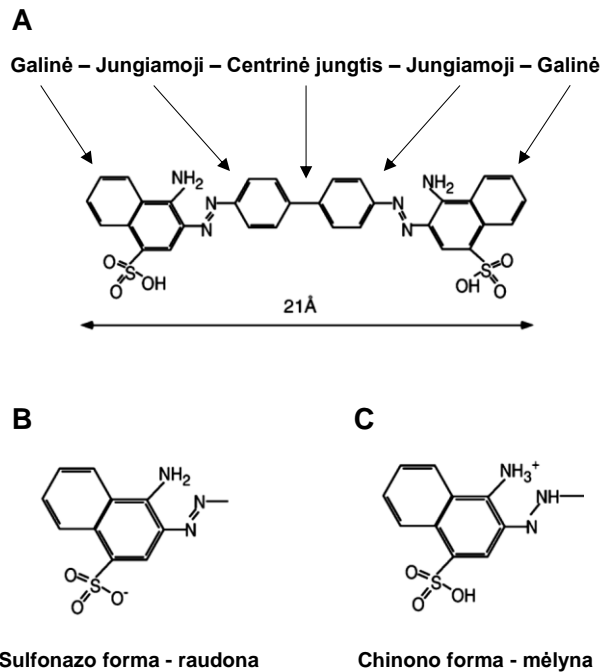
1.8. pav. A. Tioflavino-T (ThT) struktūrinė formulė. Rodykle pažymėta benzotiazolo ir benzilo žiedų rotacija vienas kito atžvilgiu per bendrą C-C jungtį. **B.** ThT fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo bangos ilgio, kuomet mėginyje yra tik ThT ir ThT su fibrilėmis ^{72,73}

Be to naujausi tyrimai parodė, jog dažo fluorescencijos kvantinei išėigai įtakos gali turėti ir tirpalo klampa. Kadangi dauguma vandeninių tirpalų turi mažą klampą, sužadinta būseną tokiomis sąlygomis lengvai virsta nesužadinta būseną, o ThT molekulės turi labai mažą fluorescencinę išėigą⁷². Kai dažas yra sujungtas su amiloidine fibrile arba randamas klampiuose tirpikliuose, žiedų sukimasis sulėtėja, skatinant fluorescuojančią relaksaciją iš sužadintos į nesužadintą būseną ir padidinant fluorescencinę išėigą⁷⁴. Be tirpalo klamos, pH taip pat yra svarbus fluorescencijos pokyčiams⁷². Esant pH žemiau 3 vertės, tretinio amino protonavimas lemia ThT absorbcijos ir emisijos sumažėjimą. Esant šarminei terpei ir (arba) aukštai temperatūrai, gali vykti anglies atomo benzotiazolo žiede hidroksilinimas. Vėlgi, tai lemia absorbcijos ir emisijos pokyčius⁷⁵.

1.9. Kongo raudonasis

Kongo raudonasis (CR) buvo pirmasis dažas, naudojamas amiloidinių agregatų tyrimuose. Jį išrado 1884 metais vokiečių chemikas Paul Böttiger . Jis bandė susintetinti junginį, kurį būtų galima naudoti kaip pH indikatorį, tačiau sukūrė „tiesioginį“ dažą, kuris be jokių papildomų medžiagų pagalbos gali jungtis prie tekstilės pluoštų⁷⁶. Įdomu tai, jog vokiečių gydytojas H. H. Bennhold, kurio vardu buvo pavadintas amiloidų dažymo testas (Bennhold Congo red staining test) pirmasis 1922 metais panaudojo Kongo raudonąjį dažą diagnozuoti amiloidozes. Pati diagnostikos procedūra buvo atliekama į kraują suleidžiant CR ir greitesnis dažo pašalinimas iš kraujotakos buvo „trūkstamo dažo“, prijungto prie amiloidinių agregatų paciento organuose, rodiklis⁷⁷. Vėliau kaip histologinį dažą, 1927 metais panaudojo belgų neuropatologas Paul Dirvy, kuris tyrė degeneracinius smegenų pokyčius, ir jis pastebėjo, kad CR suteikia žalią spalvą amiloidui, susikaupusiam smegenų audinyje, kuomet yra naudojama poliarizuota šviesa⁷⁸.

Kongo raudonasis ($C_{32}H_{22}N_6O_6S_2 \cdot 2Na$), kurio cheminis pavadinimas 3,3'-[(1,1'-bifenil)-4,4'-diilbis(azo)]bis-(4-amino-1-naftaleno) rūgštis) dinatrio druska, yra simetriška linijinė molekulė⁷⁷. Hidrofobinis centras susideda iš dviejų fenilo žiedų, sujungtų diazo jungtimis, su dviem įkrautomis galinėmis naftaleno dalimis. Šiose galinėse CR dalyse yra sulfono rūgštis ir amino grupės⁷⁹. Kongo raudonasis yra chinono formos rūgštiniame tirpale ir sulfonazo pavidalo baziniame tirpale ir keičia spalvą iš mėlynos (žemiau pH 3) į raudoną (virš pH 5) (1.9. pav.)⁷⁷.



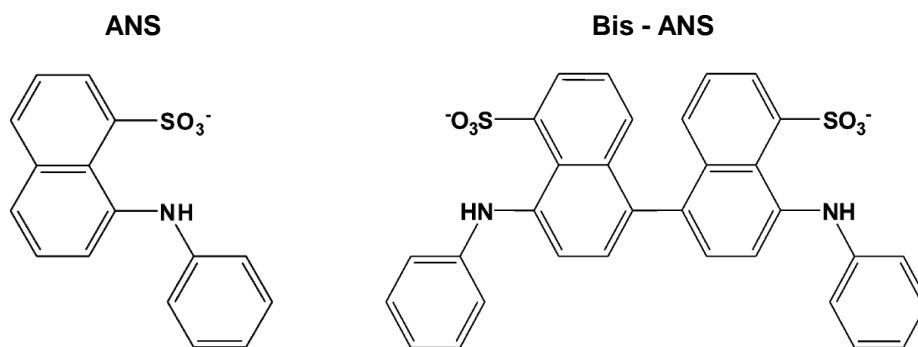
1.9. pav. A. Kongo raudonojo (CR) cheminė struktūra, padalinta į galines ir jungiamąsias grupes, bei centrinę jungtį. Molekulės ilgis yra 21 Å. **B.** CR forma baziniame pH. **C.** CR forma rūgštiniame pH ⁷⁸

Kongo raudonajam prisijungus prie agregatų, jie normalioje šviesoje yra raudonos spalvos, bet geltonos-žalios spalvos („apple-green“) esant poliarizuotai šviesai. Prisijungimas prie amiloidinių fibrilių sukelia būdingą CR maksimalios optinės absorbcijos poslinkį nuo 490 nm iki 540 nm bangos ilgio ⁸⁰. Visgi kokių mechanizmu CR jungiasi prie amiloidinių fibrilių dar nėra gerai suprantama. Paprastai yra manoma, kad jungiamasis priklauso nuo β-klosčių struktūros, nes CR sąveikauja su visomis žinomomis amiloidinių fibrilių formomis, nepaisant skirtingo aminorūgščių kiekio ir konformacijos ⁷⁹. Vis dėlto šio dažo naudojimas sumažėjo, kuomet buvo atrastas kitas fluorescencinis dažas – ThT, nes CR yra nespecifiškas amiloidiniams agregatams ir jungiasi prie kitų baltymų, kaip pavyzdžiui elastino, fibrino, kolageno ⁸¹.

1.10. ANS

Jau 1950-aisiais buvo atrasta, kad įvedus įvairias pakeistas anilino grupes į naftaleno darinius, susidaro tokios molekulės kaip 1-anilinaftaleno-8-sulfonatas (ANS), kurios sunkiai fluorescuoja vandeninėje aplinkoje, tačiau yra labai fluorescuojančios apoliniuose, organiniuose tirpikliuose arba prisijungus prie medžiagų paviršiaus ⁸². Stryer pastebėjo, kad ANS sąveikaujant su apomiglobino ar apohemoglobino hidrofobinėmis sritimis, atsirado maksimalios vertės mėlynasis poslinkis ir fluorescencijos intensyvumo padidėjimas ⁸³. Iki šiol ANS ir jo dimerinis analogas 4,4'-bis-1-anilinaftaleno-8-sulfonatas (Bis-ANS), kuriuos pirmieji 1969 metais aprašė Rosen ir Weber, buvo tarp dažniausiai naudojamų dažų baltymų charakterizavimui ⁸⁴.

ANS yra amfifatinė molekulė, susidedanti iš hidrofobinės anilinaftaleno grupės ir įkrautos sulfonato grupės (1.10. pav.). Šis dažas yra naudojamas kaip fluorescencijos žymuo baltymams apibūdinti įvairiose būsenose ⁸⁵. Esant baltymui išsilydžiusios globulės būsenoje, ANS fluorescencijos intensyvumas padidėja ir tai rodo, kad dažas sąveikauja su hidrofobinėmis baltymo dalimis ⁸⁶. Tiriant dažo fluorescencijos pokyčius laiko atžvilgiu, gaunama dar daugiau informacijos apie baltymo hidrofobines sritis, t.y. ilga (10-15 ns) ar trumpa (2-5 ns) ANS fluorescencijos trukmė parodo atitinkamai tirpiklio apgaubtus arba neapsaugotus hidrofobinius domenus ⁸⁷.



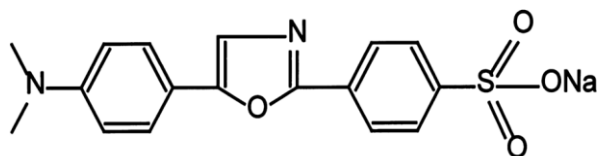
1.10. pav. 1-anilinaftalen-8-sulfonato (ANS) ir jo dimerinio analogo Bis-ANS cheminės struktūros.
86

Šio dažo fluorescencijos kvantinė išeiga yra maža polinėje aplinkoje, tokioje kaip vandeniniai tirpalai, tačiau nepolinėje aplinkoje jo fluorescencija stipriai padidėja ⁸⁸. Visgi kokių mechanizmu yra sukuriamas toks fluorescencijos intensyvumo padidėjimas dar nėra aišku. Buvo pasiūlyta, kad tiek ribotas mobilumas, tiek artimiausios ANS aplinkos hidrofobiškumas reikšmingai prisideda prie mėlynos spalvos fluorescencijos spektrų poslinkio ir padidėjusio fluorescencijos intensyvumo bei dažo fluorescencijos trukmės ⁸⁷. Tyrimai rodo, kad ANS ir Bis-ANS fluorescencijos intensyvumas priklauso ne tik nuo tirpalo poliškumo, klampos ir temperatūros, bet mėlynas emisijos maksimumo poslinkis ir kvantinės išeigos padidėjimas įvyksta ir mažėjant tirpiklio dielektrinei konstantai ⁸². Dimerinis ANS analogas (Bis-ANS), pasižymi panašiomis fluorescencijos savybėmis lyginant su ANS, tačiau dimerinės formos UV absorbcijos maksimumas ir fluorescencijos emisija pasislenka į ilgesnius bangos ilgius ⁸⁹. ANS ir Bis-ANS yra ypač tinkami baltymų agregacijai nustatyti ankstyvose stadijose, kuomet agregatų dažnai būna labai mažomis koncentracijomis ir jų gyvavimo trukmė gali būti trumpa ⁹⁰.

1.11. Dapoksilas

Dapoksiliniai dažai yra labai jautrūs aplinkai fluorescenciniai junginiai. Jų fluorescencija vandenyje yra labai maža, tačiau tirpiklių pH ir poliškumas sukelia didelius fluorescencijos intensyvumo ir ekstinkcijos koeficientų pokyčius, bei Stokso poslinkį ⁹¹. Dėl dapoksilinių dažų jautrumo aplinkai, jie buvo plačiai naudojami nustatant įvairias organeles, įskaitant ir endoplazminį tinklą (ET), bei baltymų konformacinius ir fosforilimo pokyčius ⁹².

Dapoksilinių dažų sintezės eiga jau žinoma ilgą laiką. Dažniausiai yra vykdomos dviejų pakopų reakcijos, pirmoji - acilamino ketono sintezė ir antroji - ciklodehidratacija, taip sukuriant oksazolo struktūrą, kuri yra dapoksilinių dažų pagrindas. Vis dėlto svarbesnis yra antrasis dažo sintezės etapas (ciklodehidratacijos reakcija), nes nuo šio etapo pasisekimo priklauso, kokios funkcinės grupės bus galutinėje oksazolo struktūroje⁹³. Dapoksilo struktūra pavaizduota 1.11. pav.



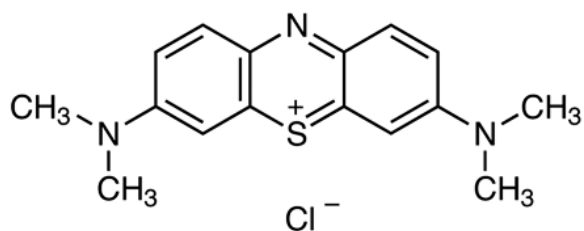
1.11. pav. Dapoksilo (Dap) cheminė struktūra.⁹¹

Dapoksilas geba identifikuoti β -klosčių struktūrą ir hidrofobinius paviršius, taip atsirandant galimybei spręsti apie baltymo struktūros pasikeitimus, dėl kurių atsiranda sužadavimo ir emisijos profilių bei santykinės kvantinės išeigos pokyčiai. Taip pat buvo pastebėta, kad dapoksilas yra daugiamatis žymuo amiloidinių baltymų agregacijos priklausomybės nuo laiko tyrimuose, suteikiantis informacijos apie metastabilius agregacijos tarpinius produktus ir jų pobūdį, ko negalima nuspręsti naudojant įprastus žymenis, kurie remiasi vien tik kvantinės išeigos pokyčiais⁹⁴.

1.12. Metileno mėlis

Istoriškai metileno mėlis (MB) yra pirmasis sintetinis junginys, kada nors naudotas kaip antiseptikas klinikinėje terapijoje ir pirmasis antiseptinis dažas, naudojamas terapiškai. MB ir jo dariniai buvo plačiai naudojami chemoterapijoje prieš atrandant sulfonamidus⁹⁵. Be to šis dažas buvo vienas pagrindinių junginių, ieškant vaistų nuo įvairių bakterinių ar virusinių infekcijų ir vėžio. Jo struktūros ir terapinės veiklos tyrimai atliko svarbų vaidmenį vystant fenotiazinus, didelę vaistų grupę, vartojamą kaip antihistamininiai preparatai ir neuroleptikai⁹⁶. Teigiamas MB poveikis gydant kognityvinius sutrikimus, pasireiškiančius psichozėmis, buvo žinomas daugiau nei šimtmetį ir pastaruoju metu daug dėmesio sulaukė jo galimybės sulėtinti dėl Alzheimerio ligos (AD) atsirandantį kognityvinių funkcijų suprastėjimą⁹⁷.

MB, katijoninis dažas, kurio cheminis pavadinimas yra tetrametiltionino chloridas, priklauso junginių, žinomų kaip fenotiazinai, klasei (1.12. pav.) . Jis tirpsta vandenyje ir gali iširti organiniuose tirpikliuose²⁷. Jo spalva oksiduotoje formoje yra tamsiai mėlyna, o maksimali absorbcija - esant 609 ir 668 nm šviesos bangos ilgiams, ir bespalvė, kai dažas yra redukuojamas, ir ši forma nesugeria regimosios šviesos srityje⁹⁸. Šios dvi dažiklio formos egzistuoja kaip pusiausvyroje esanti redokso pora ir kartu jie sudaro grįžtamąją oksidacijos-redukcijos sistemą arba elektronų donorų ir akceptorų porą⁹⁷.



1.12. pav. Metileno mėlio (MB) cheminė struktūra. ⁹⁵

Tyrimai parodė, jog metileno mėlis geba pereiti smegenų ir kraujo barjerą. Eksperimentų su žiurkėmis rezultatai parodė, kad praėjus 60 minučių po vartojimo oraliniu arba injekcijos į veną būdu MB koncentracija smegenyse yra apie 10 kartų didesnė nei plazmoje. Kai MB sušvirkščiamas į pelių ar žiurkėnų kairįjį širdies skilvelį, jis gerai prasiskverbia į smegenis tiek redukuotos, tiek oksiduotos formos ⁹⁹. Šiuo metu MB yra patvirtintas Maisto ir vaistų administracijos vartoti oraliniu arba intraveniniu būdu gydant methemoglobinemiją, malšinant šlapimo takų diskomfortą, ir kaip chirurginiai „dažai - žymenys“ skysčių nutekėjimams nustatyti, daugiausia iš virškinimo trakto ir šlapimo sistemos ⁹⁷.

Be viso to, kad metileno mėlis buvo naudojamas kaip dažas susidarančių amiloidinių fibrilių tyrimuose ir amiloidų nustatymui organizme, atliekant eksperimentus *in vitro* buvo pastebėtas šio junginio agregaciją slopinantis poveikis ⁹⁷. Tyrimai *in vitro* parodė, kad MB slopina Aβ ir tau baltymo agregaciją, taip pat dalinai atstato mitochondrijų disfunkciją ir metabolizmo procesus smegenyse. Taip pat atliekant bandymus su pelėmis, kurios buvo kaip Alzheimerio ligos modelis, buvo pamatyta, kad pelėms vartojant MB oraliniu būdu, jų smegenyse susikaupusių Aβ agregatų kiekis sumažėjo ir pagerėjo kognityvinės funkcijos ⁹⁹.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Laboratorinė įranga

- Centrifugos: „Eppendorf 5424” (F-45-18-11-Kit rotorius)
- Magnetinės maišyklės: „VARIOMAG Maxi Direct“, „VELP Scientifica® ARE“;
- pH metras: „Thermo Scientific Orion DUAL STAR meter“;
- Purtyklė „KS 4000i” (IKA);
- Refraktometras „RL3” (PZO);
- Spektrofotometrai: „Varian Cary Eclipse“, „Nanodrop 2000”, „Shimadzu UV-1800”;
- Svarstyklės: „Kern PCB 1000-2“, „Denver Instruments TP-214“;
- Termostatai: „Fisher Scientific IB-15G“, „Eppendorf Thermostat plus“;
- Termostatuojamos purtyklės: „Ditabis ThermoMixer MHR 23“;
- Ultragarsinis homogenizatorius: „Bandelin Sonopuls“ (antgalis : MS-73);
- Vakuuminė filtravimo sistema: „Sigma-Aldrich“;
- Švirkštinis filtras (diametras – 30 mm, porų dydis - 0,22 μm).

2.2. Medžiagos

- Sigma-Aldrich : tioflavinas-T (ThT), Kongo raudonasis (CR), metileno mėlis (MB), dapoksilas (Dap), 1-anilinoftaleno-8-sulfonatas (ANS)
- Acros Organics : guanidino hidrochloridas (98 proc.) (GuHCl), dinatrio hidrofosfatas (Na_2HPO_4), natrio dihidrofosfatas (NaH_2PO_4), druskos rūgštis (HCl), natrio šarmas (NaOH).
- Fisher scientific: kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4), natrio chloridas (NaCl), kalio chloridas (KCl), fosforo rūgštis (H_3PO_4)

2.3. Buferiniai tirpalai

- **6 M GuHCl, 50 mM natrio fosfato buferinis tirpalas (pH 6,0 arba 7,4).** 4,4 ml 0,5 M NaH_2PO_4 yra sumaišoma su 600 μl 0,5 M Na_2HPO_4 (pH 7,4 atveju atitinkamai 1,2 ml sumaišoma su 3,8 ml) ir įpilamas nedidelis tūris dejonizuoto vandens. Į tirpalą suberiama 28,7 g GuHCl. Nustatoma tirpalo pH vertė, kuri yra koreguojama naudojant HCl arba NaOH tirpalus. Buferinis tirpalas yra filtruojamas naudojant 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtra. Toliau tirpalas yra skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 50 ml tūrio.
- **50 mM natrio fosfato buferinis tirpalas (pH 6 arba 7,4).** 8,8 ml 0,5 M NaH_2PO_4 yra sumaišoma su 1,2 ml 0,5 M Na_2HPO_4 (pH 7,4 atveju atitinkamai 2,4 ml sumaišoma su 7,6 ml) ir įpilama dejonizuoto vandens, kad bendras tirpalo tūris būtų 100 ml. Nustatoma buferinio tirpalo pH vertė, kuri jeigu reikia yra koreguojama naudojant HCl arba NaOH tirpalus. Buferinis tirpalas filtruojamas naudojant 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtra.

- **10x PBS (pH 7,4).** 1,42 g Na₂HPO₄ , 0,24 g KH₂PO₄, 8 g NaCl ir 0,2 g KCl yra ištirpinama 100 ml dejonizuoto vandens. Tuomet buferinis tirpalas yra filtruojamas naudojant 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą. Prieš naudojimą šis buferinis tirpalas skiedžiamas 10 kartų dejonizuotu vandeniu.
- **100 mM PO₄³⁻ 100 mM NaCl (pH 2,4) buferinis tirpalas.** 7,1 ml 1 M H₃PO₄ sumaišoma su 25,8 ml 0,5 M NaH₂PO₄ ir įpilama dejonizuoto vandens. Į tirpalą suberiama 1,17 g NaCl. Buferinis tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 200 ml tūrio ir nustatoma jo pH vertė, kuri yra koreguojama naudojant HCl arba NaOH tirpalus. Gautas tirpalas yra filtruojamas naudojant 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.
- **4 M NaCl tirpalas.** 11,69 g NaCl ištirpinama 50 ml dejonizuoto vandens. Tuomet tirpalas filtruojamas naudojant 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

2.4. Metodai

2.4.1. Amilodinių fibrilių paruošimas

2.4.1.1. Dažų sąveikos tyrimui

Rekombinantinis žmogaus insulinas (ekstinkcijos koeficientas $\epsilon_{280} = 6335 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, molinė masė $M = 5808 \text{ Da}$) ištirpinamas PBS (pH 7,4) buferiniame tirpale. Tiksliai baltymo koncentracija yra nustatoma naudojant „Nanodrop 2000“ spektrofotometrą ir tirpalas skiedžiamas PBS buferiniu tirpalu, kad galutinė baltymo koncentracija būtų 300 μM (1,74 mg/ml). Baltymo tirpalas yra išpilstomas po 1 ml į mėgintuvėlius ir inkubuojamas 60°C temperatūroje 24 valandas.

Vištos kiaušinio baltymo lizocimas (ekstinkcijos koeficientas $\epsilon_{280} = 37970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, molinė masė $M = 14313 \text{ Da}$) ištirpinamas 2 M GuHCl 50 mM natrio fosfato (pH 7,4) buferiniame tirpale. Tiksliai baltymo koncentracija yra nustatoma naudojant „Nanodrop 2000“ spektrofotometrą ir koreguojama naudojant buferinį tirpalą, kad galutinė baltymo koncentracija būtų 300 μM (4,29 mg/ml). Tirpalas yra išpilstomas po 1 ml į mėgintuvėlius, kuriuose yra po du 3 mm stiklo rutuliukus. Mėginiai yra inkubuojami termostatuojamoje purtyklėje 60 °C temperatūroje, purtant 600 apsisukimų per minutę greičiu, 24 valandas. Pagamintus agregatus centrifuguojame 10 min, 12500 apsisukimų per minutę greičiu ir resuspenduojame PBS (pH 7,4) buferiniame tirpale. Ši procedūra kartojama keturis kartus.

