

VILNIAUS UNIVERSITETAS
BIOCHEMIJOS INSTITUTAS

SIMONA POVILONIENĖ

AMILOIDINES FIBRILES FORMUOJANČIŲ BALTYMŲ
TYRIMAS

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

VILNIUS 2011

Disertacija rengta 2006–2010 metais Biochemijos institute.

Mokslinė vadovė:

Dr. Vida Časaitė

(Vilniaus universitetas Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija –
04 P).

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	6
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Amiloidiniai baltymai ir peptidai.....	11
1.2.1. Amiloidozes sukeltantys baltymai.....	16
1.2.1.1. Aβ peptidai	18
1.2.1.2. α-Sinukleinas	20
1.2.2. Nepatogeniniai amiloidiniai baltymai.....	22
1.2.2.1. Kumelės pieno lizocimas	22
1.3. Fibrilių susidarymas <i>in vitro</i> ir <i>in vivo</i>	24
1.3.1. Aminorūgščių sekos ir sąstato įtaka fibrilių susidarymui.....	28
1.3.2. Įvairių fizikocheminių veiksnių įtaka amiloidinių fibrilių formavimui.....	33
1.3.3. Oligomerų formavimasis ir toksiškumas	36
1.3.4. Fibrilių susidarymo slopikliai	37
1.4. Fibrilių savybės.....	39
1.5. Fibrilinių struktūrų panaudojimas biotechnologijoje	43
2.1. Reagentai	48
2.2. Bakterijos ir plazmidės	49
2.3. Terpės	51
2.4. Plazmidinės DNR išskyrimas	52
2.5. Greitas plazmidinės DNR išskyrimo metodas.....	52
2.6. Polimerazės grandininė reakcija (PGR).....	52
2.6.1. Pradmenys.....	52
2.7. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis	53
2.8. DNR elektroforetinis frakcionavimas agarozės gelyje	54
2.9. DNR fragmentų iš agarozės gelio gryninimas.....	54
2.10. DNR ligavimas	54
2.11. Elektro-imliųjų ląstelių ruošimas ir elektroporacija	54
2.12. Nukleotidų sekos nustatymas	55
2.13. Beląstelinio ekstrakto paruošimas	55
2.14. Baltymų frakcionavimas poliakrilamidiniame gelyje (NDS PAAG).....	56
2.15. Baltymų gryninimas	56
2.16. Baltymų gryninimas iš intarpinių kūnelių	57
2.17. Hibridinių Aβ ir tioredoksino baltymų hidrolizė kaspaze 7	57
2.18. Aβ peptidų gryninimas	57
2.19. Mutantinių hibridinių Trx-Aβ40 baltymų konstravimas	58
2.20. Hibridinių aβ40, hidrofobino ir streptavidino baltymų konstravimas	58
2.21. Hibridinio nuo pirolochinolino chinono (PQQ) priklausomos gliukozės dehidrogenazės iš <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ir Aβ40 baltymo konstravimas.....	58
2.22. Hibridinio nuo pirolochinolino chinono (PQQ) priklausomos gliukozės dehidrogenazės iš <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ir α-syn baltymo konstravimas	59