Pelės prioninio baltymo fragmentas MoPrP 89-230 (ekstinkcijos koeficientas $\epsilon_{280} = 27515 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, molinė masė $M = 18655 \text{ Da}$) (pradinė konc. 3,0 mg/ml) skiedžiamas naudojant 6 M GuHCl 50 mM natrio fosfato (pH 7,4) ir 50 mM natrio fosfato (pH 7,4) buferinius tirpalus, kad galutinė GuHCl koncentracija mėginyje būtų 0,5 M, o baltymo - 0,5 mg/ml. Tirpalas išpilstomas į mėgintuvėlius po 1,5 ml, kurie inkubuojami termostatuojamoje purtyklėje 60 °C temperatūroje,

purtant 600 apsisukimų per minutę greičiu, 24 valandas. Susidarę agregatai yra centrifuguojami 10 min 12500 apsisukimų per minutę greičiu ir resuspenduojami PBS (pH 7,4) buferiniame tirpale. Ši centrifugavimo/resuspendavimo procedūra pakartojama 4 kartus. Galiausiai mėginiai po centrifugavimo resuspenduojami mažesniame tūryje buferinio tirpalo ir apjungiami, kad galutinė baltymo koncentracija mėginyje būtų 300 μM .

2.4.1.2. Joninės jėgos tyrimui

Rekombinantinis žmogaus insulinas ištirpinamas 100 mM PO_4^{3-} 100 mM NaCl (pH 7,4) buferiniame tirpale. Naudojant spektrofotometrą „Nanodrop 2000“ yra nustatoma tiksli baltymo koncentracija ir mėginys skiedžiamas buferiniu tirpalu, kad galutinė baltymo koncentracija būtų 200 μM . Tirpalas išpilstomas į mėgintuvėlius po 1 ml ir inkubuojamas 60 °C temperatūroje, 24 valandas. Po agregacijos mėginiai yra centrifuguojami 10 min, 12500 apsisukimų per minutę greičiu ir fibrilės resuspenduojamos į dejonizuotą vandenį. Šis procedūra kartojama 4 kartus. Galiausiai nucentrifugavus mėginiai apjungiami, resuspendavus mažesniame tūryje dejonizuoto vandens, kad galutinė baltymo koncentracija mėginyje būtų 400 μM .

Vištos kiaušinio baltymo lizocimas ištirpinamas naudojant 6 M GuHCl 50 mM PO_4^{3-} (pH 6) ir 50 mM PO_4^{3-} (pH 6) buferinius tirpalus, kad mėginyje būtų 2 M GuHCl. Tiksli baltymo koncentracija mėginyje yra nustatoma naudojant spektrofotometrą „Nanodrop 2000“ ir mėginys skiedžiamas naudojant buferinį tirpalą, kad galutinė baltymo koncentracija mėginyje būtų 200 μM . Tirpalas išpilstomas po 1 ml į mėgintuvėlius, kuriuose yra po du 3 mm stiklo rutuliukus. Mėginiai inkubuojami 60 °C temperatūroje, purtant 600 apsisukimų per minutę greičiu, 24 valandas. Po agregacijos mėginiai centrifuguojami 10 min 12500 apsisukimų per minutę greičiu ir resuspenduojami į dejonizuotą vandenį. Šis procesas kartojamas 4 kartus, paskutinį kartą nucentrifugavus mėginiai yra apjungiami, kad galutinė baltymo koncentracija mėginyje būtų 400 μM , kaip ir insulino atveju.

Pelės prioninio baltymo fragmentas MoPrP (89-230) (pradinė konc. 3,0 mg/ml) yra skiedžiamas 6 M GuHCl 50 mM PO_4^{3-} (pH 6) ir 50 mM PO_4^{3-} (pH 6) buferiniais tirpalais, kad GuHCl koncentracija mėginyje būtų 0,5 M ir baltymo koncentracija 0,5 mg/ml. Baltymo tirpalas išpilstomas į mėgintuvėlius po 1,5 ml ir jie inkubuojami 60 °C temperatūroje, purtant 600 apsisukimų per minutę greičiu, 24 valandas. Susidarę agregatai yra centrifuguojami 10 min 12500 apsisukimų per minutę greičiu ir resuspenduojami dejonizuotame vandenyje. Procedūra kartojama keturis kartus ir galiausiai nucentrifugavus mėginiai yra apjungiami, kad galutinė baltymo koncentracija mėginyje būtų 400 μM .

α -sinukleinas (ekstinkcijos koeficientas $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, molinė masė $M = 14460 \text{ Da}$) (pradinė konc. 7,4 mg/ml (512 μM)) yra skiedžiamas naudojant 10x PBS (pH 7,4) buferinį tirpalą ir

dist. vandenį, kad galutinė baltymo koncentracija mėginyje būtų 200 μM . Tirpalas išpilstomas po 1 ml į mėgintuvėlius, kuriuose yra po du stiklo rutuliukus ir inkubuojama 60 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, purtant 600 apsisukimų per minutę greičiu, 48 valandas. Agregatai nucentrifuguojami 10 min 12500 apsisukimų per minutę greičiu ir resuspenduojami dejonizuotame vandenyje. Procesas kartojamas 4 kartus ir galiausiai nucentrifugavus mėginiai yra resuspenduojami į 500 μl dejonizuoto vandens ir apjungiami, kad galutinė baltymo koncentracija mėginyje būtų 400 μM .

2.4.2. Dažų tirpalų paruošimas

ThT, CR, ANS, Dap ir MB dažų milteliai buvo ištirpinti distiliuotame vandenyje (dažo koncentracija 1 mM) ir tirpalai nufiltruoti naudojant 0,22 μm porų dydžio, 13 mm diametro švirkštinį filtrą. Tiksliai dažų koncentracija yra nustatoma matuojant 200 kartų skiesto tirpalo sugertį (ThT $\epsilon_{412} = 22,1 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, CR $\epsilon_{486} = 33,3 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, ANS $\epsilon_{351} = 5,2 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, Dap $\epsilon_{348} = 28,4 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, MB $\epsilon_{664} = 73,1 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Tuomet jie skiedžiami, naudojant PBS (pH 7,4) buferinį tirpalą iki 150 μM koncentracijos. Dažų tirpalai laikomi 4 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, tamsoje, norint išvengti fotooksidacijos reakcijos.

2.4.3. Dažų sąveikos absorbcijos tyrimas

Mėginiai absorbcijos tyrimui ruošiami maišant susidariusias amiloidines fibriles, kurios prieš naudojimą skaldomos ultragarsu 10 min (MS-73 antgalis, 40 % amplitudė, 30 s veikimo - 30 s ramybės režimas), PBS buferinį tirpalą ir dažus. Amiloidinių fibrilių galutinė koncentracija mėginyje yra 100 μM , o dažo - 50 μM . Paruošiami trijų tipų tirpalai: fibrilės be dažų, fibrilės su vienu iš dažų ir fibrilės su dviem dažais. Sumaišius mėginiai inkubuojami kambario temperatūroje 30 min ir centrifuguojami 10 min 12500 apsisukimų per minutę greičiu. Nucentrifugavus surenkama 150 μl mėginio supernatanto ir matuojama jo absorbcija 200-800 nm bangos ilgio ribose (rezoliucija – 1 nm).

2.4.4. Prijungtų dažų koncentracijos nustatymas ir spektrų korekcija

Pirmiausia norint nustatyti pavienių dažų, prisijungusių prie amiloidinių fibrilių, koncentraciją, matuojama supernatanto sugertis (A) 200-800 nm bangos ilgio srityje. Laisvo dažo koncentracija randama, naudojant nustatytas dažų ekstinkcijos koeficiento vertes (ϵ). Skaičiuojama pagal formulę:

$$c = \frac{A}{\epsilon}$$

Kur c yra laisvo dažo koncentracija, A yra sugertis, dažui būdingame bangos ilgyje, ϵ yra ekstinkcijos koeficientas, nustatytas dažui būdingame bangos ilgyje.

Norint nustatyti kiek yra prijungiama vieno ar kito dažo molekulių, esant dviejų dažų mišiniui tirpale kartu su amiloidinėmis fibrilėmis, pirmiausia yra nustatoma kaip dažų tarpusavio sąveika pakeičia jų sugerties spektrus. Kiekvienam bangos ilgiui apskaičiuojamas korekcijos faktorius (t.y. kiek dažų sąveika pakeičia sugerties intensyvumą tam tikrame bangos ilgyje), pagal kurį koreguojami dažų mišinių spektrai. Šis faktorius lygus pavienių dažų be fibrilių spektrų sumos (Dažas 1 + Dažas 2) ir dviejų dažų mėginio spektro (Dažas 1 su Dažas 2) santykiui (formulė).

$$KorF = \frac{Dažas1 + Dažas2}{Dažas1 su Dažas2}$$

Kur KorF yra korekcijos faktorius, Dažas1 + Dažas2 yra sudėtos dviejų dažų absorbcijos spektrų vertės, Dažas1 su Dažas2 yra absorbcijos vertės, gautos matuojant mėginyje esant dviems dažams.

Siekiant nustatyti kiek vieno ir kitų molekulių yra prijungiama prie amiloidinių fibrilių paviršiaus tiriant vienu metu abu dažus naudojama ši lygčių sistema: (formulė)

$$\varepsilon_{11} \cdot x + \varepsilon_{12} \cdot y = A_1$$

$$\varepsilon_{21} \cdot x + \varepsilon_{22} \cdot y = A_2$$

Kur ε_{11} yra pirmo dažo ekstinkcijos koeficientas λ_1 bangos ilgyje, ε_{12} – antro dažo ekstinkcijos koeficientas λ_1 bangos ilgyje, A_1 – absorbcijos reikšmė, esant bangos ilgiui λ_1 . O ε_{21} – pirmo dažo ekstinkcijos koeficientas λ_2 bangos ilgyje, ε_{22} – antro dažo ekstinkcijos koeficientas λ_2 bangos ilgyje, A_2 – absorbcijos reikšmė, esant bangos ilgiui λ_2 . x yra pirmojo dažo koncentracija, o y – antrojo. Šie bangos ilgiai yra parenkami, atsižvelgiant į kiekvieno dažo absorbcijos spektro maksimumo reikšmės bangos ilgius, kurie naudojami apskaičiuoti ekstinkcijos koeficientą ir dažo koncentraciją.

2.4.5. Dažų sąveikos fluorescencijos tyrimas

Fluorescencijos tyrimui mėginiai paruošiami tokiu pat principu kaip ir absorbcijos tyrimui, sumaišant amiloidines fibriles, PBS buferinį tirpalą ir amiloidofilinius dažus. Mėginiai yra inkubuojami kambario temperatūroje 30 min, tačiau po inkubacijos nėra centrifuguojami. Pirmiausiai, didelio ploto sužadavimo-emisijos matricos skenuojamos naudojant 200-800 nm bangos ilgių intervalą (sužadavimo bangos ilgio žingsniai – 10 nm, emisijos – 1 nm). Radus didžiausio signalo matricos poziciją, susiaurinamas skenavimo intervalas ir padidinama rezoliucija (sužadavimo bangos ilgio žingsniai – 1 nm, emisijos – 1 nm).

2.4.6. Fibrilių su ThT ir CR titravimas

Insulino amiloidinės fibrilės yra sumaišomos su ThT ir CR, kad galutinė baltymo koncentracija mėginyje būtų 100 μM, ThT koncentracijos – 50, 100 ir 150 μM, o CR koncentracijos nuo 0 iki 50 μM. Šie mėginiai inkubuojami 1 valandą kambario temperatūroje ir matuojamas jų fluorescencijos intensyvumas, esant sužadimui 440 nm bangos ilgyje, o emisija 460-500 nm bangos ilgio ribose. Mėginių absorbcija buvo nustatoma praskiedus tirpalą 10 kartų. Norint nustatyti neprijungto ThT koncentraciją mėginiai centrifuguojami, kaip ir anksčiau aprašytuose bandymuose. Neprijungto CR koncentracija visais atvejais supernatante buvo mažiau nei 1 μM.

2.4.7. Joninės jėgos poveikio tyrimas

Paruošiami mėginiai, kuriuose yra skirtingų koncentracijų NaCl tirpalai (galutinė konc. 0-2 M), skirtingų koncentracijų ThT tirpalai (galutinė konc. 20-100 μM) ir amiloidinės fibrilės (galutinė konc. 100 μM). Prieš naudojimą amiloidinės fibrilės skaldomos ultragarsu 10 min (MS-73 antgalis, 40 % amplitudė, 30 s veikimo – 30 s poilsio režimas). Matuojama mėginių absorbcija 300-600 nm bangos ilgio ribose, kas 1 nm žingsnį. Tuomet mėginiai centrifuguojami 10 min, 9000 apsisukimų per minutę greičiu. Surenkama dalis mėginio supernatanto, kuris skiedžiamas 3 kartus ir matuojama absorbcija 300-600 nm bangos ilgio ribose (1 nm rezoliucija). Mėginio optinis tankis buvo matuojamas esant 600 nm bangos ilgiui, naudojant 10 mm šviesos kelio ilgio kiuvetę.

Fluorescencijos tyrimui mėginiai paruošiami kaip ir absorbcijos tyrimui, sumaišius NaCl, ThT tirpalus ir amiloidines fibriles santykiu 2:1:1. Matuojamos mėginių fluorescencijos sužadimo - emisijos matricos (EEM), esant sužadimui 435-465 nm bangos ilgio ribose, 1 nm rezoliucija, o emisijai 460-500 nm bangos ilgio ribose, 1 nm rezoliucija. α-sinukleino atveju, fluorescencijos emisijos intensyvumas buvo žymiai didesnis nei kitų baltymų atveju, todėl mėginiai buvo skenuojami naudojant silpnesnį sužadimą. Norint palyginti gautus eksperimentų rezultatus, α-sinukleino mėginių fluorescencijos maksimumo reikšmės buvo padaugintos iš faktoriaus, kuris lygus 5 (apskaičiuota nuskenavus kontrolinius mėginius esant įprastam ir mažesniau sužadimo intensyvumui).

2.4.8. Vidinio filtro korekcija ir EEM maksimumo pozicijos skaičiavimas

Kadangi mėginio absorbcija sukuria pirminio ir antrinio vidinio filtro efektą mėginio fluorescencijai, visi EEM buvo pakoreguoti (ši vidinio filtro korekcija aprašyta ¹⁰⁰), naudojant formulę:

$$I_m = I_c \cdot 10^{-(AEx+AEm)/2}$$

Kur AEx yra mėginio absorbcija, esant sužadavimo bangos ilgiui, AEm – mėginio absorbcija, esant emisijos bangos ilgiui, I_m – pamatuoto signalo intensyvumas, I_c – koreguotas signalo intensyvumas.

Norint išvengti signalo triukšmo ir negalint nustatyti konkrečios EEM intensyvumo maksimumo vertės, buvo apskaičiuojamas signalo “masės centras”, pasirenkant 10 % didžiausių intensyvumo verčių ir naudojant šią lygtį:

$$\lambda = (\sum (\lambda_n \cdot \sum I_n)) / \sum I_a$$

Kur λ yra sužadavimo arba emisijos “masės centro” bangos ilgis, λ_n – sužadavimo arba emisijos bangos ilgis, $\sum I_n$ visų signalo intensyvumų suma, esant λ_n bangos ilgiui, $\sum I_a$ visų signalo intensyvumų suma.

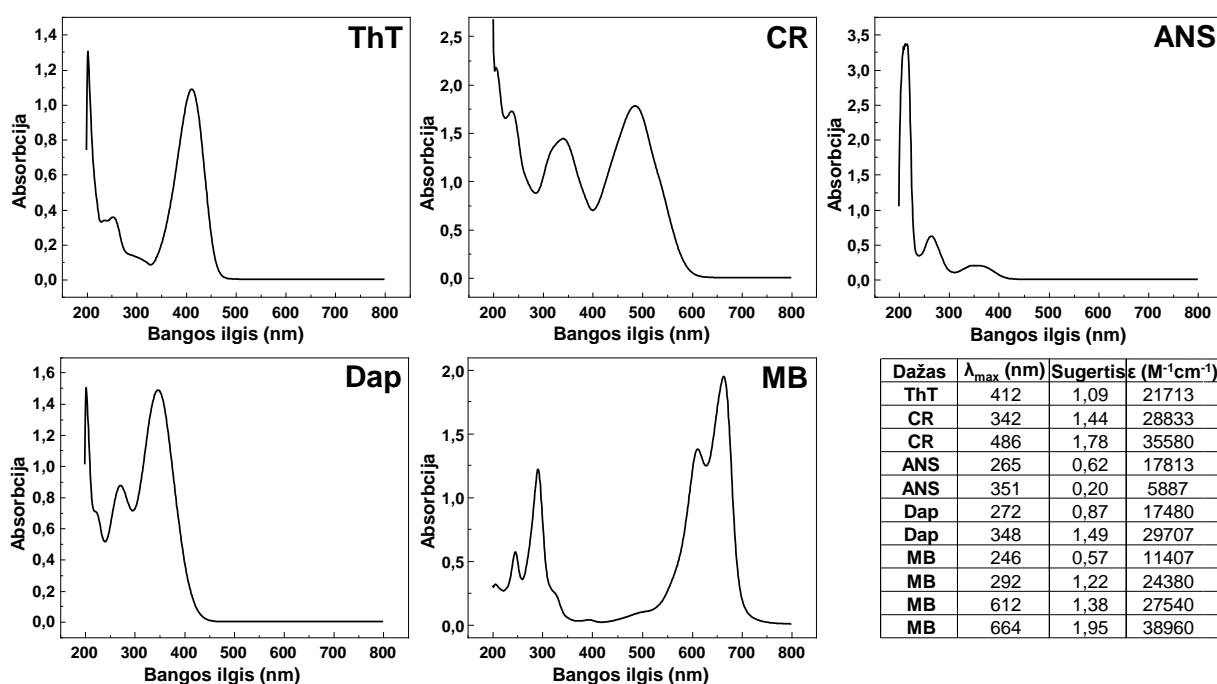
2.4.9. Furje-transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos tyrimas

Paruoštų visų keturių amiloidinių baltymų fibrilių mėginiai centrifuguojami 30 min, 12500 apsisukimų per minutę greičiu ir resuspenduojami į D₂O. Ši procedūra kartojama 4 kartus. Po paskutinio centrifugavimo, mėginiai resuspenduojami į 200 μl D₂O ir padalinami į dvi lygias dalis. Viena mėginio dalis sumaišoma su 100 μl D₂O, o kita dalis – su 100 μl D₂O, kuriame yra ištirpinta 4 M NaCl. Iš mėginio spektro atimamas D₂O spektras, atliekama bazinės linijos korekcija (tarp 1595 cm⁻¹ ir 1700 cm⁻¹ pozicijų) ir normalizuojamas 1595-1700 cm⁻¹ ribose. Gauti duomenys analizuojami naudojant GRAMS programinę įrangą.

3. Rezultatai

3.1. Dažų sąveikos absorbcijos tyrimas

Norint nustatyti prie amiloidinių fibrilių paviršiaus prisijungusių dažo molekulių koncentraciją, pirmiausia buvo apskaičiuoti visų dažų ekstinkcijos koeficientai jiems būdingų absorbcijos maksimumų bangos ilgiuose. Šiam tikslui buvo pamatuota visų dažų sugertis 200-800 nm bangos ilgio ribose (3.1. pav.). Kad palengvinti diskusiją, toliau bus naudojami amiloidofilinių dažų trumpiniai: tioflavino-T (ThT), Kongo raudonojo (CR), 8-anilino-1-naftaleno sulfonato (ANS), dapoksilo (Dap) ir metileno mėlio (MB).

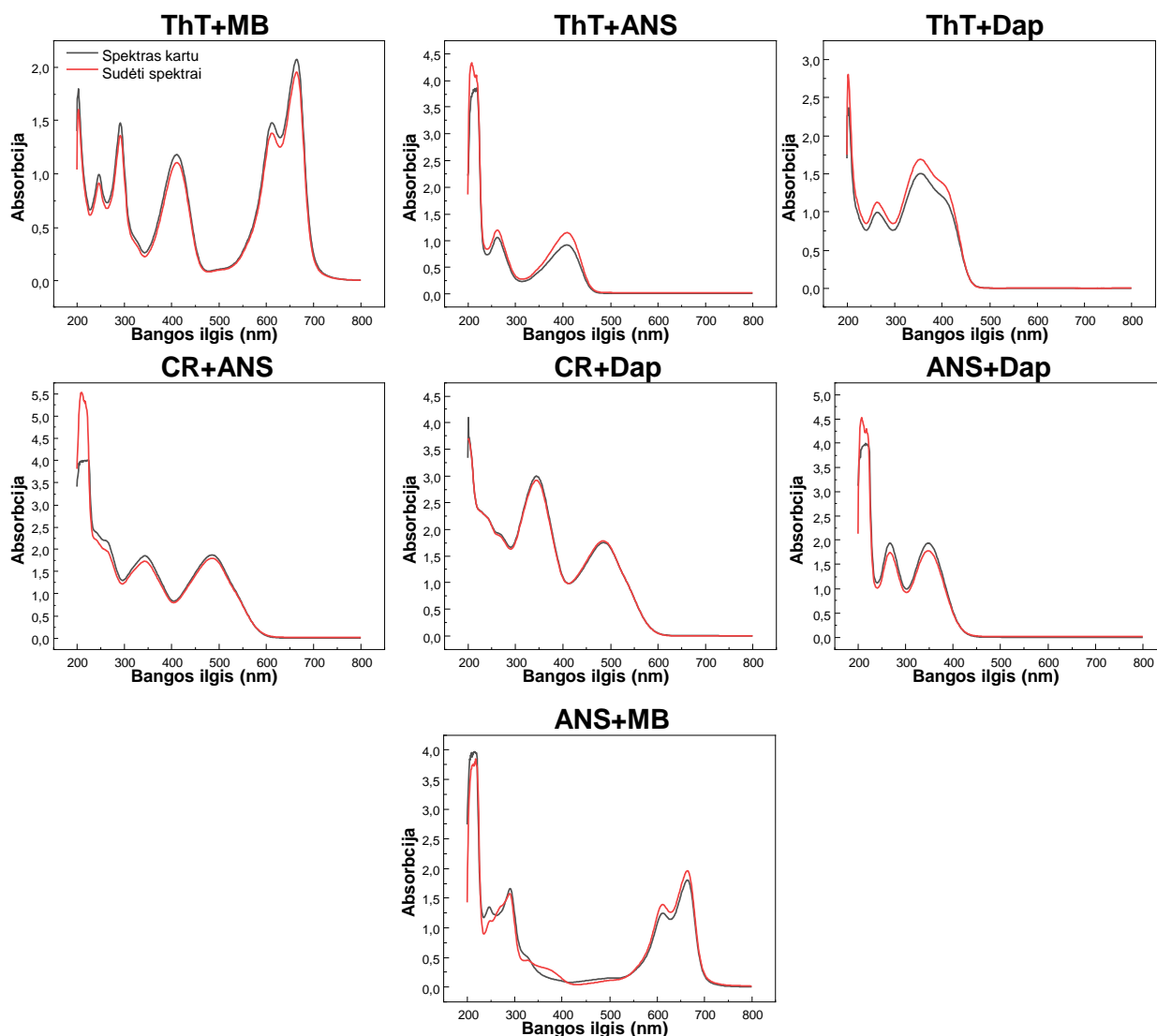


3.1. pav. Pavienių dažų sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse ir lentelė, kurioje parodyti kiekvienam dažui specifinio sugerties maksimumo bangos ilgiai ir apskaičiuotos tam bangos ilgiui būdingos ekstinkcijos koeficiento vertės.