2.23. Hibridinio nuo pirolochinolino chinono (PQQ) priklausomos gliukozės dehidrogenazės iš <i>E. coli</i> ir Aβ40 peptido baltymo konstravimas	60
2.24. α-Syncys141 konstravimas; α-Syn ir α-Syncys141 raiška ir gryninimas	60
2.25. α-Syn ir α-Syncys141 raiška ir gryninimas	60
2.26. Kumelės pieno lizocimo (EL) baltymą koduojančio geno klonavimas.....	61
2.27 EL baltymą koduojančio geno raiška ir gryninimas	61
2.28. EL aktyvumo nustatymas	62
2.29. Hibridinių Trx ir Aβ40 mutantinių baltymų sąveikos su hemu nustatymas.....	62
2.30. Peroksidazės aktyvumo nustatymas hibridinių TRX-Aβ40 baltymų ir hemo komplekse	63
2.31. Baltymų fibrilinimas	63
2.32. Tioflavino T (ThT) fluorescencijos matavimas	63
2.33. AJM pavyzdžių paruošimas.....	64
2.34. Fibrilių modifikavimas biotinu	64
2.35. TEM mėginių paruošimas	65
2.36. tetramerinio streptavidino aktyvumo nustatymas	65
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	66
3.1. Aβ amiloidiniai peptidai	66
3.1.1. Rekombinantinių Aβ peptidų gryninimas	66
3.1.2. Mutantinių Aβ40 peptidų fibrilinimas ir savaiminių β-klostinių struktūrų tyrimas	70
3.1.3. Mutantinių Aβ40cys2 ir Aβ40cys39 baltymų modifikavimas aukso nanodalelėmis	74
3.1.4. Hibridinio Trx-Aβ40 baltymo mutantų konstravimas, raiška ir gryninimas	78
3.1.4.1. Hibridinio Trx-Aβ40 baltymo mutantų sąveikos su hemu tyrimas	79
3.1.5. Hibridiniai baltymai sudaryti iš Aβ40 peptido ir kitų neamiloidinių baltymų ..	82
3.1.5.1. Hibridinių Aβ40 peptido ir streptavidino bei hidrofobino baltymų konstravimas ir raiška	82
3.1.5.2. Hibridinių Aβ40 peptido ir streptavidino (monomerinio ir tetramerinio) bei hidrofobino fibrilinimas ir susidariusių struktūrų tyrimas	84
3.1.6.1. Hibridinio nuo PQQ priklausomos GDH iš <i>Acinetobacter sp.</i> ir Aβ40 peptido baltymo konstravimas ir raiška	88
3.1.6.2. Hibridinių baltymų, sudarytų iš Aβ40 peptido ir nuo PQQ priklausomos dehidrogenazės iš <i>Acinetobacter sp.</i> , fibrilinimas ir susidariusių struktūrų tyrimas ..	90
3.1.7. Hibridinio PQQ-GDH iš <i>E. coli</i> ir Aβ40 peptido baltymo konstravimas ir raiška	94
3.2.1. Mutantinio α-Syncys141 konstravimas, raiška ir gryninimas	96
3.2.2. Mutantinio α-Syncys141 baltymo β-klostinių struktūrų formavimosi tyrimas.....	97
3.2.3. Mutantinio α-Syncys141 baltymo fibrilinių struktūrų modifikavimas	98
3.2.4. Hibridinio nuo PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės iš <i>Acinetobacter sp.</i> ir α-Syn baltymo konstravimas ir raiška.....	102
3.2.4.1 Hibridinio nuo PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės iš <i>Acinetobacter sp.</i> ir α-Syn baltymo fibrilių tyrimas	104
3.3. Kumelės pieno lizocimas (EL)	106

3.3.1. EL geno klonavimas ir gryninimas.....	106
3.3.2. Kumelės pieno lizocimo fibrilinimo tyrimas.....	109
3.4 Aptarimas.....	111
IŠVADOS.....	117
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA.....	118
PADĖKA.....	120
LITERATŪROS SARAŠAS.....	121

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ACN	Acetonitrilas
AHT	Anhidrotetraciklinas
AJM	Atominės jėgos mikroskopija
AL	Alzheimerio liga
apm	Apsisukimai per minutę
APP	Amiloido pirmtako baltymas
A β	β amiloido peptidas
α -Syn	α -sinukleinas
β ME	β -merkptoetanolis
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgštis
EL	Kumelės pieno lizocimas
GDH	Gliukozės dehidrogenazė
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
NDS	Natrio dodecilsulfatas
OD ₆₀₀	Optinis tankis 600 nm
PAAG	Poliakrilamidinis gelis
PGR	Polimerazės grandininė reakcija
PL	Parkinsono liga
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoridas
PQQ	Pirolochinolino chinonas
TEM	Peršvietimo (transmisinė) elektroninė mikroskopija
ThT	TioflavinasT
TMB	Tetrametilbenzidinas
Tris	Tris-(hidroksimetil)-aminometanas
Trx	Tioredoksinas