Kaip matoma paveiksle, daugelio dažų spektrų 200-300 nm bangos ilgio srityje yra matomi aromatiniais žiedams specifiniai sugerties pikai. Be šių pikų, taip pat matomi dažams specifiniai absorbcijos maksimumai: ThT atveju – 1, CR, ANS ir Dap – 2, MB – 4. Kadangi buvo matuojamas žinomos koncentracijos dažo absorbcijos spektras, pagal sugerties vertę kiekvienam dažui specifiniame bangos ilgyje buvo apskaičiuoti dažų ekstinkcijos koeficientai. Gautos vertės parodytos lentelėje (3.1. pav.). Pagal gautus ekstinkcijos koeficientus toliau buvo įvertinti dažų, prijungtų prie amiloidinių fibrilių, koncentracijos.

Be to, prieš pradėdant tirti amiloidofilinių molekulių sąveiką su amiloidinių fibrilių paviršiumi, reikėjo įvertinti ar šie dažai nesąveikauja tarpusavyje, nes jų sąveika tirpale gali nulemti klaidingą rezultatų interpretavimą tolimesniuose tyrimuose. Todėl buvo lyginami dviejų dažų spektrai

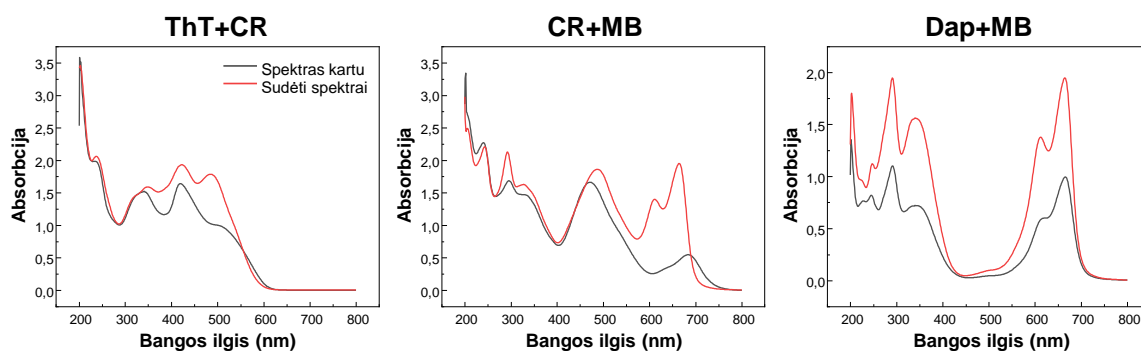
kartu ir pavienių dažų sudėti spektrai, kad įsitikinti, jog dėl molekulių sąveikos nepasikeičia spektro maksimumo pozicijos ar sugerties intensyvumai. Sumaišius dažus ir pamatavus jų absorbcijos spektrus 200-800 nm bangos ilgio srityje, matome, kad septyniais iš dešimties atvejų skirtumas tarp bendro dažų ir sudėtų spektrų maksimumo pozicijų yra minimalus (3.2. pav.), tačiau yra skirtumų tarp sugerties verčių.



3.2. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, kurie gauti sudėjus atskirus dviejų pavienių dažų absorbcijos spektrus (raudona spalva) arba mėginyje esant dviems dažams (juoda spalva).

CR-ANS ir CR-Dap porų atvejais tarp spektrų nustatomas labai mažas skirtumas, kuris reiškia, kad molekulės tarpusavyje nesąveikauja arba sąveika yra minimali. Kitais atvejais, matomas didesnis skirtumas, todėl galima daryti išvadą, kad dažų molekulės tarpusavyje sąveikauja šiek tiek stipriau, dėl ko padidėja ar sumažėja dažo geba absorbuoti tam tikro bangos ilgio šviesą, todėl į tai būtina atsižvelgti vertinant tolimesnių tyrimų rezultatus, nes šie skirtumai gali sukurti įspūdį, jog dažai vienas kitam padeda ar trukdo jungtis prie fibrilių paviršiaus.

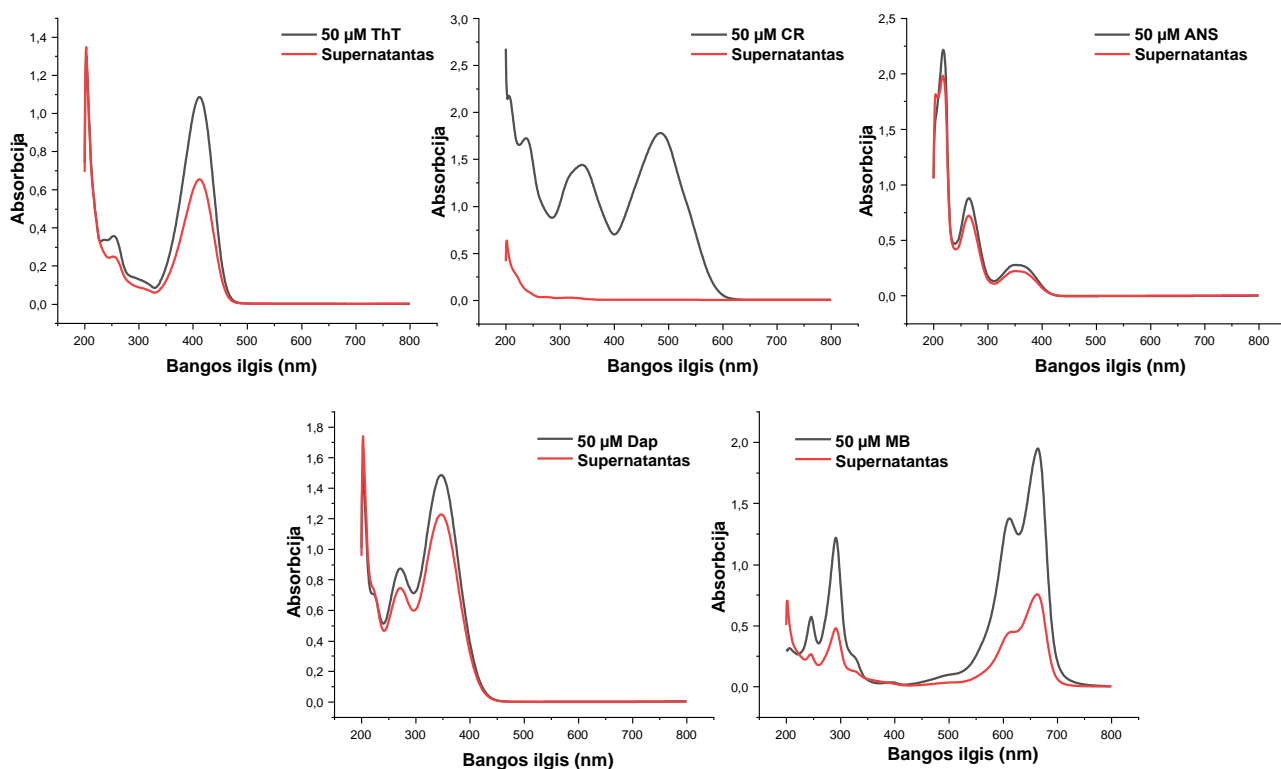
Vis dėlto šių dažų sąveikos yra gana mažos, tačiau kitų trijų dažų porų atvejais pastebime labai didelį skirtumą tarp spektrų (3.3. pav.)



3.3. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, kurie gauti sudėjus atskirus dviejų pavienių dažų absorbcijos spektrus (raudona spalva) arba mėginyje esant dviems dažams (juoda spalva).

Matome, kad maišant ThT-CR, CR-MB ir Dap-MB atsiranda žymiai didesni pokyčiai tarp spektrų intensyvumo ir absorbcijos maksimumo pozicijų, todėl daroma išvada, jog šios molekulės stipriai sąveikauja tarpusavyje, dėl ko gali pasikeisti jų jungimasis prie fibrilių paviršiaus ir dažų spektrinės savybės. Įdomu tai, kad yra pastebima labai stipri sąveika ir dideli sugerties spektrų pokyčiai CR esant mišinyje su ThT ir MB, tačiau CR kombinacijos su ANS ar Dap praktiškai neturi jokios įtakos tirpalų sugerčiai. Panaši situacija yra pastebima ir MB atveju, kuomet MB poroje su ThT ar ANS spektrai beveik nesiskiria.

Toliau buvo atliekami tyrimai, norint įvertinti kaip pavieniai dažai jungiasi prie insulino fibrilių. Sumaišius pavienius dažus (galutinė dažo koncentracija mėginyje 50 μM) su insulino fibrilėmis, mėginiai buvo inkubuojami kambario temperatūroje, nucentrifuguojami ir matuojama surinkto supernatanto absorbcija 200-800 nm bangos ilgio srityje. Šiame ir tolimesniuose tyrimuose spektrai buvo gauti apskaičiuavus trijų matavimų sugerties verčių vidurkius. Visais atvejais nustatytos dažų koncentracijos paklaida yra 0,1 μM arba mažiau. Šie sugerties spektrai palyginti su pradiniais, žinomos koncentracijos pavienių dažų tirpalų spektrais (3.4. pav.).



3.4. pav. Pavienio 50 μM dažo ir mėginio, kuriame yra 50 μM dažo ir rekombinantinio žmogaus insulino amiloidinės fibrilės, supernatanto sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse.

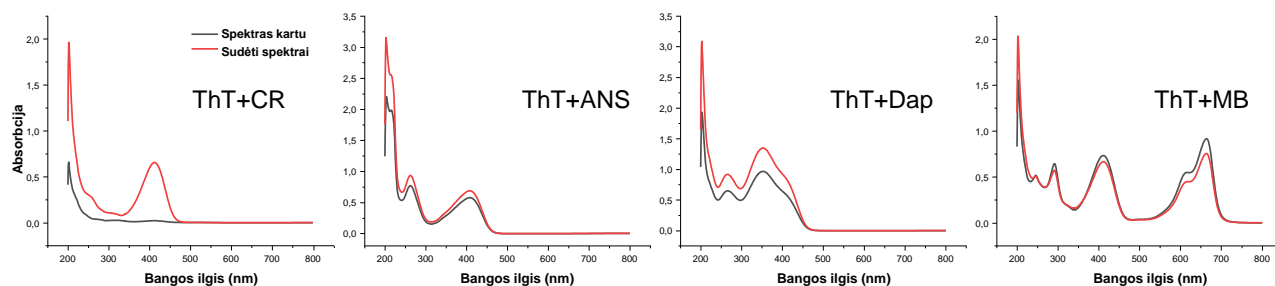
Naudojant anksčiau gautas dažų ekstinkcijos koeficiento vertes, buvo apskaičiuota kiek kiekvieno dažo buvo prijungta prie amiloidinių fibrilių paviršiaus. Kadangi pradinė dažo koncentracija prieš centrifuguojant mėginius buvo 50 μM , pagal supernatantų absorbcijos vertes galima matyti, jog visais atvejais sugerties maksimumo intensyvumas pasikeičia, tai reiškia, jog dažo koncentracija tirpale sumažėja ir ši dalis po centrifugavimo lieka prisijungusi prie fibrilių. Matome, kad mažiausiai prie fibrilių prisijungia Dap (8,7 μM) ir ANS (10,4 μM), šiek tiek daugiau ThT (19,9 μM) ir MB (30,6 μM). O prie insulino fibrilių yra prijungiamos beveik visos CR molekulės (49,9 μM). 3.1. lentelėje pateikiamos apskaičiuotos prijungto dažo koncentracijos, tiriant pavienius dažus.

3.1. lentelė. Prie insulino amiloidinių fibrilių prijungto pavienio dažo koncentracijos ir sugertis kiekvienam dažui specifiniame bangos ilgyje.

Dažas	Bangos ilgis (nm)	Sugertis	Laisvo dažo konc. (μM)	Prijungto dažo konc. (μM)
ThT	412	0,7	30,1	19,9
CR	486	<0,1	0,1	49,9
ANS	351	0,2	39,6	10,4
Dap	348	1,2	41,3	8,7
MB	664	0,8	19,4	30,6

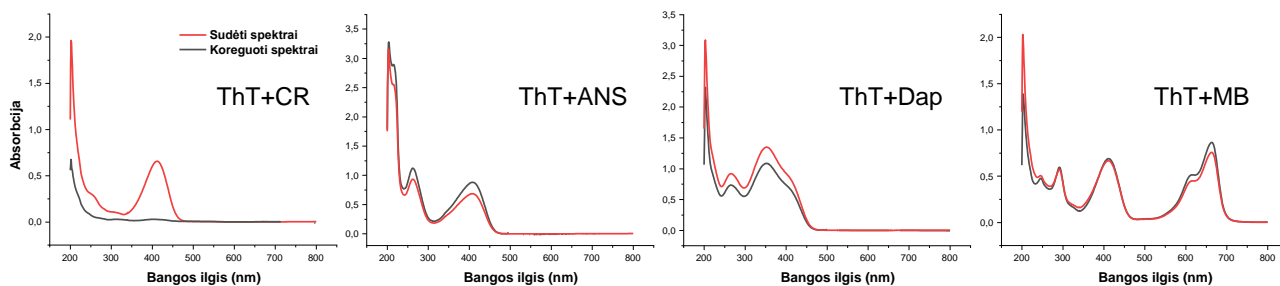
Taip pat galima pastebėti, kad beveik visų dažų atvejais, spektrai prieš ir po dažų prisijungimo prie fibrilių turi panašią formą, tik skirtingą sugerties intensyvumą, tačiau MB atveju 612 nm ir 664 nm bangos ilgio sugerties maksimumai sumažėja neproporcingai. Tai gali būti dėl dažo tirpale esančių priemaišų ar pačio dažo molekulių modifikacijų, kaip oksidacija ar redukcija, dėl kurių pasikeičia afiniškumas fibrilių paviršiui.

Tuomet buvo pradėtas analizuoti dviejų dažų kombinacijų poveikis jų jungimuisi prie insulino amiloidinių fibrilių. Kadangi ThT yra vienas iš dažniausiai naudojamų fluorescencinių dažų amiloidų tyrimuose, jo sąveika su kitomis dažų molekulėmis ir kaip keičiasi jo jungimasis prie fibrilių paviršiaus buvo tiriama pirmiausia (3.1.5. pav.).



3.5. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – insulino fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba dviejų dažų - insulino fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

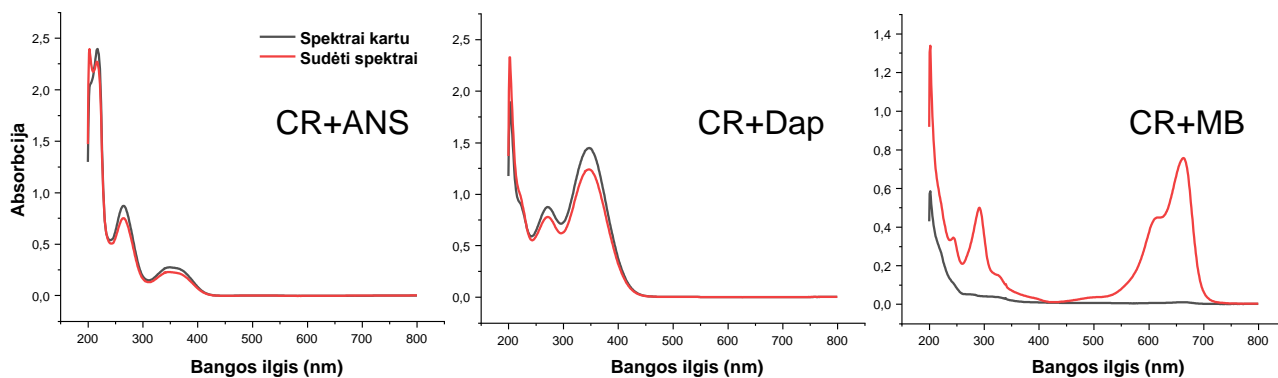
Vienu atveju buvo nuskenuojamas vieno dažo – fibrilių mišinio supernatanto, tuomet antro dažo – fibrilių mišinio supernatanto sugerties spektrai ir jie sudedami (sudėti spektrai). Kitu atveju nuskenuojamas supernatanto absorbcijos spektras, kuomet mėginyje yra sumaišomi du dažai ir amiloidinės fibrilės (spektras kartu). Kaip matome 3.5. pav., ThT kombinacijos su ANS ar MB neturi didelio skirtumo tarp supernatanto su abiem dažais ir sudėtų atskirų supernatantų spektrų, šiek tiek labiau skiriasi spektrai ThT poroje su Dap, tačiau ypač ryškūs pokyčiai yra matomi esant ThT kartu su CR. Kaip jau buvo pastebėta anksčiau, šie dažai stipriai sąveikauja tarpusavyje, todėl yra būtina šių supernatantų spektrų korekcija (3.1.6. pav.), kuri aprašyta metodų 2.4.4. skyriuje.



3.6. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – insulino fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytą dviejų dažų - insulino fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

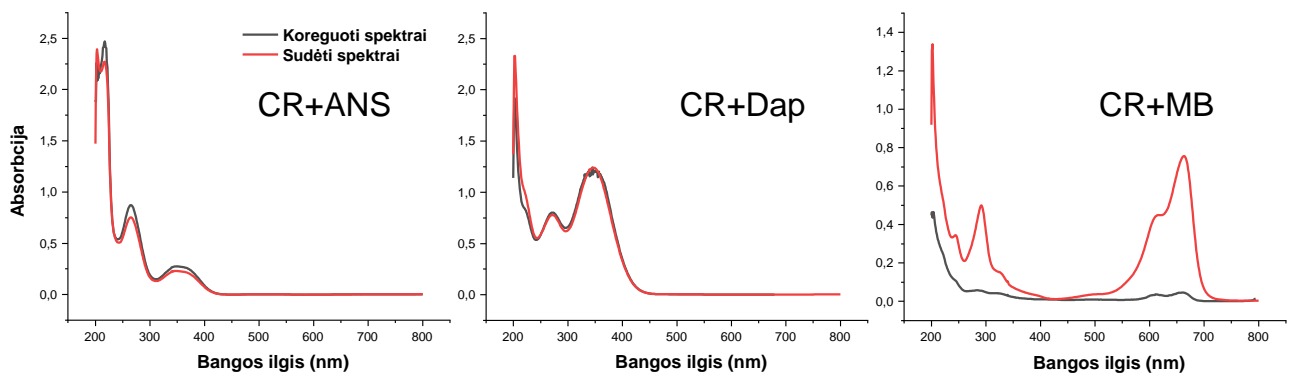
Atlikus supernatantų spektrų korekciją yra matoma, kad ThT-Dap ir ThT-MB spektrų skirtumai šiek tiek sumažėja, tačiau nėra visiškai panaikinami. Vis dėlto šie spektrai yra gana panašūs tarpusavyje, išskyrus ThT-CR atvejį, kuomet matomas labai didelis spektrų skirtumas, nes ThT būdingas sugerties maksimumas esant 412 nm bangos ilgiui išnyksta ir absorbcija yra beveik lygi nuliui. Tai parodo, kad esant tirpale kartu CR ir ThT molekulėms, jos sąveikaudamos tarpusavyje padidina ThT afiniškumą fibrilių paviršiui ir prie jo prisijungia beveik visos tirpale esančios dažo molekulės (48,8 μM), o CR koncentracija taip pat minimaliai padidėja vos per 0,1 μM (49,7 μM). Palyginus sudėtų ir dažų kartu sugertis, matome, kad ThT-ANS ir ThT-MB porose, koreguoto spektro absorbcijos intensyvumas yra didesnis nei sudėtų, o tai parodo, jog prie agregatų jungiama mažiau dažų molekulių. ThT ir ANS prijungtų dažų koncentracija sumažėja atitinkamai iki 11,1 μM ir 2,5 μM . Kombinacijoje su MB, šis efektas ne toks ryškus, ThT koncentracija sumažėja vos 1 μM (prijungto konc. 18,9 μM), o MB – 2,8 μM (27,9 μM). Panašiai kaip mišinyje su CR, taip ir su Dap, koreguoto spektro sugertis yra mažesnė, todėl laisvo dažo molekulių supernatante yra mažiau (prijungto ThT konc. 26,2 μM , Dap - 16,7 μM , o tai Dap atveju yra beveik du kartus daugiau, nei prijungiama esant tirpale pavieniui dažui).

Dar vienas dažnai naudojamas amiloidofilinis dažas yra CR, todėl toliau buvo analizuojamos jo sąveikos su kitais dažais (3.7. pav.).



3.7. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – insulino fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba dviejų dažų - insulino fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

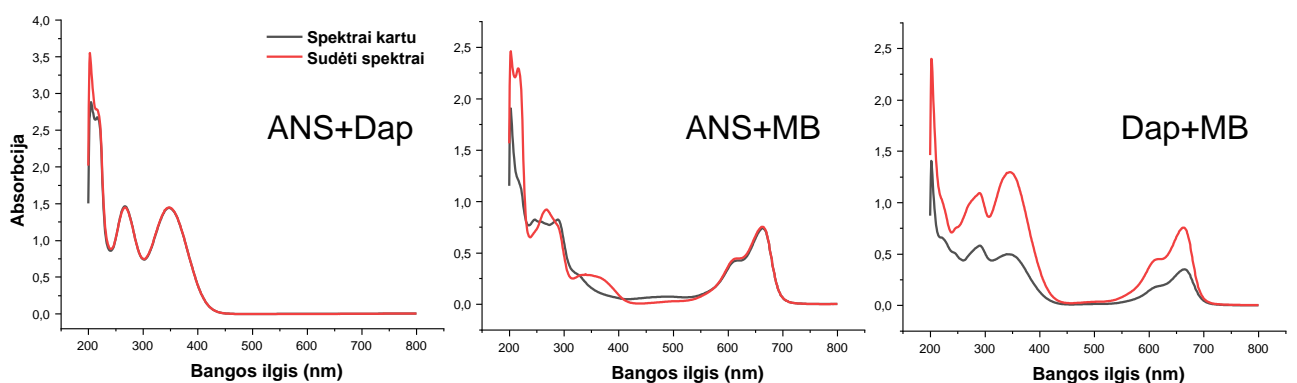
Kaip ir ThT atveju, yra pastebimi įvairūs spektrų skirtumai. Esant CR poroje su ANS supernatanto su abiem dažais ir atskirų dažų supernatantų sudėti spektrai beveik nesiskiria, šiek tiek ryškesni skirtumai yra CR ir Dap kombinacijoje. Vis dėlto kaip ir tiriant dažų sąveikas be fibrilių, taip ir mėginių su fibrilėmis supernatantų sugerties spektrai esant CR su MB matomi kardinalūs skirtumai. Todėl buvo atlikta spektrų korekcija, kad įvertinti koks yra tikrasis dviejų dažų su fibrilėmis mėginių supernatantų absorbcijos spektras (3.8. pav.).



3.8. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – insulino fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytų dviejų dažų - insulino fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

Atlikus spektrų korekciją, matome, kad ANS ir Dap atvejais skirtumai žymiai sumažėjo, tačiau CR-MB spektrai vis dar neidentiški. Visų specifinių MB sugerties maksimumų intensyvumai, esant 246, 292, 612, 664 nm bangos ilgiams yra stipriai sumažėję ir siekia mažiau nei 0,1. Kadangi koreguota CR-ANS atveju sugertis yra didesnė nei pavienių dažų supernatantų absorbcija, tai parodo, kad tirpale lieka daugiau dažų molekulių (prijungto CR konc. 49,2 μM , ANS – 4,0 μM). Kombinuojant CR su Dap, CR afiniškumas fibrilių paviršiui nekinta, o Dap šiek tiek sumažėja (prijungto konc. 3,0 μM). Galiausiai pastebime ryškų sugerties sumažėjimą CR-MB derinyje, o tai parodo, kad šie dažai sąveikaudami tarpusavyje, padeda ir vienas kitam jungtis prie insulino amiloidinių fibrilių. Prijungto MB koncentracija padidėjo net 1,6 karto (48,9 μM), o CR jungiasi visas.

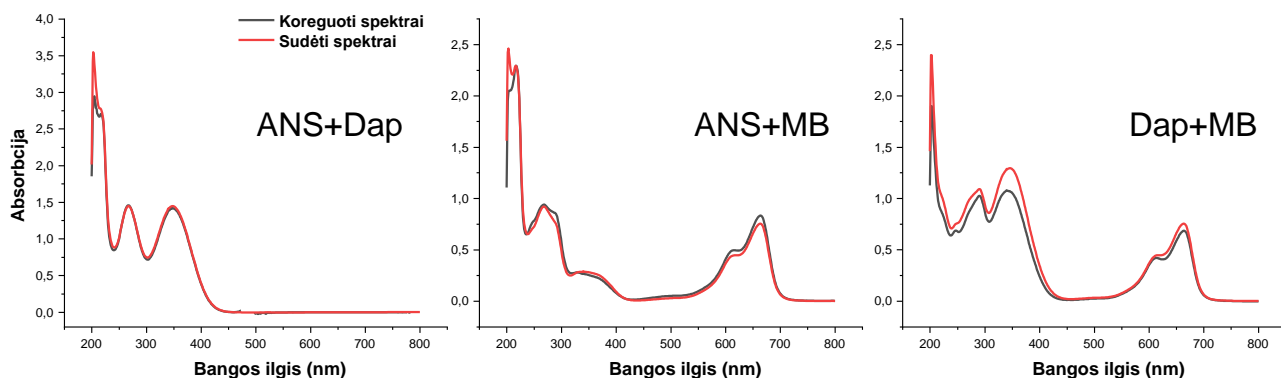
Vėliau analizuojama buvo likusių trijų dažų, kurie yra rečiau naudojami amiloidinių baltymų agregacijos tyrimuose, sąveikos (3.9. pav.).



3.9. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – insulino fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba dviejų dažų - insulino fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

Pirmieji ANS ir Dap kombinacijos mėginių supernatantų spektrai yra identiški, išskyrus 200-230 nm bangos ilgio srityje. Tačiau gana ryškūs skirtumai matomi ANS-MB ir Dap-MB atvejais.

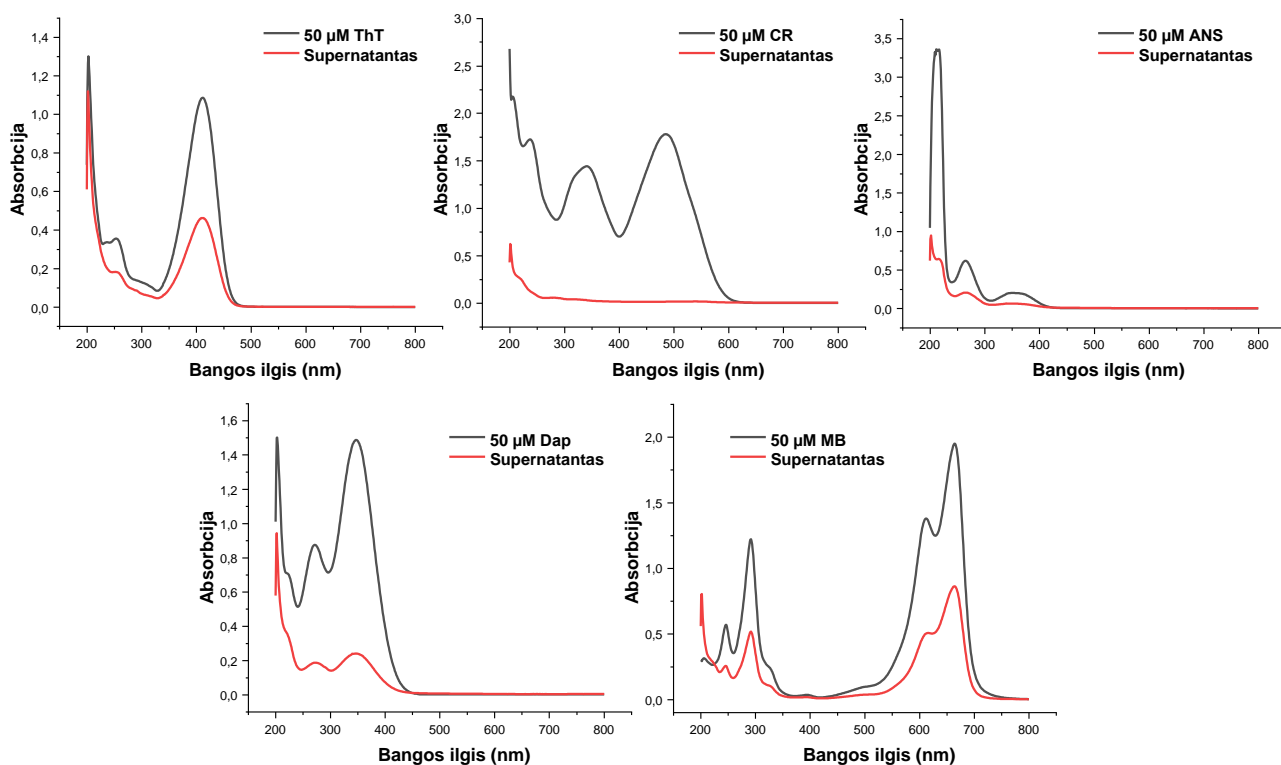
ANS-MB 600-700 nm bangos ilgio srityje sugerties vertės yra identiškios ir jokio skirtumo nepastebima, tačiau esminiai skirtumai yra pastebimi iki 550 nm bangos ilgio srityje. Dap-MB poros atveju, visos supernatantų sugerties maksimumo vertės yra skirtingos, tačiau spektrai išlaiko savo formą ir maksimumo poziciją. Toliau buvo atliekama šių sugerties spektrų korekcija (3.10. pav.).



3.10. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – insulino fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytų dviejų dažų - insulino fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

Kaip ir prieš korekciją, ANS-Dap spektrai išlieka beveik identiški, tačiau yra pastebimas ANS-MB ir Dap-MB spektrų ryškus skirtumų sumažėjimas. ANS-MB abiejų supernatantų maksimumo pozicijos išlieka vienodos, tik šiek tiek skiriasi absorbcijos intensyvumas, o Dap-MB spektrų intensyvumų skirtumai stipriai sumažėja, tačiau visiškai neišnyksta. Kaip ir matoma pagal ANS-Dap spektrą, šių dažų afiniškumas fibrilių paviršiui beveik nesikeičia, ANS prijungiama daugiau vos 0,6 μM (prijungto konc. 9,0 μM), o Dap daugiau 1,4 μM (10,0 μM). ANS derinant su MB yra prijungiama mažiau dažų (MB konc. mažesnė 0,8 μM), o Dap kombinacijoje su MB – daugiau šių dažų molekulių (MB konc. didesnė 1,8 μM). Tačiau šį kartą pastebime didelį Dap koncentracijos padidėjimą, net 1,9 karto (prijungto konc. 16,3 μM).

Toliau buvo tiriama ir analizuojama pavienių dažų sąveika su lizocimo amiloidinėmis fibrilėmis (3.11. pav.). Kaip ir insulino atveju, yra pastebimas sugerties intensyvumo sumažėjimas lyginant su pavienio dažo absorbcijos intensyvumais specifinėse maksimumo pozicijose.



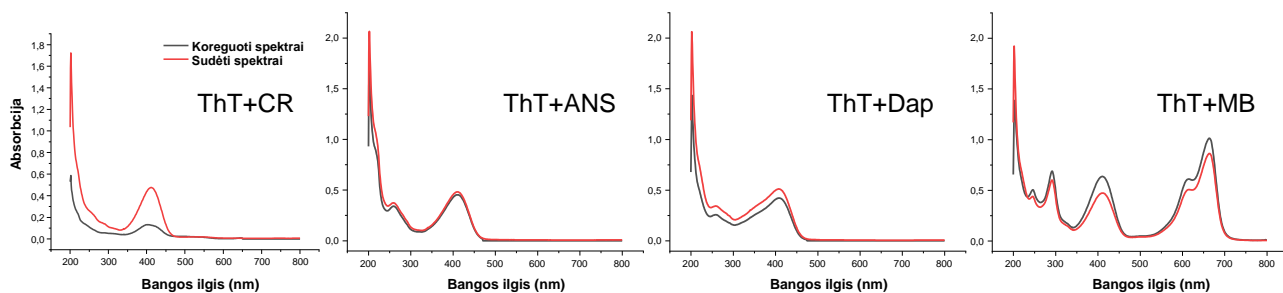
3.11. pav. Pavienio 50 μM dažo ir mėginio, kuriame yra 50 μM dažo ir vištos kiaušinio baltymo lizocimo amiloidinės fibrilės, supernatanto sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse.

Tačiau šį kartą matome, kad mažiausiai dažo molekulių prijungta MB (27,9 μM) ir ThT (28,7 μM) atvejais, o ANS (38,5 μM) ir Dap (41,9 μM) yra prijungiama žymiai daugiau, nei prie insulino fibrilių. Vis dėlto daugiausiai prie amiloidinių fibrilių prisijungia dažo CR molekulių (49,6 μM), kaip ir eksperimentuose su insulino fibrilėmis. Šie rezultatai parodo, kad dažų afiniškumas skiriasi jungiantis prie kitokių amiloidinių fibrilių ir jis yra savitas fibrilių konformacijoms. Apskaičiuotos prijungto pavienio dažo koncentracijos pateiktos 3.2. lentelėje ir toliau analizuojami spektrai siejami su šiomis vertėmis.

3.2. lentelė. Prie lizocimo amiloidinių fibrilių prijungto pavienio dažo koncentracijos ir sugertis kiekvienam dažui specifiniame bangos ilgyje.

Dažas	Bangos ilgis (nm)	Sugertis	Laisvo dažo konc. (μM)	Prijungto dažo konc. (μM)
ThT	412	0,5	21,3	28,7
CR	486	<0,1	0,4	49,6
ANS	351	<0,1	11,5	38,5
Dap	348	0,2	8,1	41,9
MB	664	0,9	22,1	27,9

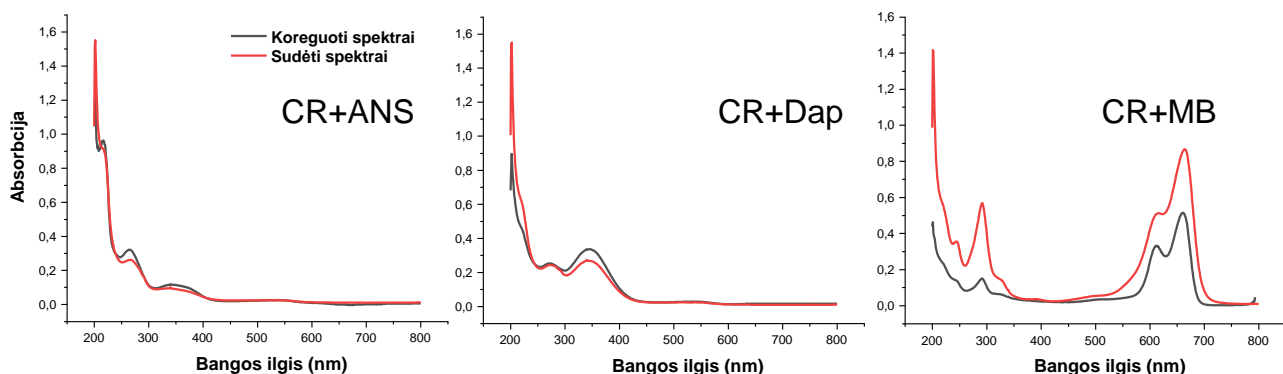
Kadangi prijungiamų pavienių dažų koncentracijos skiriasi nuo insulino agregatų tyrimo, toliau buvo analizuojama, kaip sąveikauja amiloidofiliniai dažai, ar jie konkuruoja tarpusavyje jungiantis prie lizocimo amiloidinių fibrilių ir ar yra pastebima esminių skirtumų tarp jų afiniškumo insulino fibrilių paviršiui. Taip pat insulino amiloidinių fibrilių atveju buvo pastebėta, kad atsiranda esminių sugerties spektrų pokyčių, dėl dviejų dažų tarpusavio sąveikos, todėl tolimesnių tyrimų metu analizuojami tik absorbcijos spektrai po jų korekcijos. Kaip ir anksčiau analizuotu atveju, pirmiausia buvo lyginamos ThT kombinacijos su kitais dažais ir kokie yra skirtumai tarp dviejų dažų su fibrilėmis bei pavienių dažų supernatantų sudėtų spektrų (3.12. pav.).



3.12. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – lizocimo fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytą dviejų dažų - lizocimo fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

Kaip ir insulino agregatų tyrimų metu, buvo pastebėta, kad ThT būnant poroje su CR bei Dap koreguota sugertis yra mažesnė, nei sudėjus atskirų dažų absorbcijos vertes, o tai parodo, kad mėginio supernatante lieka mažiau dažo molekulių. Vis dėlto prie lizocimo fibrilių yra prijungiamas ne visas ThT (prijungto konc. 44,5 μM), 4,3 μM mažiau nei prie insulino agregatų, o CR jungiasi tik 0,4 μM daugiau (prijungto konc. 49,4 μM), nei pavienis dažas. Kombinacijoje su Dap, abiejų dažų tirpale lieka šiek tiek mažiau (ThT prijungto konc. 32,2 μM , Dap – 44,0), tačiau šis efektas yra silpnesnis nei šiems dažams sąveikaujant su insulino fibrilėmis. Visgi pastebimas ir kitoks dažų sąveikos poveikis, nei prieš tai atliktame tyrime, ThT-ANS dažų prijungiama truputį daugiau nei pavienių, atitinkamai 1,3 μM ir 1,4 μM . Vienintelio ThT-MB atveju afiniškumas fibrilių paviršiui sumažėja (prijungto ThT konc. 21,2 μM , MB – 24,1 μM).

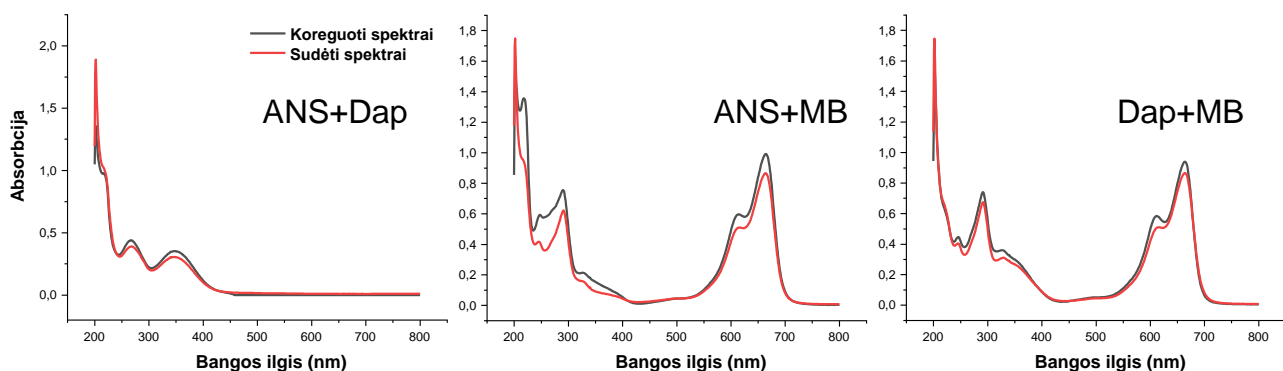
Tuomet buvo tiriamas CR ir kitų dažų jungimasis prie lizocimo amiloidinių fibrilių ir analizuojamos šių dažų sąveikos ir sugerties spektrai (3.13. pav.).



3.13. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – lizocimo fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytų dviejų dažų - lizocimo fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

CR kombinacijose su ANS ir Dap pastebimas prisijungusių dažų koncentracijos sumažėjimas, tačiau pirmu atveju prisijungusio CR lieka beveik tiek pat (48,7 μM), o ANS sumažėja 3,0 μM . Panaši situacija yra ir su Dap, CR koncentracija nesikeičia (49,6 μM), o Dap sumažėja 2,2 μM . Visgi šiek tiek kitokį poveikį matome derinyje su MB, kai CR prijungiama beveik tiek pat, o MB koncentracija išauga 1,6 karto, kaip ir jungiantis prie insulino agregatų.

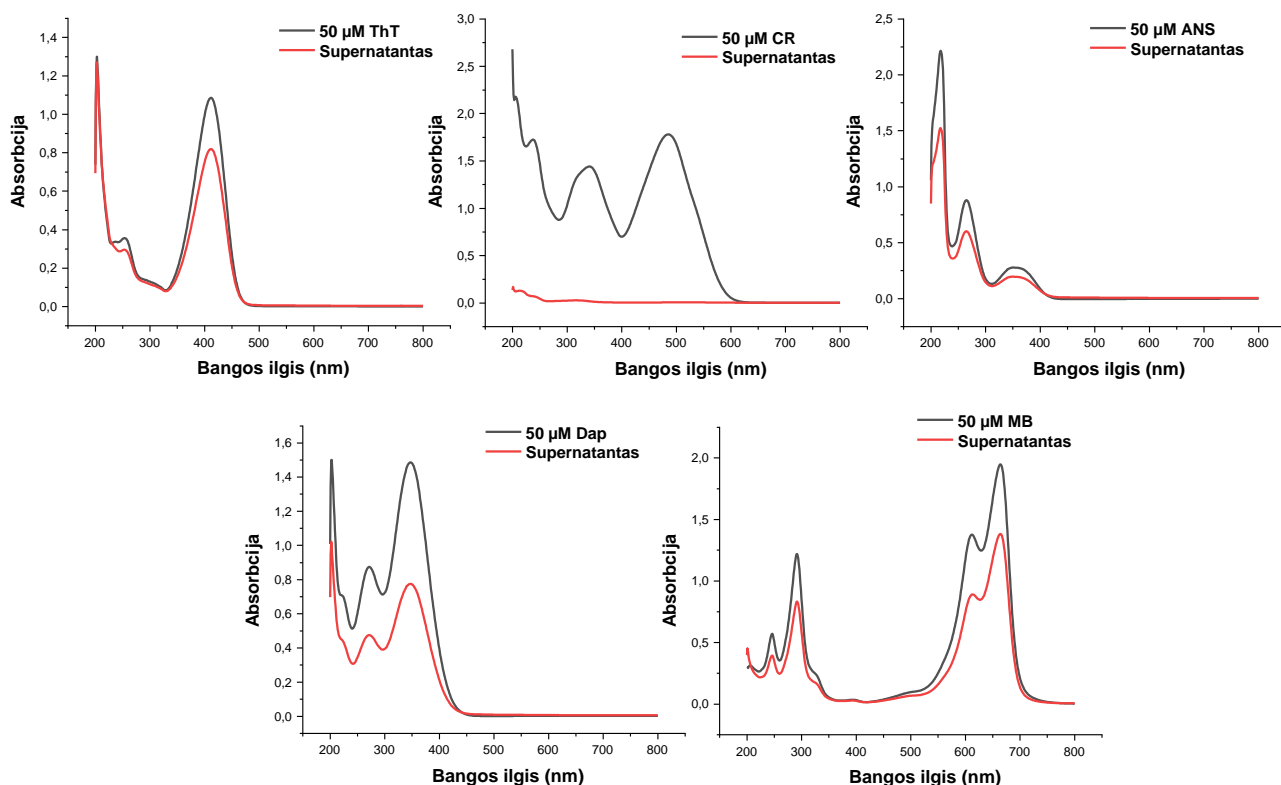
Galiausiai buvo analizuojamos likusios dažų poros. Pagal 3.14. pav. pastebime, kad sugerties maksimumo pozicijos visais atvejais išlieka vienodos, tačiau skiriasi absorbcijos intensyvumas lyginant dviejų dažų kartu su fibrilėmis ir pavienių dažų supernatantų sudėtus spektrus.



3.14. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – lizocimo fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytų dviejų dažų - lizocimo fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

Galima matyti, kad visais trimis atvejais tirpale lieka daugiau dažų molekulių, nei po mėginių centrifugavimo su pavieniais dažais. Vis dėlto šie koncentracijų pokyčiai yra nedideli, dažų molekulių sumažėja tik iki 3,3 μM , išskyrus ANS-MB derinį, kuomet ANS prijungiama net 10,3 μM mažiau. Šie rezultatai panašūs į tyrimo su insulino amiloidinėmis fibrilėmis rezultatus, išskyrus Dap-MB porą, kurių buvo prijungiama daugiau nei pavienių dažų atskirai.

Galiausiai absorbcijos tyrimai buvo atlikti su pelės prioninio baltymo fibrilėmis. Pavienių dažų ir mėginių su fibrilėmis supernatantų palyginimas pavaizduotas 3.15. pav.



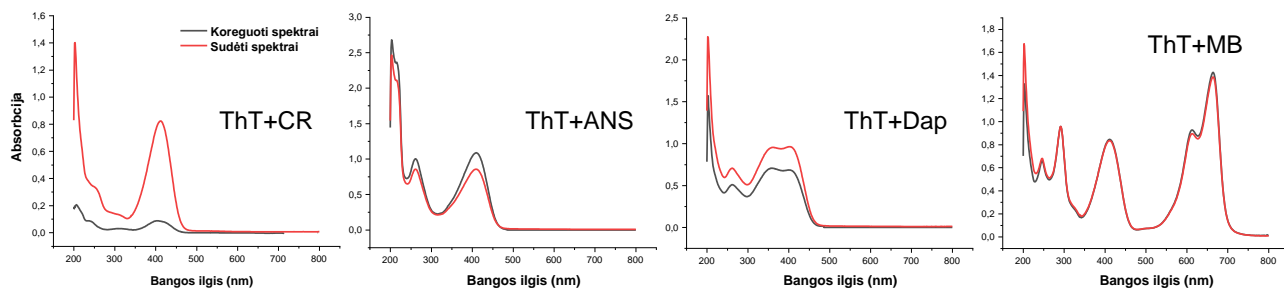
3.15. pav. Pavienio 50 μM dažo ir mėginio, kuriame yra 50 μM dažo ir pelės prioninio baltymo (MoPrP) amiloidinės fibrilės, supernatanto sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse.

Kaip ir ankstesniais atvejais, beveik visos CR molekulės prisijungia prie prioninio baltymo fibrilių (49,9 μM), o visų kitų dažų prijungiama yra mažiau nei pusė dažo molekulių – mažiausiai ThT (12,3 μM), šiek tiek daugiau MB (14,5 μM) ir ANS (14,7 μM) ir beveik pusė Dap molekulių (23,9 μM). Naudojant dažų ekstinkcijos koeficiento reikšmes ir sugertį tame bangos ilgyje apskaičiuotos prijungto pavienio dažo koncentracijos vertės pavaizduotos 3.3. lentelėje.