ĮVADAS

Biomolekulių savitvarka – galingas įrankis kuriant naujas nano-dydžio medžiagas bei prietaisus (Zhao ir Zhang, 2004). Tokių funkcionalizuotų nanomedžiagų, pasižyminčių unikaliomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, kūrimas leidžia diegti naujoves biomedicinos srityje – konstruojant įvairius biojutiklius, elektrocheminius įrenginius, medicininius preparatus (Zhao ir Zhang, 2004; Wang ir kt., 2009). Molekulinė savitvarka yra paplitusi gamtoje. Čia naudojama „statyba iš apačios“ (angl., bottom-up) strategija, kai biologinės kilmės nano statybiniai blokai: nukleorūgštys (DNR ir RNR), baltymai, peptidai, bakteriofagai ar augalų virusai bei lipidai savaime formuoja sudėtingas struktūras (Zhao ir Zhang, 2007). Lyginant su DNR, baltymai yra labiau chemiškai bei biologiškai „lankstesni“. Be to, baltyminės kilmės statybiniai blokai pasižymi heterogeniškumu. Baltyminės kilmės medžiagas galima genetiškai ar chemiškai modifikuoti, bei panaudoti savitoms sistemoms konstruoti. Tarp jau sukurtų nanodydžio konstrukto, didžiąją dalį sudaro iš peptidų pagaminti nanovamzdeliai (Zhang ir kt., 2002; Gazit, 2007).

Šiuo metu didelis dėmesys yra skiriamas su neurodegeneracinėmis ligomis siejamų amiloidinių baltymų grupei. Dėl jų gebėjimo formuoti savitvarkius darinius – iš β -klostinių struktūrų sudarytas fibriles, šie baltymai tampa vis labiau patrauklūs naujų nanomedžiagų kūrimui (Harrison ir kt., 2007). Molekulinės savitvarkos ir programuotos agregacijos reiškiniai įsisavinimas padeda kurti pagrindinius mikro- ir nano-gamybos inžinerinius principus (Zhao ir Zhang, 2004).

Atsižvelgiant į tai, pagrindinis šio darbo tikslas yra sukonstruoti naujus rekombinantinius baltymus bei kurti mutantinius ir hibridinius nano-biomolekulinius darinius, pagrįstus β -klostines fibriles sudarančiais baltymais ir peptidais, tirti savaiminio formavimosi dėsningumus ir formavimąsi lemiančias sąlygas, o taip pat aprašyti tokių darinių savybes bei charakteringus parametrus.

Darbo tikslas ir uždaviniai:

Šio tiriamojo darbo tikslas yra sukonstruoti naujus hibridinius baltymus, pasižyminčius amiloidinių baltymų savybėmis, iširti šių baltymų

formuojamas nanostruktūras ir aprašyti gautų nanokonstruktų savybes bei parametrus. Šiam tikslui įgyvendinti buvo suformuluoti tokie uždaviniai:

- sukonstruoti amiloidines fibriles formuojančių baltymų A β peptido ir α -sinukleino (A β 40 ir α -Syn) mutantus bei ištirti šių baltymų β -klostinių struktūrų formavimosi sąlygas;
- ištirti A β 40 ir α -Syn mutantinių baltymų funkcinio modifikavimo galimybes;
- nustatyti, ar histidinai yra svarbūs A β 40 peptidui sąveikaujant su hemu;
- sukonstruoti hibridinius baltymus, turinčius β -klostinių fibrilių savaiminį formavimąsi lemiančius domenų bei ištirti šių baltymų savybes ir gebėjimą formuoti fibriles;
- klonuoti kumelės pieno lizocimo geną ir ekspresuoti jį *E. coli* ląstelėse, ištirti rekombinantinio lizocimo gebėjimą formuoti β -klostines fibriles.