3.3. lentelė. Prie pelės prioninio baltymo amiloidinių fibrilių prijungto pavienio dažo koncentracijos ir sugertis kiekvienam dažui specifiniame bangos ilgyje

Dažas	Bangos ilgis (nm)	Sugertis	Laisvo dažo konc. (μM)	Prijungto dažo konc. (μM)
ThT	412	0,8	37,8	12,2
CR	486	<0,1	0,2	49,8
ANS	351	0,2	35,3	14,7
Dap	348	0,8	26,1	23,9
MB	664	1,4	35,5	14,5

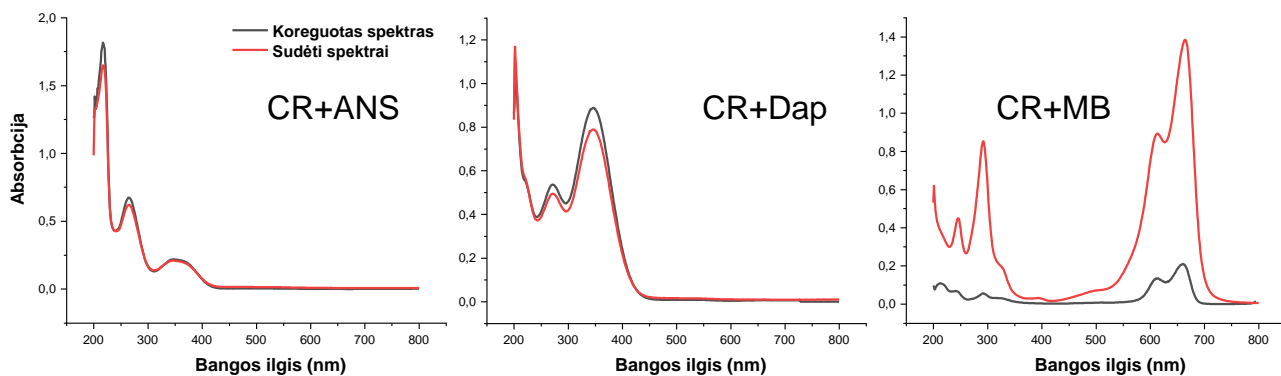
Kaip ir ankstesniais bandymais, pirmiausia buvo analizuojama ThT sąveika su kitų dažų molekulėmis (3.16. pav.)



3.16. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – pelės prioninio baltymo (MoPrP) fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytų dviejų dažų - MoPrP fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

Analizuojant šiuos paveikslus, pastebime, kad ThT derinant su CR ir Dap, jungiamų dažų molekulių padidėja. CR prijungiamas visas, o ThT koncentracija siekia 45,8 μM , padidėjant net 3,7 karto. Sąveikaujant su Dap, jungiamo ThT koncentracija padidėja beveik 2 kartus, o Dap – 6,5 μM . Likusių kombinacijų metu dažų molekulių supernatante lieka daugiau, nei esant tirpale vienam dažui. Sąveikaujant ThT ir ANS, prijungtų dažo molekulių koncentracija sumažėja atitinkamai iki 1,8 μM ir 11,1 μM , o ThT-MB atveju, koncentracijos sumažėjo minimaliai, atitinkamai 0,5 μM ir 1,0 μM .

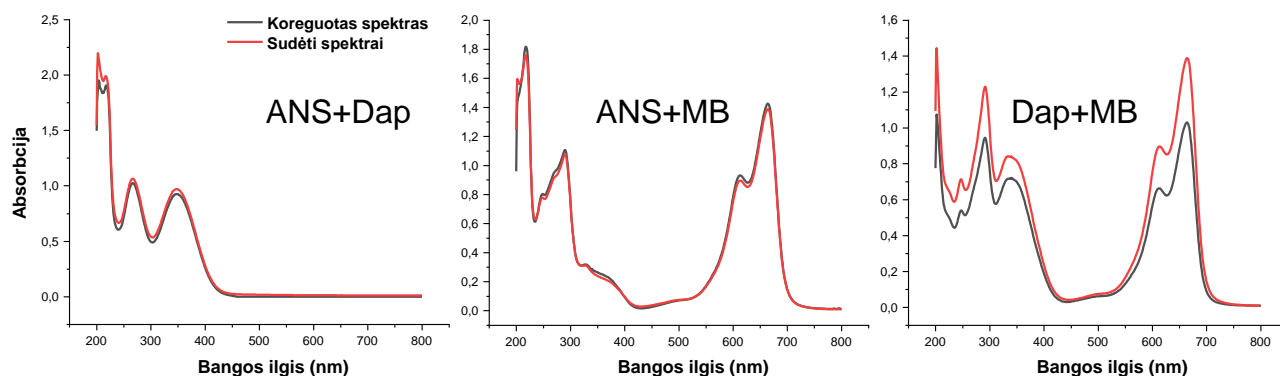
Toliau buvo analizuojamos CR sąveikos su trimis dažais, kaip ir ankstesniais atvejais (3.17. pav.).



3.17. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – pelės prioninio baltymo (MoPrP) fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytų dviejų dažų - MoPrP fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

Visais atvejais prie amiloidinių fibrilių yra prijungiamas visos CR molekulės. Tačiau ANS ir Dap supernatante lieka daugiau (atitinkamai prijungto ANS konc. sumažėja iki 12,4 μM , o Dap 20,2 μM). Tačiau sąveikaujant CR su MB, jie vienas kitam padeda jungtis prie amiloidinių fibrilių paviršiaus, MB afiniškumas joms žymiai padidėja, net 3 kartus (44,8 μM). Panašūs rezultatai buvo gauti jungiantis tiek prie insulino, tiek lizocimo agregatų.

Galiausiai buvo analizuotos ANS sąveikos su Dap ir MB, bei Dap su MB (3.18. pav.).



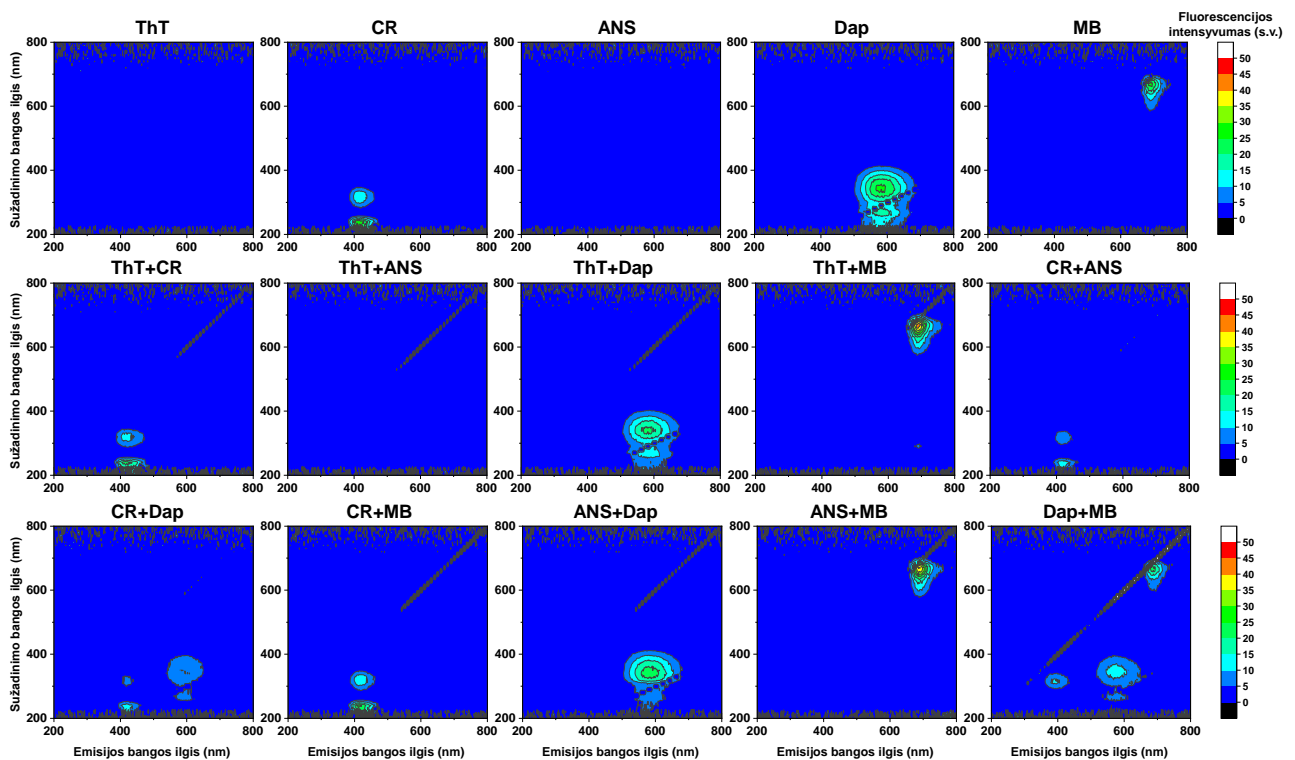
3.18. pav. Sugerties spektrai 200-800 nm bangos ilgio srityse, gauti sudėjus nuskenuotus atskirus dažų – pelės prioninio baltymo (MoPrP) fibrilių supernatantus (raudona spalva) arba pakoregavus nuskenuotą sumaišytų dviejų dažų - MoPrP fibrilių mišinio supernatantą (juoda spalva).

ANS-Dap ir Dap-MB atvejais koreguoti spektrų intensyvumai yra mažesni nei sudėtų, kas parodo, jog prie prioninio baltymo fibrilių prisijungia daugiau dažų molekulių. Vis dėlto šis efektas nėra labai ryškus, prijungiama tik nedaugiau nei 3,6 μM , išskyrus MB, kurio koncentracija padidėja 9,2 μM . Priešingas reiškinys matomas ANS-MB atveju, kuomet abiejų dažų molekulių supernatante padidėja minimaliai, maždaug 1,0 μM .

3.2. Dažų sąveikos fluorescencijos tyrimas

Išanalizavus kaip keičiasi tirpalų sugerties spektrai ir prijungiamų prie fibrilių paviršiaus dažų koncentracijos, buvo norima ištirti ar būdami kartu mėginyje dažai keičia vienas kito fluorescencijos intensyvumus.

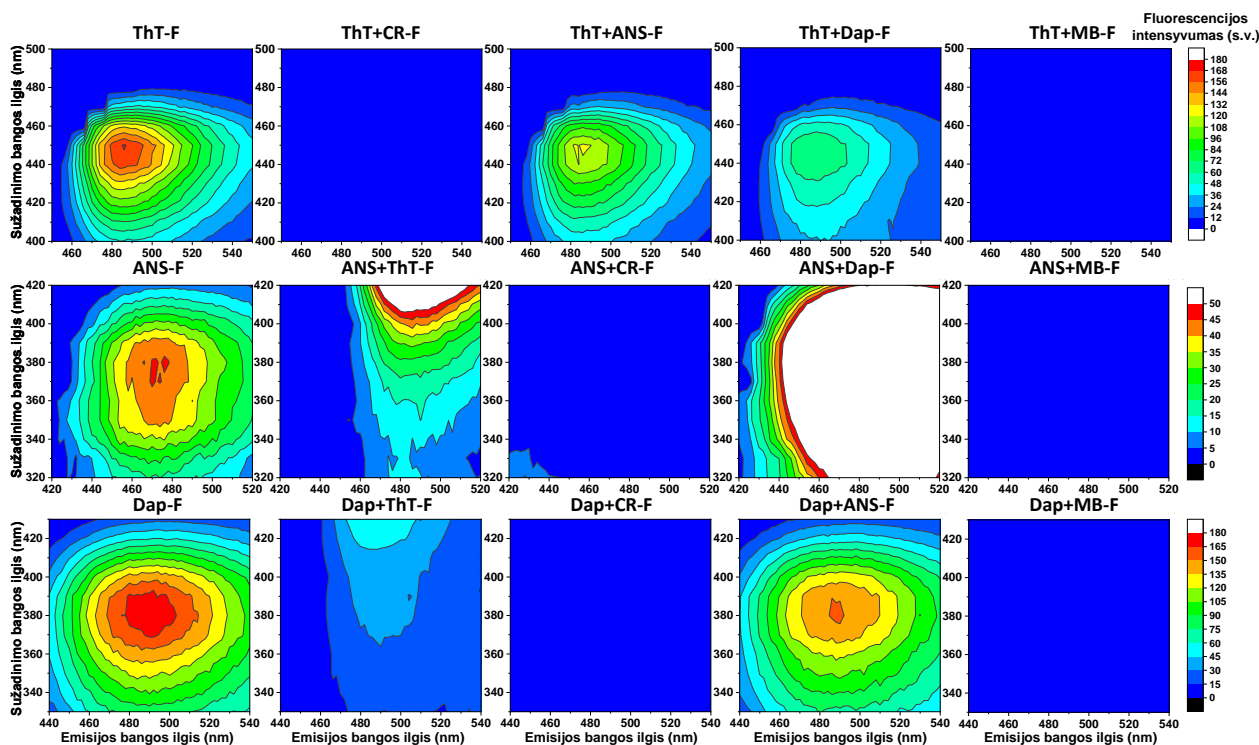
Pirmiausia buvo tikrinama ar dažai sąveikaudami tarpusavyje keičia vienas kito fluorescencijos intensyvumą ar jo maksimumo poziciją, kuomet mišinyje nėra amiloidinių fibrilių, kad atlikus tolimesnius tyrimus būtų galima daryti teisingas išvadas apie fluorescencijos pokyčius, prisijungiant dviems dažams prie agregatų paviršiaus (3.19. pav.).



3.19. pav. Pavienių dažų ir jų mišinių sužadinimo-emisijos matricos (EEM) 200-800 nm bangos ilgių srityse.

Lyginant dviejų dažų kartu sužadinimo-emisijos matricas su pavienio dažo, matome, kad ThT esant porose su kitais keturiais dažais, didelių pokyčių neatsiranda, tik su CR matomas nedidelis fluorescencijos padidėjimas iki 15 s.v., ties 300 nm sužadinimo ir 450 nm emisijos bangos ilgiais. ThT-Dap fluorescencijos intensyvumas, būdingoje Dap ties 600 nm emisijos bangos ilgio srityje, o MB būdingoje srityje pastebimas fluorescencijos intensyvumo padidėjimas iki 45 s.v.. Tačiau ryškesni skirtumai matomi kitų dažų kombinacijose su CR, kuomet CR-Dap yra nuslopinama abiems dažams būdingose srityse fluorescencija (atitinkamai ties 400 nm ir 600 nm emisijos bangos ilgiais), o CR-MB poroje pastarajam būdingoje srityje fluorescencija visiškai išnyksta. Sąveikaujant su ANS, CR fluorescencijos intensyvumas sumažėja. Įdomūs rezultatai yra matomi Dap-MB atveju, kuomet Dap būdingoje srityje (600 nm emisijos bangos ilgio) intensyvumas sumažėja, tačiau atsiranda kitoje srityje (maždaug ties 400 nm emisijos bangos ilgiu).

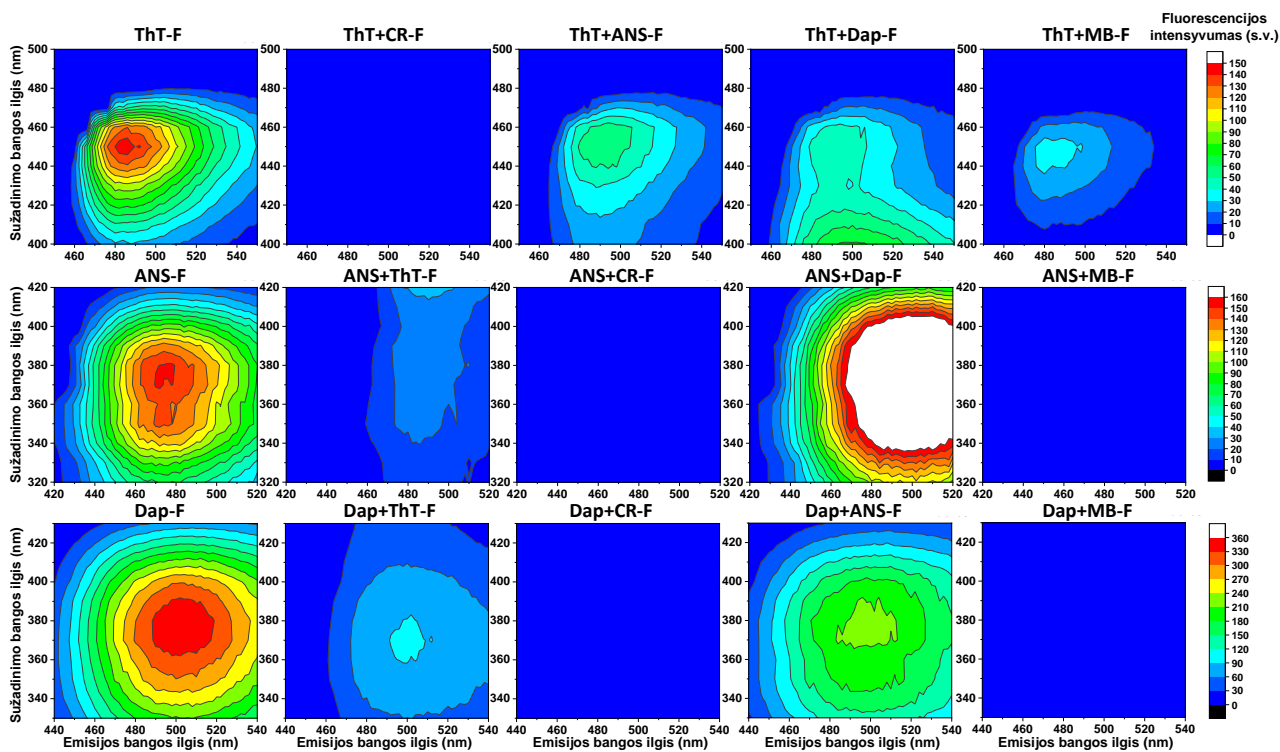
Kadangi CR ir MB atvejais nepadidėja fluorescencijos intensyvumas prisijungus dažui prie amiloidinių fibrilių, toliau buvo analizuojama tik ThT, ANS ir Dap fluorescencijos pokyčiai sąveikaujant su kitų dažų molekulėmis. Pirma buvo lyginami intensyvumo pokyčiais, dažams jungiantis prie insulino fibrilių (3.20. pav.).



3.20. pav. Pavienių dažų arba dviejų dažų mišinių su insulino fibrilėmis sužadinimo-emisijos matricos (EEM).

Lyginant šias sužadinimo-emisijos matricas (EEM), matome, jog visais atvejais sumaišius du dažus yra sumažinamas fluorescencijos intensyvumas tam dažui būdingose bangos ilgių srityse. ThT atveju matome, jog būnant pavieniui su fibrilėmis, šio dažo maksimalus intensyvumas yra esant 450 nm sužadinimo ir 490 nm emisijos bangos ilgiams ir siekia 180 s.v.. Sąveikaujant su kitais dažais, jo fluorescencijos intensyvumas sumažėja (ThT-ANS ir ThT-Dap), o kitais atvejais visiškai išnyksta (ThT-CR ir ThT-MB). Panašūs rezultatai pastebimi ir ANS kombinacijose su CR ir MB, tačiau čia matomi ir fluorescencijos intensyvumo padidėjimai kai kuriose srityse (ANS-ThT ir ANS-Dap), tačiau jie atsiranda dėl dviejų dažų spektrų persiklojimų, nes ThT būdinga fluorescencija 420 nm sužadinimo ir 490 nm emisijos bangos ilgių srityse, o Dap – 380 nm sužadinimo ir 490 nm emisijos bangos ilgio srityse. Taip pat ir Dap porose su ThT ir ANS yra matomas fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas, o derinyje su CR ir MB – visiškai fluorescencijos nuslopinimas.

Toliau buvo tikrinami fluorescencijos pokyčiai dažams jungiantis prie lizocimo amiloidinių fibrilių ir ar yra esminių skirtumų nuo anksčiau aptarto atvejo (3.21. pav.)

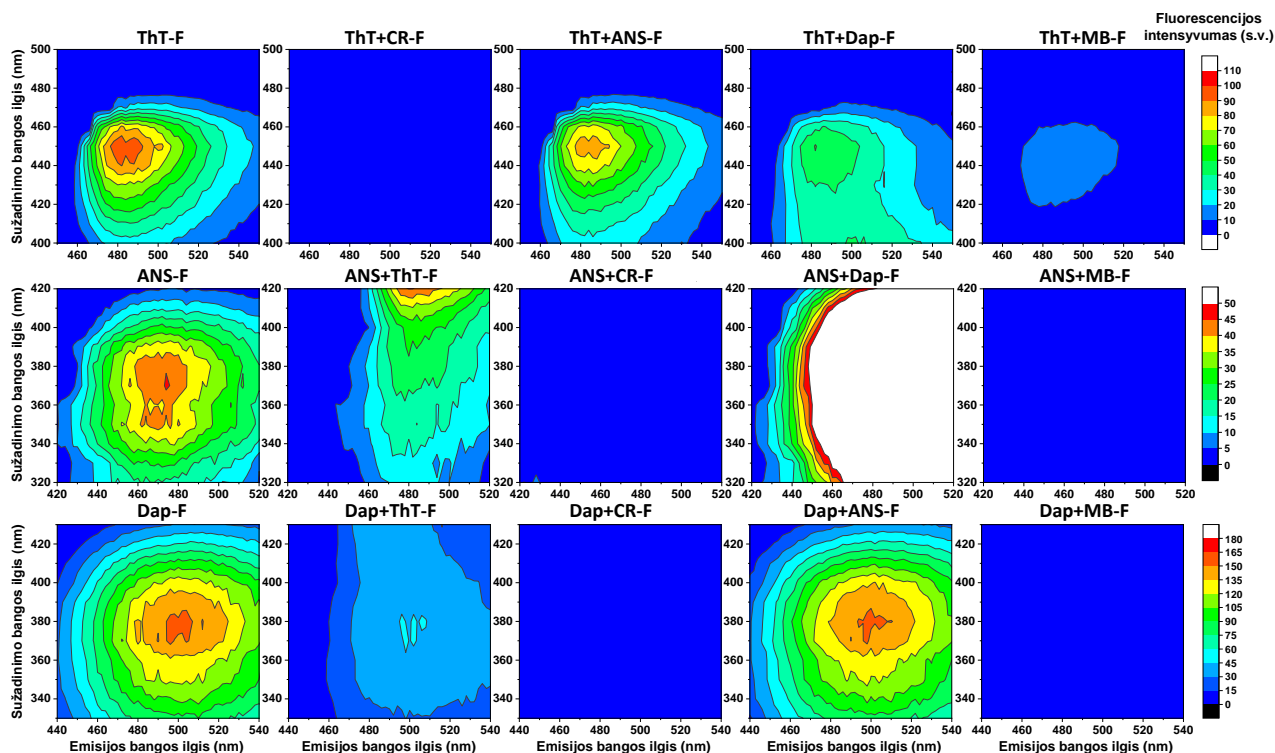


3.21. pav. Pavienių dažų arba dviejų dažų mišinių su lizocimo fibrilėmis sužadinimo-emisijos matricos (EEM).