Mokslinis naujumas:

Dėl savo gebėjimo jungtis į aukštesnes struktūras amiloidiniai baltymai tapo labai patraukliu objektu nanobiotechnologijoje. β -klostinių struktūrų formavimu pasižymintys savitvarkės biomolekulės gali būti pritaikomos unikalų medžiagų, su įvairiomis naujomis elektrinėmis, optinėmis, katalizinėmis ir/ar mechaninėmis savybėmis, kūrimui (Tsai ir kt., 2006). Šiame darbe buvo siekiama ištirti A β 40 peptido ir α -Syn baltymų panaudojimo galimybes kuriant hibridinius nanodarinius, kuriuose šie baltymai tarnautų kaip β -klostines struktūras formuojantys statybiniai blokai.

Tam tikslui, A β 40 ir α -Syn sekų pagrindu, buvo sukonstruoti nauji mutantiniai ir hibridiniai baltymai. A β 40 ir jo fragmentai jau yra naudojami kuriant įvairius nanodarinius. Šiame darbe buvo naudojami A β 40 mutantiniai peptidai, kurių N ir C gale po vieną aminorūgštį pakeitėme į cisteiną (A β 40cys2 ir A β 40cys39). Tokie peptidai taip pat formavo β -klostines struktūras – fibriles, kurios gali būti modifikuojamos per cisteino tiolinę grupę. Modifikuojant A β 40cys2 peptidą aukso nanodalelėmis, buvo nustatyta, kad fibrilių formavimas tiesiogiai priklauso nuo aukso nanodalelių buvimo.

A β 40 peptido pagrindu buvo sukurti nauji hibridiniai baltymai su nuo PQQ priklausoma gliukozės dehidrogenaze (GDH). Tokie hibridiniai baltymai taip pat gebėjo agreguoti į β -klostines struktūras. Buvo tikimasi, kad parinkus optimalias sąlygas, baltymai formuos fibriles su aktyvia GDH forma. Tokia susidariusi struktūra gali būti naudojama biojutiklių gamyboje. Be to, šio darbo metu buvo sukonstruotas hibridinis baltymas, streptavidino bei A β 40 sekų pagrindu. Optimizavus fibrilinimo sąlygas buvo gautas į tinklą panašus nanodariny, kuris gali būti naudojamas fermentų bei kitų medžiagų imobilizavimui.

Buvo parodyta, kad A β 42 sąveikauja su hemu, o susidaręs kompleksas funkcionuoja kaip peroksidazė (Atamna ir Boyle, 2006). Tačiau nebuvo aišku, ar A β 40 gali jungtis su hemu. Taip pat nebuvo žinoma, ar A β 40 sekoje esantys histidiniai yra esminiai šioje sąveikoje. Tam tikslui buvo sukonstruoti hibridinio baltymo Trx-A β 40 mutantai, kuriuose A β 40 sekoje esantys histidiniai buvo pakeisti kitomis aminorūgštimis. Šiame darbe parodyta, kad histidiniai yra svarbūs A β 40 peptidui sąveikaujant su hemu. Be to, nustatyta, kad hibridinio Trx-A β 40 baltymo ir hemo kompleksas pasižymi peroksidaziniu aktyvumu.

Kuriant naujas nanostruktūras buvo naudojamas ir α -Syn baltymas, kurio pagrindu buvo konstruojami mutantinis ir hibridinis baltymai. Buvo sukonstruotas α -Syn₁₄₁ mutantinis baltymas, kuris agregavo į tvarkingas β -klostines struktūras kaip ir laukinio tipo α -Syn. Be to, pirmą kartą buvo pademonstruota galimybė modifikuoti fibriles, sudarytas iš α -Syn₁₄₁. Literatūroje yra minimi α -Syn pagrindu sukurti mutantai, kurie buvo modifikuojami cheminėmis grupėmis ir tik po to fibrilinami (Yushchenko ir kt., 2010). Šiame darbe buvo parodyta, kad po to, kai α -Syn₁₄₁ peptidas susirenka į fibriles, jos gali būti chemiškai modifikuojamos biotinu ir aukso nanodalelėmis su konjuguotu neutravidinu.