Kaip ir insulino atveju, buvo analizuojamos trijų dažų (ThT, ANS ir Dap) sąveikos su kitais dažais. Galima matyti, kad visų šių dažų fluorescencija yra slopinama, jiems esant mišinyje su kitais junginiais. Tačiau yra pastebimi ir keli skirtumai tarp šio bandymo rezultatų ir anksčiau aptarto atvejo. ThT sąveikaujant su CR fluorescencija yra visiškai nuslopinama, o su ANS ir Dap pastebimas intensyvumo sumažėjimas. Tačiau įdomu tai, jog dažams jungiantis prie lizocimo amiloidinių fibrilių paviršiaus ThT fluorescencija visiškai neišnyksta kombinacijoje su MB, o yra tik stipriai nuslopinama, priešingai nei insulino atveju. ANS poroje su ThT fluorescencijos intensyvumas yra sumažėjęs, nors insulino atveju šioje srityje buvo stebimas dviejų dažų spektrų persiklojimas, o su CR ir MB fluorescencija visiškai nuslopinama. Kombinacijoje su Dap vėlgi yra matomas intensyvumo padidėjimas, dėl šių dviejų dažų persiklojusių spektrų. Dap sąveikaujant su ThT ir ANS fluorescencijos intensyvumas sumažėja, o su CR ir MB visai nuslopinamas, kaip buvo pastebima ir insulino fibrilių tyrimų metu. Dar vienas skirtumas nuo anksčiau aptarto atvejo yra tas, jog ANS ir Dap prisijungiant prie lizocimo amiloidinių fibrilių yra stebimas didesnis fluorescencijos intensyvumas.

Galiausiai šie tyrimai buvo pakartoti naudojant ir pelės prioninio baltymo amiloidines fibriles (3.22. pav.). Matome, jog ThT fluorescencijos intensyvumas sumažinamas sąveikaujant su ANS, Dap ir MB, o kombinacijose su CR visiškai nuslopinamas ir šie rezultatai yra panašūs į tyrimų, naudojant lizocimo amiloidines fibriles. ANS atveju pastebime intensyvumo sumažėjimą poroje su ThT, tačiau

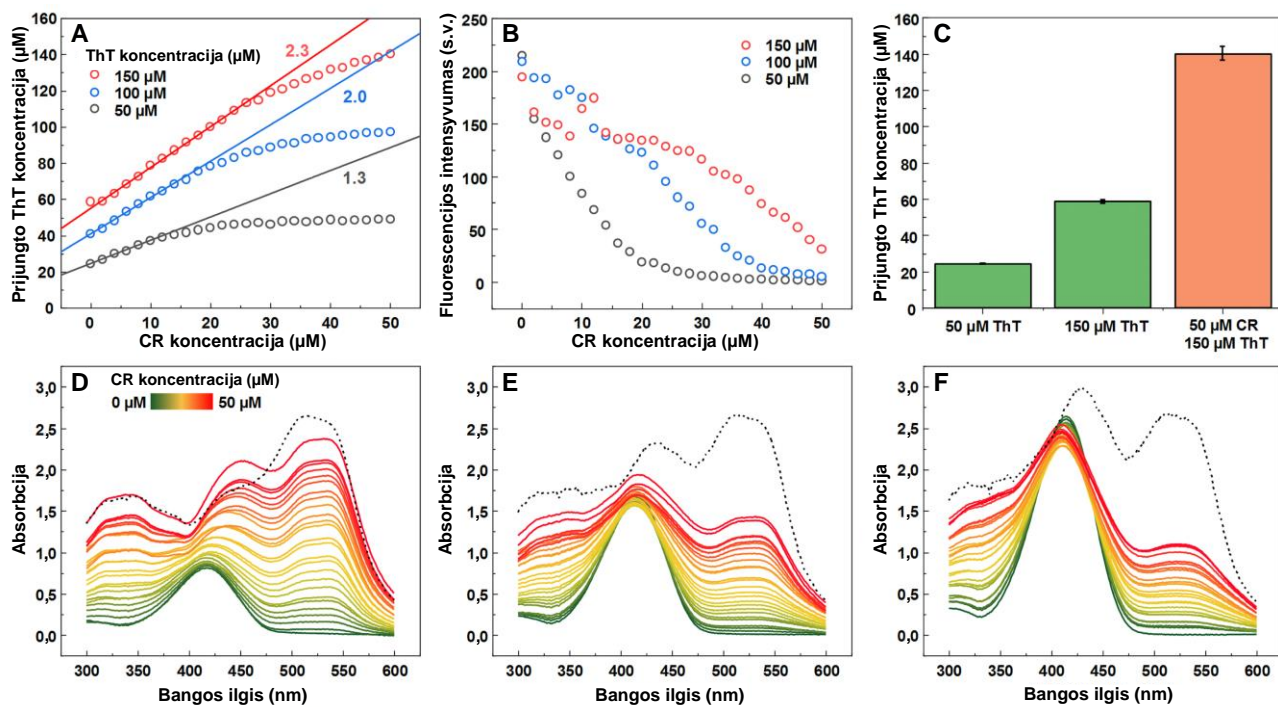
taip pat pastebimas ir nestiprus spektrų persiklojimas ties 420 nm sužadavimo bangos ilgio sritimi ir ryškų spektrų persiklojimą su Dap. Taip pat matome visišką fluorescencijos nuslopinimą deriniuose su CR ir MB. Be to jungiantis prie prioninio baltymo fibrilių maksimalus pasiekiamas intensyvumas yra panašus kaip ir insulino atveju (apie 50 s.v.), taip pat ir Dap (apie 165 s.v.). Dap kombinacijose su ThT ir ANS matome sumažėjusį fluorescencijos intensyvumą, o su CR ir MB – visišką nuslopinimą.



3.22. pav. Pavienių dažų arba dviejų dažų mišinių su pelės prioninio baltymo (MoPrP) fibrilėmis sužadavimo-emisijos matricos (EEM).

3.3. ThT ir CR sąveikos tyrimas

Kadangi didžiausia sąveika buvo pastebėta tarp ThT ir CR, nes šių dažų kombinacijoje matomas stipriausias fluorescencijos slopinimo efektas ir ryškiausias ThT afiniškumo fibrilėms pokytis, jų pora buvo tiriama detaliau.



3.23. pav. **A.** Prijungto prie insulino fibrilių ThT koncentracijos priklausomybė nuo CR ir pradinės ThT koncentracijų mėginyje. **B.** Fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo CR ir pradinės ThT koncentracijų mėginyje. **C.** Prijungto prie insulino fibrilių ThT koncentracija, esant skirtingoms pradinėms ThT koncentracijoms ir mišinyje esant ThT kartu su CR. **D-F** Sugerties priklausomybė nuo bangos ilgio, esant skirtingoms CR (0-50 μM) ir ThT (50 (**D**), 100 (**E**), 150 (**F**) μM) koncentracijoms mėginyje.

Paruošus fibrilių mėginius, kuriuose buvo galutinė 50, 100 ir 150 μM ThT koncentracija, buvo titruoti su CR, kurio galutinė koncentracija siekė iki 50 μM . Buvo pastebėta, kad esant mėginyje 50 μM ThT galutinei koncentracijai, šio dažo prijungiamo prie fibrilių koncentracija didėja tiesiškai, CR koncentracijai mėginyje esant nuo 0 μM iki 16 μM , t.y. didėjant CR koncentracijai mėginyje, prie fibrilių prisijungia vienodas kiekis ThT molekulių (3.23. pav. A). Toliau didinant CR koncentraciją, maždaug nuo 15 μM , prijungtų ThT molekulių kiekis kyla ne taip greitai, kol stabilizuojasi, tai reiškia, kad beveik visos ThT molekulės yra prijungtos prie fibrilių paviršiaus. Per šiuos taškus nubrėžtos kreivės nuokrypio koeficientas yra 1,3, o tai reiškia, kad viena CR molekulė vidutiniškai sukelia 1,3 ThT molekulių prijungimą prie fibrilių. Kuomet mėginyje galutinė ThT koncentracija yra 100 μM , yra pastebimas toks pats tiesiškas prijungtų ThT molekulių didėjimas, kai yra didinama CR koncentracija. Tačiau ši tiesė yra šiek tiek statesnė, jos nuokrypio koeficientas yra 2,0 ir daugiau taškų atitinka šią tiesę, kol yra pasiekiamas ThT molekulių įsisotinimas. Tai parodo, kad esant didesnei ThT koncentracijai, CR sukuriama didesnio ThT afiniškumo fibrilėms efektas veikia stipriau. Šiuo atveju prie fibrilių prijungtų molekulių skaičius pradeda mažėti esant tirpale maždaug 20 μM CR. Galiausiai kuomet galutinė ThT koncentracija mėginyje yra 150 μM , matoma statesnė kreivė, kurios nuokrypio koeficientas yra 2,3 ir į ją patenka dar daugiau taškų, t.y. CR koncentracija, kurioje pradeda prijungti prie fibrilių paviršiaus šiek tiek mažiau ThT molekulių yra 30 μM . Tačiau šiuo atveju

matome, kad prijungto ThT koncentracija nepasiekia išsotinimo, esant 50 μM CR koncentracijai. Tai gali reikšti, kad pasiekti ThT dažo išsotinimą reikėtų daugiau CR molekulių arba išsotinimas jau yra pasiektas.

Toliau buvo analizuojama kaip keičiasi fluorescencijos intensyvumas didėjant CR koncentracijai mėginyje esant 3 skirtingoms ThT koncentracijoms – 50 μM , 100 μM ir 150 μM (3.23. pav. B). Kuomet galutinė ThT koncentracija mėginyje yra maža, t.y. 50 μM , pradeda didėti CR koncentracijai mėginyje yra pastebimas staigus fluorescencijos intensyvumo kritimas, kuris sulėtėja esant 20 μM CR, kol galiausiai pasiekiamas visiškas fluorescencijos nuslopinimas. Tačiau esant 100 μM ThT, didėjant CR koncentracijai mėginyje iš pradžių fluorescencijos intensyvumas lieka stabilus ir pradeda gana staigiai kristi esant 10 μM CR koncentracijai. Ši kreivė įgyja sigmoidės formą, kuomet nuo maždaug 35 μM CR koncentracijos, fluorescencijos intensyvumas krenta lėčiau, kol pasiekia 0. Tiriant kaip keičiasi fluorescencijos intensyvumas esant galutinei 150 μM ThT koncentracijai, matome, kad gana stabilus fluorescencijos intensyvumas esant nedidelėms CR koncentracijoms išlieka ilgiau nei 100 μM ThT atveju. Tačiau kreivė neįgauna sigmoidės formos, nes fluorescencijos intensyvumas nepasiekia 0, kaip 50 ir 100 μM atvejais. Tikėtina, kad fluorescencijos intensyvumas visiškai sumažėtų ir taptų 0, reikia daugiau CR molekulių tirpale, kaip ir tiriant prijungtų ThT molekulių koncentraciją. Be to buvo pastebėta, kad esant mėginyje CR ir ThT yra prijungiama daugiau ThT molekulių, nei bendra jungiamo ThT koncentracija mėginiuose be CR (3.23. pav. C).

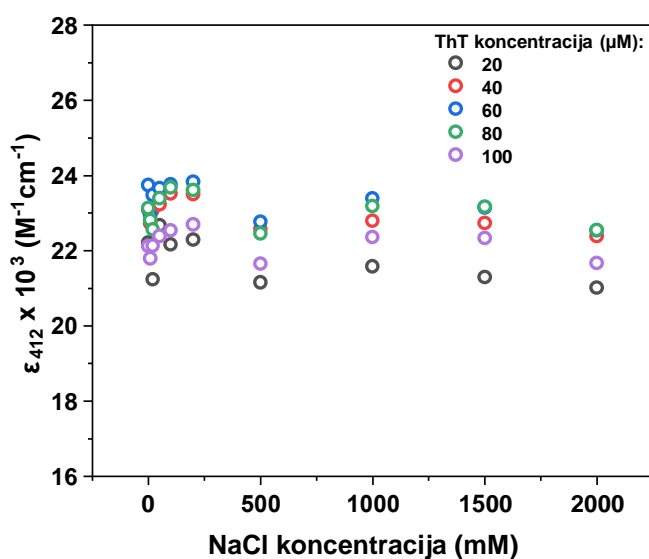
Tuomet patikrinus visų titravimo mėginių sugertis 300-600 nm bangos ilgio srityje, esant galutinei ThT koncentracijai 50 μM , buvo pastebėta, kad sugerties maksimumo pozicija yra 417 nm bangos ilgyje, tačiau ji pradeda slinkti link 450 nm bangos ilgio, kuomet mėginyje didėja CR koncentracija (3.23. pav. D). Tačiau šis efektas nėra toks ryškus, kuomet galutinė ThT koncentracija yra didesnė (3.23. pav. F,G). Tai gali būti susiję su tuo, kad esant 50 μM galutinei ThT koncentracijai mėginyje yra prijungiamos visos ThT molekulės esant mažesniai CR koncentracijai, priešingai nei esant didesnei galutinei ThT koncentracijai. Šie sugerties maksimumo pozicijos pokyčiai gali atsirasti dėl pačių CR molekulių, kurios jungiasi prie insulino amiloidinių fibrilių ir nesąveikauja su ThT molekulėmis, nes jų kiekis yra nedidelis ir nereikia visų CR molekulių, kad įvyktų ThT išsotinimas. Apskaičiuojant koks prisijungusių ThT ir CR dažų sugerties spektras būtų, jeigu šie dažai nesąveikautų, matome pažymėta 3.23. pav. D-G punktyrine linija. Didžiausi spektrų skirtumai visų ThT koncentracijų atvejais yra pastebimi 500-550 nm bangos ilgio srityje, kuri yra susijusi su CR jungimusi su insulino amiloidinėmis fibrilėmis.

Pagal šiuos rezultatus buvo publikuotas straipsnis „Amyloidophilic Molecule Interactions on the Surface of Insulin Fibrils: Cooperative Binding and Fluorescence Quenching“¹⁰³.

3.4. Joninės jėgos poveikio tyrimas

Kadangi yra žinoma, jog tirpalo pH vertė ar klampa, gali turėti įtakos dažo fluorescencijos kvantinei išėigai^{66,68}, buvo norima iširti ar tirpalo joninė jėga keičia vieno populiariausio dažo, naudojamo amiloidinių baltymų agregacijos tyrimuose, tioflavino-T sąveiką su amiloidinėmis fibrilėmis. Šiam tikslui buvo tirama ThT sąveika su keturių amiloidinių baltymų fibrilėmis, esant skirtingoms NaCl ir ThT koncentracijoms tirpale.

Prieš atliekant tyrimus su amiloidinėmis fibrilėmis, buvo norima įsitikinti ar joninė jėga nedaro jokios įtakos pačiai fluorescencinio dažo molekulėms (3.24. pav.). Tam tikslui buvo apskaičiuojami ekstinkcijos koeficientai, esant 412 nm bangos ilgiui, bei skirtingoms ThT ir NaCl koncentracijoms.



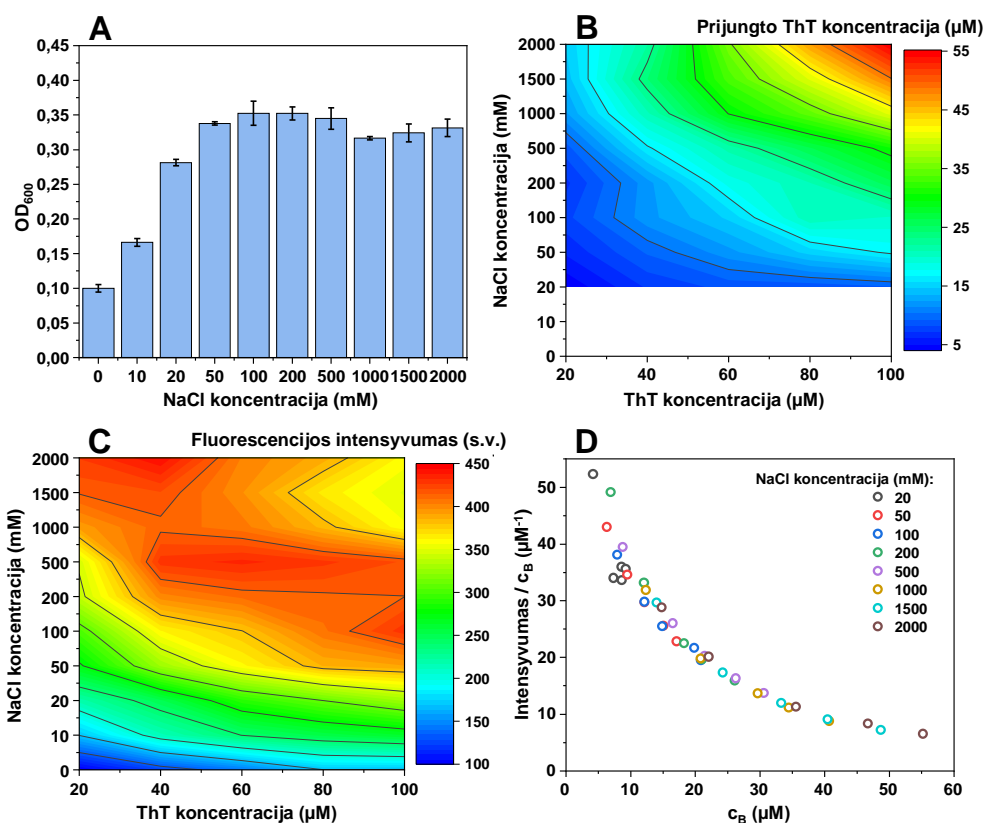
3.24. pav. ThT ekstinkcijos koeficiento, esant 412 nm bangos ilgiui, priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijos mėginyje.

Kaip matome pagal 3.24. pav., nepanašu, kad joninė jėga reikšmingai pakeistų ekstinkcijos koeficientus esant mažesnėms NaCl koncentracijoms ar net pačioms didžiausioms, kuomet ThT yra laisvas ir neprijungtas prie amiloidinių fibrilių paviršiaus. Tačiau yra matomi ekstinkcijos koeficiento pokyčiai nuo $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ iki $24 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, todėl norint išvengti nors ir nedidelių joninės jėgos sukeltų pokyčių, tolimesniuose tyrimuose naudojamos tikslios toje NaCl koncentracijoje apskaičiuotos ekstinkcijos koeficiento vertės.

Pirmiausia insulino fibrilės buvo skaldomos ultragarsu ir resuspenduojamos į tirpalus, kuriuose yra NaCl ir ThT koncentracijų ruožas. Pamatavus mėginių sugertį 300-600 nm bangos ilgio srityje, pirmiausia pastebima, kad optinis tankis, esant 600 nm bangos ilgiui, kinta, keičiantis tirpalo joninei jėgai (3.25. pav. A). Kuomet mėginyje nėra NaCl, optinis tankis (OD_{600}) yra nedidelis ir siekia vos 0,1. Didėjant NaCl koncentracijai, tačiau esant vis dar mažoms NaCl koncentracijoms, optinis

tankis greitai didėja. Jis pasiekia 0,35, esant 100 mM NaCl koncentracijai, ir daugiau nebesikeičia didėjant joninei jėgai tirpale. Tai parodo, kad iki tam tikros joninės jėgos tirpale, insulino fibrilės sunkiai sąveikauja tarpusavyje ir nesudaro didelių, šviesą sklaidančių superagregatų, ką galima matyti ir centrifuguojant mėginius, nes esant mažoms NaCl koncentracijoms tirpale, ne visos insulino fibrilės nusėda ir dalis lieka supernatante. Dėl šios priežasties, skaičiuojant prijungto ThT koncentraciją prie amiloidinių fibrilių paviršiaus, esant 0-20 mM NaCl koncentracijai, jos negalima tiksliai nustatyti (3.25. pav. B).

Po mėginių centrifugavimo ir pamatavus jų supernatantų sugertį 300-600 nm bangos ilgio srityje, buvo nustatytos prijungto ThT koncentracijos, esant 20 mM - 2 M NaCl ir 20-100 μ M ThT koncentracijoms (3.25. pav. B). Kaip matome, didėjant NaCl koncentracijai tirpale, didėja prijungto ThT koncentracija, tačiau prijungiamos ne visos ThT molekulės. Daugiausiai ThT molekulių yra prijungiama esant 100 μ M ThT ir 2 M NaCl koncentracijai tirpale, prijungto ThT koncentracija siekia 55 μ M. Esant didžiausiai ThT koncentracijai tirpale yra matomi didžiausi prijungiamo dažo koncentracijos pokyčiai esant mažai ir didelei joninei jėgai tirpale (nuo 5 μ M iki 55 μ M).

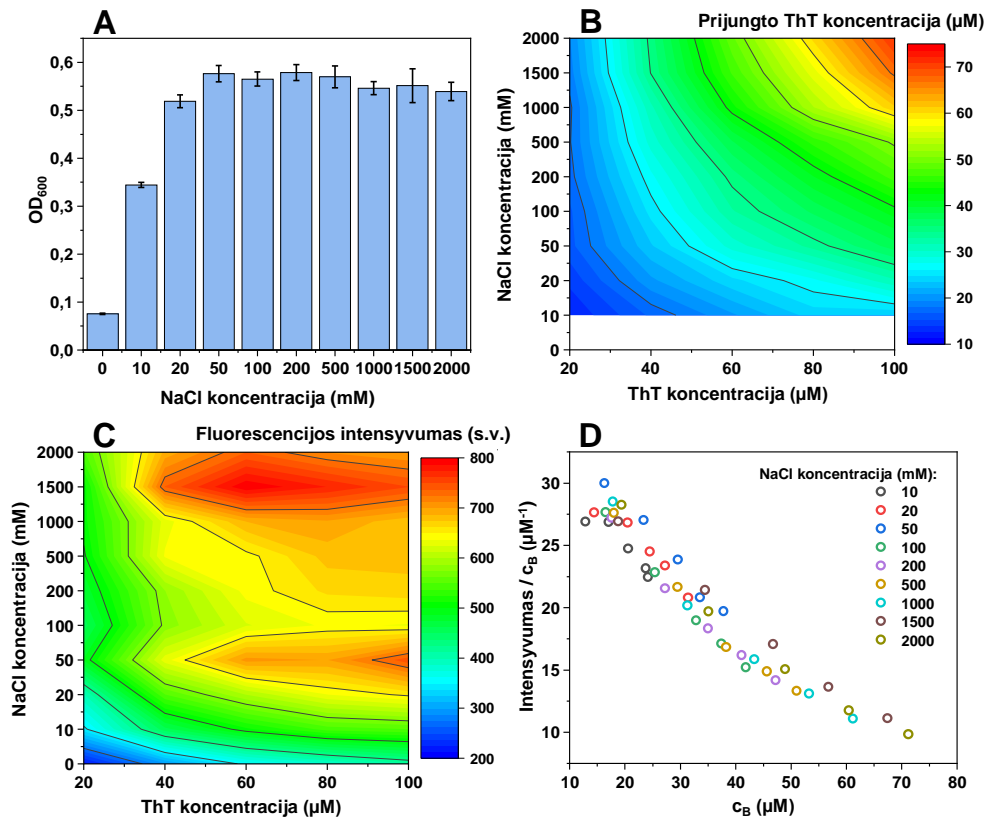


3.25. pav. Joninės jėgos įtaka ThT sąveikai su insulino amiloidinėmis fibrilėmis. **A.** Optinio tankio, esant 600 nm bangos ilgiui, priklausomybė nuo NaCl koncentracijos mėginyje. **B.** Prijungto prie fibrilių paviršiaus ThT koncentracijos priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijų mėginyje. **C.** Fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijų mėginyje. **D.** Fluorescencijos intensyvumo ir prijungto dažo koncentracijos santykio priklausomybė nuo prijungto dažo koncentracijos, esant skirtingoms NaCl koncentracijos mėginyje.

Toliau buvo analizuojama fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo tirpalo joninės jėgos ir ThT koncentracijos jame ir buvo pastebėtas panašus efektas, jog didėjant NaCl ir ThT koncentracijai tirpale, fluorescencijos intensyvumas didėja (3.25. pav. C). Tačiau šie rezultatai ne visiškai atitinka prijungtų ThT molekulių koncentracijos didėjimą, esant didesnei tirpalo joninei jėgai ir jame esančių dažo molekulių skaičiui. Čia pastebime, kad didžiausias fluorescencijos intensyvumas yra pasiekiamas ne esant didžiausiai NaCl ir ThT koncentracijai, bet vidutinėse jų reikšmėse, kas parodo, kad atsiranda ThT molekulių savęs slopinimo efektas, kuris yra pastebėtas anksčiau atliktuose tyrimuose⁶⁹. Lyginant fluorescencijos intensyvumo ir prijungto ThT koncentracijos santykį su prijungto dažo koncentracija, yra pastebimas taškų išsidėstymas lanko forma (3.25. pav. D). Toks santykio mažėjimas didėjant prijungtų ThT molekulių prie insulino fibrilių paviršiaus parodo anksčiau pastebėtą savęs slopinimo efektą ir matome, kad kuo daugiau dažo molekulių prisijungia prie fibrilių, tuo labiau sumažėja ThT fluorescencijos intensyvumo ir koncentracijos santykis. Įdomu tai, jog šie intensyvumo ir prijungtų molekulių santykiai, esant skirtingiems joninės jėgos stiprumams tirpale yra gana panašūs, kas rodo, kad pati NaCl koncentracija neturi įtakos fluorescencijos intensyvumo sumažėjimui, o jis keičia tik prijungiamų dažo molekulių koncentraciją.

Toliau šie bandymai buvo atlikti, naudojant kitos rūšies amiloidines fibriles, norint įsitikinti ar fluorescencinio dažo jungimui prie fibrilių paviršiaus, turi įtakos paviršiaus pokyčiai. Pirmiausia buvo tiriama joninės jėgos įtaka ThT jungimuisi prie vištos kiaušinio baltymo lizocimo fibrilių.

Kaip ir insulino atveju, pirma buvo lyginama optinio tankio, esant 600 nm bangos ilgiui, pokyčiai (3.26. pav. A). Matomas staigus tankio padidėjimas didinant NaCl koncentraciją mėginyje. Tačiau šį kartą OD₆₀₀ padidėja labiau, tai yra nuo maždaug 0,1 iki 0,6. Insulino fibrilių atveju ši vertė buvo nuo 0,1 iki 0,35. Be to yra pastebima, jog optinio tankio stabilizavimasis yra pasiekiamas esant mažesniai NaCl koncentracijai tirpale, t.y. 50 μM, nei insulino atveju (100 μM). Šie rezultatai parodo, kad lizocimo fibrilės yra linkusios asocijuoti viena su kita esant mažesnei joninei jėgai tirpale. Tai buvo pastebėta ir centrifuguojant mėginius, norint nustatyti laisvo ir prisijungusio ThT koncentraciją mėginyje. Lizocimo fibrilės pilnai nusicentrifuguoja esant 10 mM NaCl koncentracijai tirpale. Be to yra matomos tokios pat prijungiamo dažo priklausomybės nuo NaCl ir ThT koncentracijos mėginyje tendencijos, kuomet didėjant tirpalo joninei jėgai ir dažo koncentracijai, prie lizocimo fibrilių paviršiaus yra prijungiama daugiau dažo molekulių (3.26. pav. B). Visgi šiuo atveju yra prijungiama daugiau ThT molekulių, net maždaug 70 μM, esant didžiausiai NaCl ir ThT koncentracijai mėginyje.

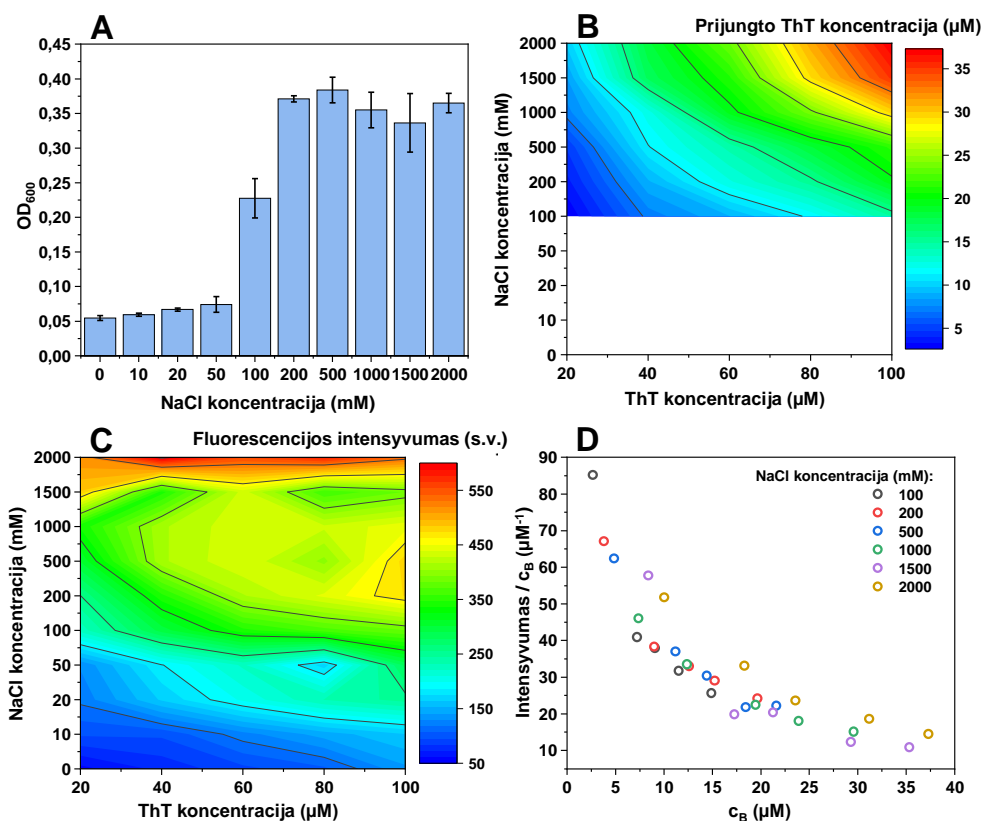


3.26. pav. Joninės jėgos įtaka ThT sąveikai su lizocimo amiloidinėmis fibrilėmis. **A.** Optinio tankio, esant 600 nm bangos ilgiui, priklausomybė nuo NaCl koncentracijos mėginyje. **B.** Prijungto prie fibrilių paviršiaus ThT koncentracijos priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijų mėginyje. **C.** Fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijų mėginyje. **D.** Fluorescencijos intensyvumo ir prijungto dažo koncentracijos santykio priklausomybė nuo prijungto dažo koncentracijos, esant skirtingoms NaCl koncentracijos mėginyje.

Toliau kaip ir pirmuoju atveju buvo analizuojama fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo joninės jėgos stiprumo ir dažo koncentracijos (3.26. pav. C). Kaip ir insulino mėginių atveju, matome, kad didėjant NaCl ir ThT koncentracijoms fluorescencijos intensyvumas auga, tačiau didžiausios intensyvumo vertės pasislenka link didesnių NaCl ir ThT verčių. Be to yra pastebimas beveik du kartus didesnis maksimalus fluorescencijos intensyvumas (800 s.v.) nei insulino atveju (450 s.v.). Taip pat lyginant intensyvumo ir prijungto dažo koncentracijų santykius, matome, kad jis sumažėjo nuo $30 \mu\text{M}^{-1}$ iki $10 \mu\text{M}^{-1}$, kuomet insulino fibrilių tyrimų metu buvo nuo $50 \mu\text{M}^{-1}$ iki $10 \mu\text{M}^{-1}$, kas rodo, jog prie lizocimo fibrilių prisijungusių ThT molekulių sukuria dar stipresnę savo fluorescencijos intensyvumo slopinimą (3.26. pav. D). Visgi šiuo atveju taškai yra labiau išsibarstę, tačiau vis dar išlaiko į lanką panašią formą.

Skirtingai nuo insulino ir lizocimo, pelės prioninio baltymo (MoPrP) fibrilėms reikia didesnės joninės jėgos, kad vyktų stipresnė sąveika tarp agregatų. Kaip matome 3.27. pav. A, mėginių, esant nedidelei NaCl koncentracijai, optinis tankis mažai skiriasi nuo pradinio mėginio ir ryškesnis padidėjimas atsiranda tik tirpale esant 100 mM NaCl. Be to, optinio tankio vertės stabilizuojasi ir

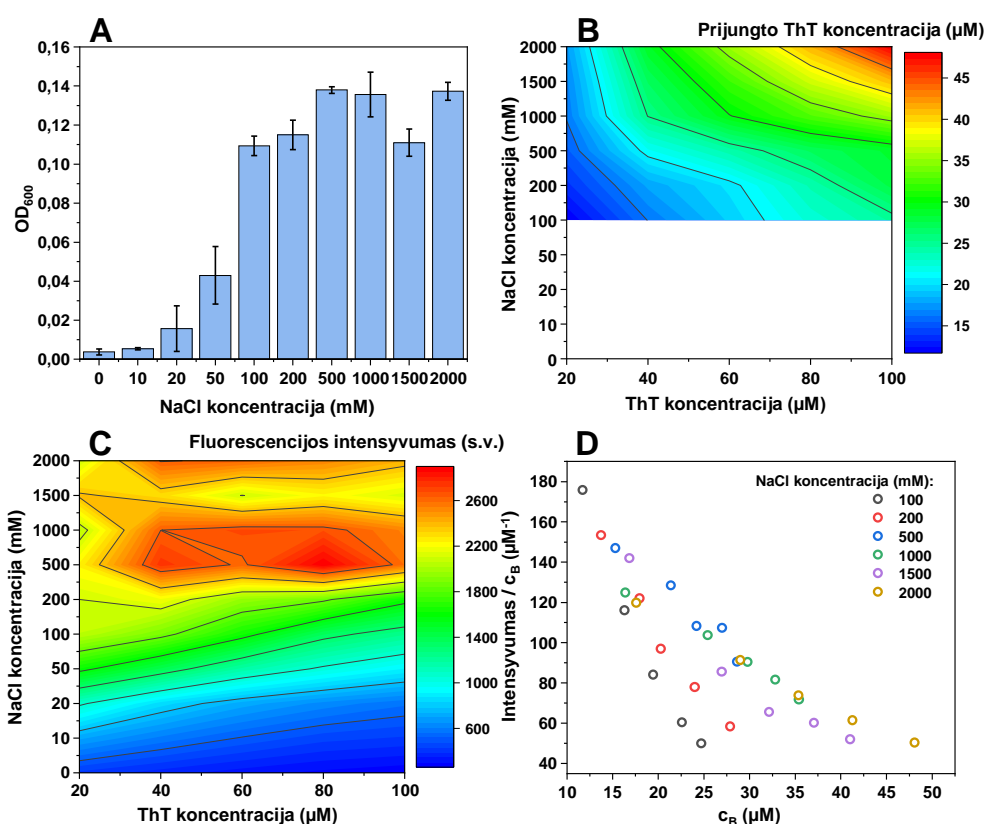
siekia apie 0,35-0,40, kaip ir mėginiai su insulino fibrilėmis. Tiriant prijungto prie fibrilių paviršiaus dažo koncentracijos pokyčius, kaip ir ankstesniais atvejais matome, kad prijungiama daugiau molekulių didėjant NaCl ir ThT koncentracijoms (3.27. pav. B). Vis dėlto matome, kad centrifuguojant mėginius dalis fibrilių lieka supernatante net esant NaCl iki 100 μM , t.y. reikia 100 μM NaCl koncentracijos, kad fibrilių neliktų supernatante, ir maksimali prijungiamo dažo koncentracija siekia vos apie 35 μM , mažiau nei prieš tai aptartais atvejais.



3.27. pav. Joninės jėgos įtaka ThT sąveikai su pelės prioninio baltymo (MoPrP) amiloidinėmis fibrilėmis. **A.** Optinio tankio, esant 600 nm bangos ilgiui, priklausomybė nuo NaCl koncentracijos mėginyje. **B.** Prijungto prie fibrilių paviršiaus ThT koncentracijos priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijų mėginyje. **C.** Fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijų mėginyje. **D.** Fluorescencijos intensyvumo ir prijungto dažo koncentracijos santykio priklausomybė nuo prijungto dažo koncentracijos, esant skirtingoms NaCl koncentracijos mėginyje.

Galiausiai tiriant fluorescencijos intensyvumo pokyčius, matoma kitoks intensyvumo verčių pasiskirstymas (3.27. pav. C). Tiriant MoPrP mėginių fluorescencijos pokyčius, pastebime, kad didžiausias fluorescencijos intensyvumas pasiekiamas esant tik 2 M NaCl koncentracijai ir tai nepriklauso nuo dažo molekulių tirpale. O pats maksimalus fluorescencijos intensyvumas yra gana panašus į insulino mėginių (apie 550 s.v.). Toliau analizuojant intensyvumo ir prisijungusių molekulių santykį, matome, kad jis yra nuo 90 μM^{-1} iki 10 μM^{-1} , kas parodo, jog čia ThT savo fluorescencijos slopinimas yra žymiai silpnesnis, nei anksčiau aptartais atvejais (3.27. pav. D), tačiau taškų išsidėstymas išlaiko panašią lanko formą.

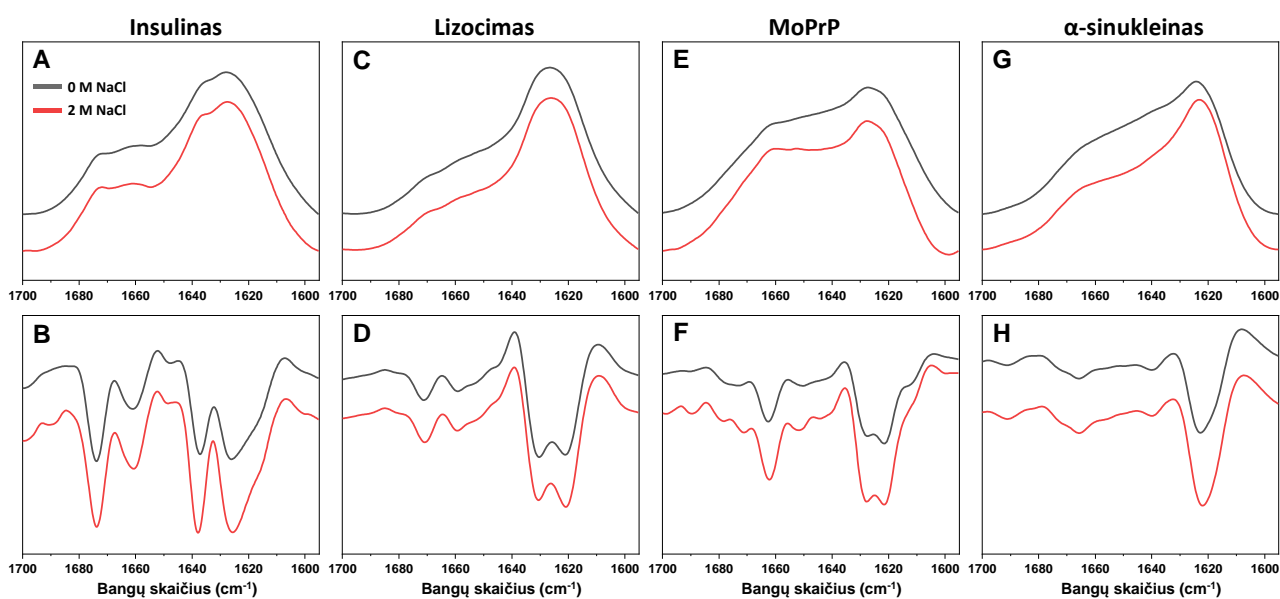
Paskutinė buvo analizuojama joninės jėgos įtaka tioflavino-T sąveikai su α -sinukleino fibrilėmis ir šis efektas išsiskyrė labiausiai iš kitų. Nors optinio tankio ir prijungiamo dažo priklausomybės nuo NaCl koncentracijos atkartoja panašią tendenciją kaip ir ankstesniais variantais, tačiau čia pastebimi esminiai skirtumai fluorescencijos intensyvumo pokyčiuose. OD₆₀₀ padidėjimas atsiranda nuo stipresnės tirpalo joninės jėgos, tačiau maksimali pasiekama OD₆₀₀ vertė yra gana maža, maždaug apie 0,14 ir kad ją pasiekti reikia didesnės NaCl koncentracijos (3.28. pav. A). Kaip ir MoPrP mėginiais, taip ir α -sinukleino fibrilėms, kad jos pilnai būtų nucentrifuguojamos reikia 100 mM NaCl. Be to, didėjant NaCl ir ThT koncentracijoms tirpale, prie fibrilių paviršiaus yra prijungama daugiau ThT molekulių, o maksimali prijungto dažo koncentracija siekia maždaug 45 μ M (3.28. pav. B).



3.28. pav. Joninės jėgos įtaka ThT sąveikai su α -sinukleino amiloidinėmis fibrilėmis. **A.** Optinio tankio, esant 600 nm bangos ilgiui, priklausomybė nuo NaCl koncentracijos mėginyje. **B.** Prijungto prie fibrilių paviršiaus ThT koncentracijos priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijų mėginyje. **C.** Fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo NaCl ir ThT koncentracijų mėginyje. **D.** Fluorescencijos intensyvumo ir prijungto dažo koncentracijos santykio priklausomybė nuo prijungto dažo koncentracijos, esant skirtingoms NaCl koncentracijos mėginyje.

Vis dėlto kaip ir buvo minėta anksčiau, šio tyrimo metu buvo pastebėti esminiais skirtumai nuo anksčiau analizuotų rezultatų. Nors mėginių maksimalus optinis tankis yra labai mažas, tačiau fluorescencijos intensyvumas žymiai didesnis, nei kitų trijų baltymų fibrilių atvejais (maždaug 2600 s.v.) (3.28. pav. C). Tai parodo, jog šios fibrilės yra žymiai mažiau linkusios asocijuotis tarpusavyje

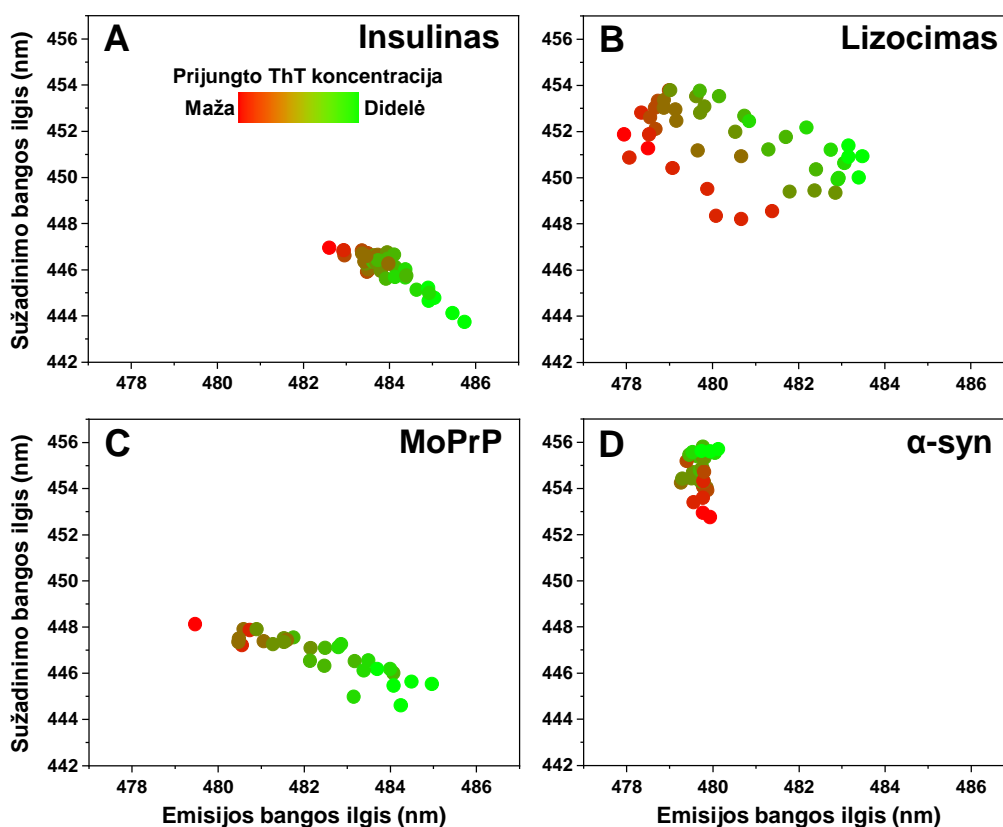
ir prie jų prisijungusių ThT molekulių fluorescencijos kvantinė išėiga yra žymiai didesnė. Be to galime pastebėti, jog fluorescencijos intensyvumas mažėja, kuomet tirpale didėja ThT koncentracija, esant mažai joninei jėgai (0-20 mM NaCl), kas nebūdinga kitų baltymų atvejais. Tai parodo, jog šiuo atveju yra matomas labai ryškus ir stiprus ThT molekulių savo fluorescencijos slopinimas. Taip pat matomas išskirtinis intensyvumo ir prijungto dažo koncentracijos santykio pasiskirstymas (3.28. pav. D). Galima pastebėti, kad esant 100 mM ir 200 mM NaCl koncentracijoms, santykio vertės pasiskirsto ne vienodai, nei esant kitokio stiprumo joninei jėgai tirpale. Ši įžvalga sukėlė klausimų dėl agregatų struktūros skirtingose joninėse jėgose, todėl buvo atliktas visų fibrilių mėginių, esant 0 M ir 4 M NaCl koncentracijoms, Furje-transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos tyrimas, norint įvertinti ar joninė jėga turi kokios nors įtakos pačioms baltymų amiloidinėms fibrilėms (3.29. pav.).



3.29. pav. FTIR spektrai (A, C, E, G) ir jų antrinės išvestinės (B, D, F, H), esant 0 arba 2 M NaCl koncentracijoms mėginyje visų keturių baltymų fibrilių atvejais.

Lyginant FTIR spektrus ir jų antrines išvestines, matome, kad nėra esminių skirtumų tarp fibrilių mėginių, kuriuose yra 2 M arba 0 M NaCl koncentracija, tiek insulino, lizocimo ir MoPrP atvejais. Skirtumai tiek FTIR spektre, tiek jo antrinėje išvestinėje yra matomi α -sinukleino atveju. 3.29. pav. G dalyje galime matyti, jog esant 2 M NaCl, 1670-1620 cm^{-1} ribose intensyvumas didėja greičiau, t.y. kreivė įgyja lanko formą, o ne panašios į tiesę formą, kaip mėginiuose be NaCl. Be to spektro antrinėje išvestinėje (3.29. pav. H) galime aiškiai matyti, jog ties 1622 cm^{-1} bangos skaičiumi signalo intensyvumas yra didesnis esant 2 M NaCl. Kadangi ši bangos skaičiaus sritis yra susijusi su β -klostėmis¹⁰¹, tai rodo, jog esant mėginyje NaCl, α -sinukleino fibrilės keičia savo konformaciją, dėl kurios atsiranda anksčiau aptarti fluorescencijos intensyvumo pokyčiai, išsiskiriantys iš kitų tiriamų baltymų.

Be viso to dar buvo išanalizuota kaip keičiasi sužadinimo-emisijos matricių (EEM) bangos ilgiai, kuriuose yra stebimas maksimalus signalo intensyvumas, esant skirtingoms prijungto ThT koncentracijoms (3.30. pav.). Šios bangų ilgio ribos yra skirtingos visais keturiais fibrilių mėginių atvejais, nes skirtingų rūšių fibrilės gali turėti skirtingus dažo jungimo būdus^{66,102}. Analizuojant šiuos bangos ilgių pokyčius, galima matyti, jog insulino, lizocimo ir MoPrP atvejais, sužadinimo bangos ilgis mažėja, daugėjant prie fibrilių prijungtų dažo molekulių, o emisijos bangos ilgis didėja. Tačiau α -sinukleino atveju pastebimas priešingas efektas, kuomet daugėjant prijungto ThT, sužadinimo bangos ilgis didėja, o emisijos – praktiškai nesikeičia. Šie rezultatai gali būti tokie, dėl anksčiau pastebėtų ir aptartų α -sinukleino fibrilių konformacijų pokyčių, atsiradusių dėl joninės jėgos tirpale.



3.30. pav. Insulino (A), lizocimo (B), pelės prioninio baltymo (MoPrP) (C) ir α -sinukleino (D) sužadinimo-emisijos matricių (EEM) intensyvumo „masės centras“, esant skirtingoms prijungto prie fibrilių paviršiaus ThT koncentracijoms.

Pagal šiuos rezultatus buvo publikuotas straipsnis „Effect of Ionic Strength on Thioflavin-T Affinity to Amyloid Fibrils and Its Fluorescence Intensity“¹⁰⁴.

Išvados

1. Buvo nustatyta, jog dauguma tirtų amiloidofilinių molekulių sąveikauja tarpusavyje ir keičiasi jų afiniškumas amiloidinių fibrilių paviršiui.
2. Amiloidofilinių molekulių tarpusavio sąveikos metu (tirpale ir ant fibrilių paviršiaus) keičiasi jų sugerties spektrai ir fluorescencijos emisijos intensyvumai.
3. Didėjant tirpalo joninei jėgai, prie amiloidinių fibrilių paviršiaus yra prijungiama daugiau ThT molekulių ir jų fluorescencijos intensyvumas didėja, iki kol ThT molekulės pradeda slopinti viena kitos fluorescenciją.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

KAMILĖ MIKALAUŠKAITĖ

Amiloidofilinių molekulių sąveikos su amiloidinių fibrilių paviršiumi tyrimas

Amiloidinių baltymų konformaciniai pokyčiai ir jų agregacija amiloidinių fibrilių forma yra susijusi su daugeliu neurodegeneracinių sutrikimų, kaip Alzheimerio, Parkinsono ligos ar transmissinės spongiforminės encefalopatijos. Šiuo metu yra atliekama labai daug tyrimų norint iširti baltymų agregacijos mechanizmus ir kaip įvairios aplinkos sąlygos gali turėti įtakos agregacijos procesams ir gaunamų tyrimų rezultatams. Yra pastebėta, kad temperatūra, pH, joninė jėga, purtymo rūšis keičia ne tik agregacijos kinetinius parametrus, tačiau ir baltymo konformacinius pokyčius, taip susidarant skirtingų kamienų fibrilėms. Šiems tyrimams dažnai yra naudojami amiloidofiliai dažai, kaip Kongo raudonasis, tioflavinas-T ar ANS.

Šiame darbe buvo pagamintos dviejų modelinių baltymų – insulino ir lizocimo, bei su neurodegeneracinėmis ligomis susijusių baltymų – pelės prioninio ir α -sinukleino amiloidinės fibrilės. Atlikti tyrimai kaip keičiasi dažų sąveika su fibrilių paviršiumi mišinyje esant dviejų dažų kombinacijoms ir įvertinti ThT jungimosi su fibrilėmis pokyčiai, esant skirtingai tirpalo joninei jėgai, naudojant sugerties ir fluorescencinės spektroskopijos metodus. Nustatyta, kad dažai sąveikaudami tarpusavyje kai kuriais atvejais padidina afiniškumą fibrilių paviršiui, tačiau kitais atvejais trukdo vienas kitam. Taip pat pastebėta, kad esant didesnei tirpalo joninei jėgai, prie amiloidinių fibrilių paviršiaus jungiasi daugiau ThT molekulių.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

KAMILĖ MIKALAUŠKAITĖ

Study of Amyloidophilic Molecule Interactions on the Surface of Amyloid Fibrils

Conformational changes in amyloid proteins and their aggregation in the form of amyloid fibrils are associated with many neurodegenerative disorders such as Alzheimer's, Parkinson's disease, or transmissible spongiform encephalopathies. Currently, there is a lot of research carried out in order to investigate the mechanisms of protein aggregation and how different environmental conditions may affect the aggregation process and the results obtained from studies. It has been observed that temperature, pH, ionic strength and type of shaking change not only the kinetic parameters of aggregation, but also the protein's conformation, thus forming fibrils of different strains. Amyloidophilic dyes such as Congo red, thioflavin-T or ANS are often used in these studies.

In this work, amyloid fibrils of two model proteins - insulin and lysozyme, as well as neurodegenerative-disease-related proteins - mouse prion protein and α -synuclein, were produced. Study of the changes of dye interaction with fibril surface in a mixture of two dye combinations was performed and changes in ThT binding to fibrils at different ionic strength of the solution were evaluated using absorbance and fluorescence spectroscopy methods. It was found that dyes, in some cases, increase the affinity for the surface of fibrils, by interacting with each other, but in other cases they interfere with one another. It has also been observed that at higher ionic strength of the solution, more ThT molecules bind to the surface of amyloid fibrils.

Literatūros sąrašas

1. Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Shumeyko, S. A., Vikhlyantsev, I. M. ir Bobylev, A. G. Amyloids: The History of Toxicity and Functionality. *Biology (Basel)*. **10**, 394 (2021).
2. Nizhnikov, A. A., Antonets, K. S. ir Inge-Vechtomov, S. G. Amyloids: from pathogenesis to function. *Biochem.* **80**, 1127–1144 (2015).
3. Buxbaum, J. N. ir Linke, R. P. A Molecular History of the Amyloidoses. *J. Mol. Biol.* **421**, 142–159 (2012).
4. Thomas, R. H. Historical review. *Ger. Life Lett.* **5**, 66–68 (1951).
5. Ke, P. C. *et al.* Half a century of amyloids: past, present and future. *Chem. Soc. Rev.* **49**, 5473–5509 (2020).
6. Chiti, F. ir Dobson, C. M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 27–68 (2017).
7. Atkinson, C. J., Zhang, K., Munn, A. L., Wiegmanns, A. ir Wei, M. Q. Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein. *Prion* **10**, 63–82 (2016).
8. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A. ir Radford, S. E. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 755–773 (2018).
9. Chuang, E., Hori, A. M., Hesketh, C. D. ir Shorter, J. Amyloid assembly and disassembly. *J. Cell Sci.* **131**, jcs189928 (2018).
10. Choi, J. H., May, B. C. H., Wille, H. ir Cohen, F. E. Molecular Modeling of the Misfolded Insulin Subunit and Amyloid Fibril. *Biophys. J.* **97**, 3187–3195 (2009).
11. Ziaunys, M., Sneideris, T. ir Smirnovas, V. Self-inhibition of insulin amyloid-like aggregation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 27638–27645 (2018).
12. Brange, J., Andersen, L., Laursen, E. D., Meyn, G. ir Rasmussen, E. Toward Understanding Insulin Fibrillation. *J. Pharm. Sci.* **86**, 517–525 (1997).
13. Selivanova, O., Suvorina, M., Surin, A., Dovidchenko, N. ir Galzitskaya, O. Insulin and Lispro Insulin: What is Common and Different in their Behavior? *Curr. Protein Pept. Sci.* **18**, 57–64 (2016).
14. Antolíková, E. *et al.* Non-equivalent Role of Inter- and Intramolecular Hydrogen Bonds in the Insulin Dimer Interface. *J. Biol. Chem.* **286**, 36968–36977 (2011).

15. Gancar, M. *et al.* Amyloid Aggregation of Insulin: An Interaction Study of Green Tea Constituents. *Sci. Rep.* **10**, 9115 (2020).
16. Selivanova, O. M. ir Galzitskaya, O. V. Structural polymorphism and possible pathways of amyloid fibril formation on the example of insulin protein. *Biochem.* **77**, 1237–1247 (2012).
17. Smirnova, E. *et al.* pH-responsive modulation of insulin aggregation and structural transformation of the aggregates. *Biochimie* **109**, 49–59 (2015).
18. Hjorth, C. F. *et al.* Structure, Aggregation, and Activity of a Covalent Insulin Dimer Formed During Storage of Neutral Formulation of Human Insulin. *J. Pharm. Sci.* **105**, 1376–1386 (2016).
19. Dische, F. E. *et al.* Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* **31**, 158–161 (1988).
20. Jimenez, J. L. *et al.* The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 9196–9201 (2002).
21. Murali, J., Koteeswari, D., Rifkind, J. M. ir Jayakumar, R. Amyloid insulin interaction with erythrocytes. *Biochem. Cell Biol.* **81**, 51–59 (2003).
22. Chaturvedi, S. K., Siddiqi, M. K., Alam, P. ir Khan, R. H. Protein misfolding and aggregation: Mechanism, factors and detection. *Process Biochem.* **51**, 1183–1192 (2016).
23. Fleming, A. ir B, P. R. S. L. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Contain. Pap. a Biol. Character* **93**, 306–317 (1922).
24. Hill, S. E., Robinson, J., Matthews, G. ir Muschol, M. Amyloid Protofibrils of Lysozyme Nucleate and Grow Via Oligomer Fusion. *Biophys. J.* **96**, 3781–3790 (2009).
25. Dului, S. *et al.* Order, Disorder, and Reorder State of Lysozyme: Aggregation Mechanism by Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **124**, 50–60 (2020).
26. Al Adem, K., Lukman, S., Kim, T.-Y. ir Lee, S. Inhibition of lysozyme aggregation and cellular toxicity by organic acids at acidic and physiological pH conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* **149**, 921–930 (2020).
27. How, S.-C. *et al.* Exploring the effects of methylene blue on amyloid fibrillogenesis of lysozyme. *Int. J. Biol. Macromol.* **119**, 1059–1067 (2018).
28. Gilquin, B., Guilbert, C. ir Perahia, D. Unfolding of hen egg lysozyme by molecular

- dynamics simulations at 300K: Insight into the role of the interdomain interface. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **41**, 58–74 (2000).
29. Kerkaert, B., Mestdagh, F. ir De Meulenaer, B. Detection of hen's egg white lysozyme in food: Comparison between a sensitive HPLC and a commercial ELISA method. *Food Chem.* **120**, 580–584 (2010).
 30. Perez, C. *et al.* Mechanism of Fibril and Soluble Oligomer Formation in Amyloid Beta and Hen Egg White Lysozyme Proteins. *J. Phys. Chem. B* **123**, 5678–5689 (2019).
 31. Nelson, R. ir Eisenberg, D. Structural Models of Amyloid-Like Fibrils. *Adv. Protein Chem.* **73**, 235–282 (2006).
 32. Sakudo, A. *et al.* Structure of the Prion Protein and Its Gene: An Analysis Using Bioinformatics and Computer Simulation. *Curr. Protein Pept. Sci.* **11**, 166–179 (2010).
 33. Sassa, Y., Kataoka, N., Inoshima, Y. ir Ishiguro, N. Anti-PrP antibodies detected at terminal stage of prion-affected mouse. *Cell. Immunol.* **263**, 212–218 (2010).
 34. Castle, A. R. ir Gill, A. C. Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front. Mol. Biosci.* **4**, 1–25 (2017).
 35. Kretzschmar, H. A. *et al.* Molecular Cloning of a Human Prion Protein cDNA. *DNA* **5**, 315–324 (1986).
 36. Christen, B., Damberger, F. F., Perez, D. R., Hornemann, S. ir Wuthrich, K. Structural plasticity of the cellular prion protein and implications in health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 8549–8554 (2013).
 37. Aguzzi, A. ir Lakkaraju, A. K. K. Cell Biology of Prions and Prionoids: A Status Report. *Trends Cell Biol.* **26**, 40–51 (2016).
 38. Norrby, E. Prions and protein-folding diseases. *J. Intern. Med.* **270**, 1–14 (2011).
 39. Jackson, W. S., Krost, C., Borkowski, A. W. ir Kaczmarczyk, L. Translation of the Prion Protein mRNA Is Robust in Astrocytes but Does Not Amplify during Reactive Astrocytosis in the Mouse Brain. *PLoS One* **9** (2014).
 40. Sarnataro, D., Pepe, A. ir Zurzolo, C. Cell Biology of Prion Protein. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **150**, 57–82 (Elsevier Inc., 2017).
 41. Scheckel, C. ir Aguzzi, A. Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 405–418 (2018).

42. Atkinson, C. J., Zhang, K., Munn, A. L., Wiegmans, A. ir Wei, M. Q. Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein. *Prion* **10**, 63–82 (2016).
43. Prusiner, S. B. Nobel Lecture: Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 13363–13383 (1998).
44. Taguchi, Y. ir Schätzl, H. M. Identifying critical sites of PrP^c-PrP^{Sc} interaction in prion-infected cells by dominant-negative inhibition. *Prion* **7**, 452–456 (2013).
45. Taguchi, Y., Mistica, A. M. A., Kitamoto, T. ir Schätzl, H. M. Critical Significance of the Region between Helix 1 and 2 for Efficient Dominant-Negative Inhibition by Conversion-Incompetent Prion Protein. *PLoS Pathog.* **9** (2013).
46. Knowles, T. P. J. *et al.* An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science.* **326**, 1533–1537 (2009).
47. Gill, A. C. ir Castle, A. R. The cellular and pathologic prion protein. *Handb. Clin. Neurol.* **153**, 21–44 (2018).
48. Shahnawaz, M. *et al.* Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature* **578**, 273–277 (2020).
49. Tian, Y., Meng, L. ir Zhang, Z. What is strain in neurodegenerative diseases? *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 665–676 (2020).
50. Maroteaux, L., Campanelli, J. ir Scheller, R. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* **8**, 2804–2815 (1988).
51. Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T. ir Outeiro, T. F. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J. Neurochem.* **139**, 240–255 (2016).
52. Ghosh, D., Mehra, S., Sahay, S., Singh, P. K. ir Maji, S. K. α -synuclein aggregation and its modulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **100**, 37–54 (2017).
53. Wu, K.-P., Kim, S., Fela, D. A. ir Baum, J. Characterization of Conformational and Dynamic Properties of Natively Unfolded Human and Mouse α -Synuclein Ensembles by NMR: Implication for Aggregation. *J. Mol. Biol.* **378**, 1104–1115 (2008).
54. Burré, J., Sharma, M. ir Südhof, T. C. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8** (2018).
55. Sulatskaya, A. *et al.* Investigation of α -Synuclein Amyloid Fibrils Using the Fluorescent Probe Thioflavin T. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2018).

56. Greten-Harrison, B. *et al.* α -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 19573–19578 (2010).
57. Picken, M. M. The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematol.* **143**, 322–334 (2020).
58. Hazenberg, B. P. C. Amyloidosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **39**, 323–345 (2013).
59. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M. ir Dobson, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 384–396 (2014).
60. Gade Malmos, K. *et al.* ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid* **24**, 1–16 (2017).
61. Whidden, M., Ho, A., Ivanova, M. I. ir Schnell, S. Competitive inhibition reaction mechanisms for the two-step model of protein aggregation. *Biophys. Chem.* **193–194**, 9–19 (2014).
62. Harrison, R. S., Sharpe, P. C., Singh, Y. ir Fairlie, D. P. Amyloid peptides and proteins in review. in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **159**, 1–77 (Springer Berlin Heidelberg, 2007).
63. Sneideris, T. *et al.* The Environment Is a Key Factor in Determining the Anti-Amyloid Efficacy of EGCG. *Biomolecules* **9**, 855 (2019).
64. Sneideris, T. *et al.* pH-Driven Polymorphism of Insulin Amyloid-Like Fibrils. *PLoS One* **10**, e0136602 (2015).
65. Adamcik, J. ir Mezzenga, R. Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape. *Angew. Chemie Int. Ed.* **57**, 8370–8382 (2018).
66. Kuznetsova, I. M., Sulatskaya, A. I., Uversky, V. N. ir Turoverov, K. K. Analyzing Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils by an Equilibrium Microdialysis-Based Technique. *PLoS One* **7** (2012).
67. Biancalana, M. ir Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1405–1412 (2010).
68. Rodina, N. P. *et al.* Photophysical Properties of Fluorescent Probe Thioflavin T in Crowded Milieu. *J. Spectrosc.* **2017**, 1–10 (2017).
69. Lindberg, D. J. *et al.* Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils Leads to Fluorescence Self-Quenching and Fibril Compaction. *Biochemistry* **56**, 2170–2174 (2017).

70. Hudson, S. A., Ecroyd, H., Kee, T. W. ir Carver, J. A. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS J.* **276**, 5960–5972 (2009).
71. Groenning, M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. *J. Chem. Biol.* **3**, 1–18 (2010).
72. Gade Malmos, K. *et al.* ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid* **24**, 1–16 (2017).
73. Biancalana, M. ir Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1405–1412 (2010).
74. Stsiapura, V. I. *et al.* Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Viscosity. *J. Phys. Chem. B* **112**, 15893–15902 (2008).
75. Hackl, E. V., Darkwah, J., Smith, G. ir Ermolina, I. Effect of acidic and basic pH on Thioflavin T absorbance and fluorescence. *Eur. Biophys. J.* **44**, 249–261 (2015).
76. Howie, A. J. ir Brewer, D. B. Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Micron* **40**, 285–301 (2009).
77. Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M. ir Bobylev, A. G. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci. Rep.* **39**, (2019).
78. Frid, P., Anisimov, S. V. ir Popovic, N. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* **53**, 135–160 (2007).
79. Dapson, R. W. Amyloid from a histochemical perspective. A review of the structure, properties and types of amyloid, and a proposed staining mechanism for Congo red staining. *Biotech. Histochem.* **93**, 543–556 (2018).
80. Inouye, H. ir Kirschner, D. A. Alzheimer's β -Amyloid: Insights into Fibril Formation and Structure from Congo Red Binding. in *Alzheimer's Disease* 203–224 (Springer US, 2014).
81. Fernandez-Flores, A. A review of amyloid staining: methods and artifacts. *Biotech. Histochem.* **86**, 293–301 (2011).
82. Hawe, A., Sutter, M. ir Jiskoot, W. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharm. Res.* **25**, 1487–1499 (2008).
83. Stryer, L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. *J. Mol. Biol.* **13**, 482–495 (1965).

84. Rosen, C. G. ir Weber, G. Dimer formation from 1-anilino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. Fluorescent molecule with exceptional binding properties. *Biochemistry* **8**, 3915–3920 (1969).
85. Singh, K., Hussain, I., Mishra, V. ir Akhtar, M. S. New insight on 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid interaction with TgFNR for hydrophobic exposure analysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **122**, 636–643 (2019).
86. Younan, N. D. ir Viles, J. H. A Comparison of Three Fluorophores for the Detection of Amyloid Fibers and Prefibrillar Oligomeric Assemblies. ThT (Thioflavin T); ANS (1-Anilino-naphthalene-8-sulfonic Acid); and bisANS (4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic Acid). *Biochemistry* **54**, 4297–4306 (2015).
87. Guliyeva, A. J. ir Gasymov, O. K. ANS fluorescence: Potential to discriminate hydrophobic sites of proteins in solid states. *Biochem. Biophys. Reports* **24**, 100843 (2020).
88. Sulatsky, M. I. *et al.* Effect of the fluorescent probes ThT and ANS on the mature amyloid fibrils. *Prion* **14**, 67–75 (2020).
89. Bothra, A., Bhattacharyya, A., Mukhopadhyay, C., Bhattacharyya, K. ir Roy, S. A Fluorescence Spectroscopic and Molecular Dynamics Study of bis-ANS/Protein Interaction. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **15**, 959–966 (1998).
90. Lindgren, M., Sörgjerd, K. ir Hammarström, P. Detection and Characterization of Aggregates, Prefibrillar Amyloidogenic Oligomers, and Protofibrils Using Fluorescence Spectroscopy. *Biophys. J.* **88**, 4200–4212 (2005).
91. Diwu, Z., Lu, Y., Zhang, C., Klaubert, D. H. ir Haugland, R. P. Fluorescent Molecular Probes II. The Synthesis, Spectral Properties and Use of Fluorescent Solvatochromic Dapoxyl Dyes. *Photochem. Photobiol.* **66**, 424–431 (1997).
92. Min, J., Lee, J. W., Ahn, Y.-H. ir Chang, Y.-T. Combinatorial Dapoxyl Dye Library and its Application to Site Selective Probe for Human Serum Albumin. *J. Comb. Chem.* **9**, 1079–1083 (2007).
93. Brain, C. T., Paul, J. M., Loong, Y. ir Oakley, P. J. Novel procedure for the synthesis of 1,3,4-oxadiazoles from 1,2-diacylhydrazines using polymer-supported Burgess reagent under microwave conditions. *Tetrahedron Lett.* **40**, 3275–3278 (1999).
94. Yates, E. V., Meisl, G., Knowles, T. P. J. ir Dobson, C. M. An Environmentally Sensitive Fluorescent Dye as a Multidimensional Probe of Amyloid Formation. *J. Phys. Chem. B* **120**,

- 2087–2094 (2016).
95. Wainwright, M. ir Crossley, K. B. Methylene Blue - a Therapeutic Dye for All Seasons? *J. Chemother.* **14**, 431–443 (2002).
 96. Howland, R. H. Methylene Blue: The Long and Winding Road From Stain to Brain: Part 2. *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.* **54**, 21–26 (2016).
 97. Oz, M., Lorke, D. E. ir Petroianu, G. A. Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 927–932 (2009).
 98. Shahinyan, G. A., Amirbekyan, A. Y. ir Markarian, S. A. Photophysical properties of methylene blue in water and in aqueous solutions of dimethylsulfoxide. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **217**, 170–175 (2019).
 99. Berrocal, M., Corbacho, I., Gutierrez-Merino, C. ir Mata, A. M. Methylene blue activates the PMCA activity and cross-interacts with amyloid β -peptide, blocking A β -mediated PMCA inhibition. *Neuropharmacology* **139**, 163–172 (2018).
 100. Ziaunys, M. ir Smirnovas, V. Additional Thioflavin-T Binding Mode in Insulin Fibril Inner Core Region. *J. Phys. Chem. B* **123**, 8727–8732 (2019).
 101. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1767**, 1073–1101 (2007).
 102. Groenning, M. *et al.* Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **159**, 483–497 (2007).
 103. Ziaunys, M., Mikalauskaite, K. ir Smirnovas, V. Amyloidophilic Molecule Interactions on the Surface of Insulin Fibrils: Cooperative Binding and Fluorescence Quenching. *Sci. Rep.* **9**, 20303 (2019).
 104. Mikalauskaite, K., Ziaunys, M., Sneideris, T. ir Smirnovas, V. Effect of Ionic Strength on Thioflavin-T Affinity to Amyloid Fibrils and Its Fluorescence Intensity. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8916 (2020).