Sukurtas α -Syn ir PQQ-GDH hibridinis baltymas taip pat galėjo formuoti skirtingos morfologijos fibriles. Šiame darbe buvo pademonstruota,

kad α -Syn ir PQQ-GDH hibridinis baltymas susirenka į fibrilines struktūras, kai tirpale yra fibrilizaciją skatinantis veiksnys – laukinio tipo α -Syn baltymas.

Šiame darbe pirmą kartą buvo aprašyta aktyvaus rekombinantinio kumelės pieno lizocimo (EL) gamyba *E. coli* ląstelėse. Buvo sukonstruotos dvi baltymo raiškos plazmidės ir sukurta rekombinantinio lizocimo gryninimo procedūra. Buvo žinoma, kad EL gali būti ekspresuojamas filamentiniuose grybuose *Aspergillus niger* (Spencer ir kt., 1999). Šiuo atveju, rekombinantinio baltymo gryninimą apsunkino grybo išskiriami pigmentai. EL raiška *E. coli* ląstelėse leidžia išvengti problemų gryninimo metu. Fibrilinimo tyrimai parodė, kad rekombinantinis EL formavo panašias struktūras kaip ir iš kumelės pieno išskirtas EL.

Atliktų eksperimentų rezultatai rodo, kad sukonstruotų naujų amiloidines fibriles formuoti gebančių hibridinių ir mutantinių baltymų rinkinys yra svarbus, kuriant funkcionalizuotus nanodarinius.

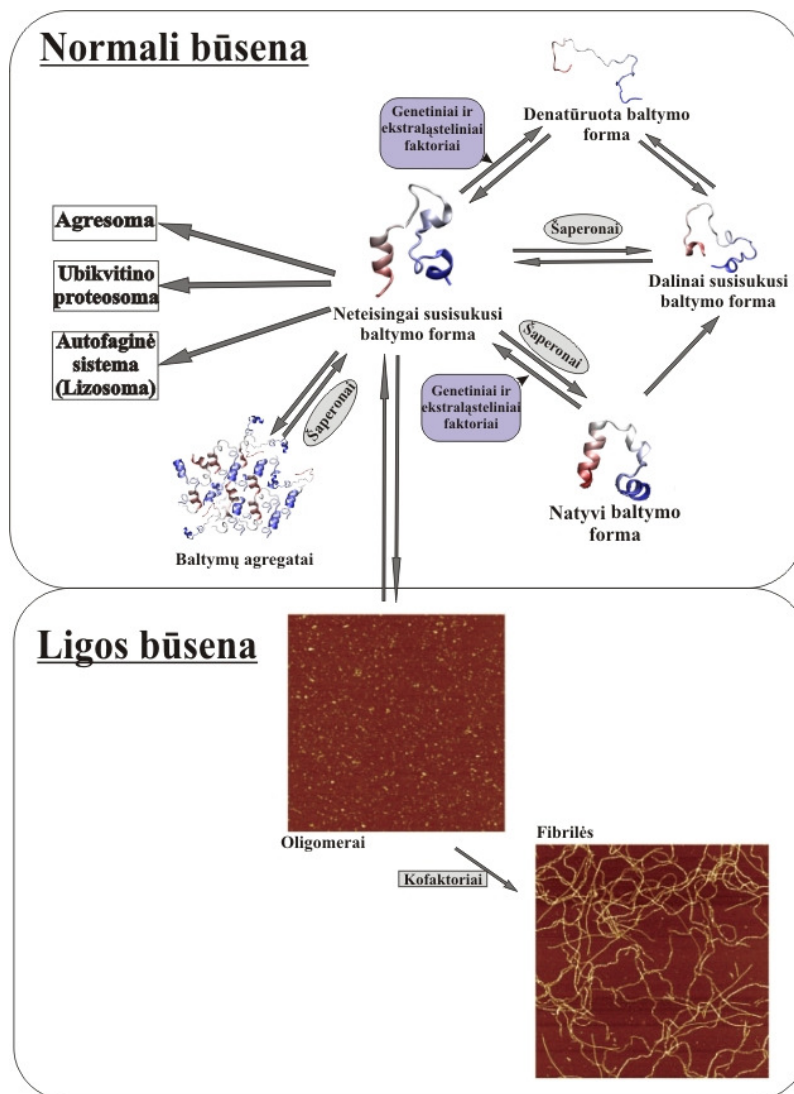
Ginamieji disertacijos teiginiai:

- A β 40 ir α -Syn mutantiniai baltymai gali formuoti fibrilines struktūras, kurios gali būti modifikuojamos funkcinėmis grupėmis.
- Hibridiniai baltymai sudaryti iš A β 40 arba α -Syn ir kitų baltymų (PQQ-GDH, streptavidino ir hidrofobino) formuoja skirtingos morfologijos fibriles ir gali būti naudojami nanosistemų kūrimui.
- A β 40 peptidas sąveikauja su hemu per histidino radikalus, o susidaręs kompleksas gali funkcionuoti kaip peroksidazė.
- EL gali būti ekspresuojamas *E. coli* ląstelėse, o rekombinantinis baltymas gali sudaryti panašias į laukinio tipo EL formuojamas fibrilines struktūras.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. AMILOIDINIAI BALTYMAI IR PEPTIDAI

Apie 50% ląstelėje naujai susintetinamų baltymų ir peptidų praranda savo natūralią struktūrą ir agreguoja arba neteisingai susisuka (1.1 pav.). Dėl to, ląstelėse ir organizmuose veikia kokybės kontrolės sistemos, kurios reguliuoja neteisingo susisukimo ar agregacijos procesus, pvz.: šaperonai, ubikvitino-proteosoma, agresoma ir autofaginė sistema (Jahn ir Radford, 2005; Shivaprasad ir Wetzel, 2006).

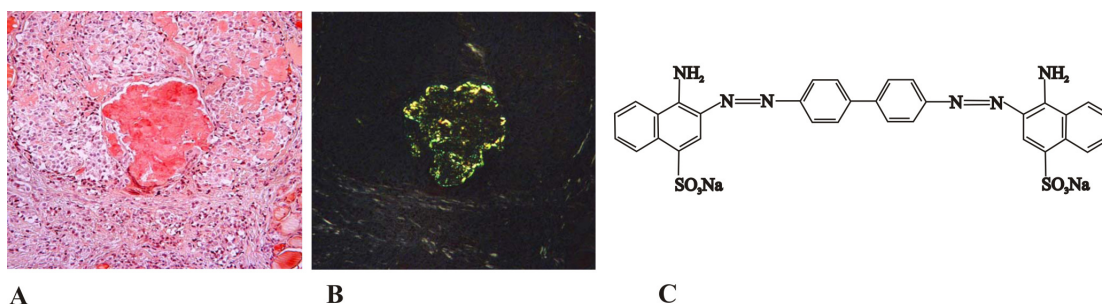


1.1 pav. Baltymų teisingo ir neteisingo susisukimo, agregacijos ir oligomerų bei fibrilių formavimą lemiančių veiksnių ir procesų schema (pagal Stine ir kt., 2003; Jahn ir Radford, 2005; Shivaprasad ir Wetzel, 2006; Freddolino ir kt., 2008).

Neteisingai susisukę baltymai, kurie dažniausiai sudaro β -klosčių struktūros agregatus, yra siejami su daugeliu neurodegeneracinių ligų. Šios ligos yra vadinamos amiloidozėmis (Alzheimerio, Hantingtono, Parkinsono ir kt.). Sergant šiomis ir kai kuriomis kitomis ligomis, baltymai formuoja panašios morfologijos struktūras, vadinamas amiloidinėmis fibrilėmis (Shivaprasad ir Wetzel, 2006). Gamtoje egzistuoja baltymai ir peptidai (hidrofobiniai, kurliniai, čaplinai, lizocimas), kurių agregacija yra būtina kai kuriems ląsteliniams mechanizms (ląstelės prisitvirtinimui, genų raiškos reguliacijai) (True ir Lindquist, 2000; Chapman ir kt. 2002).

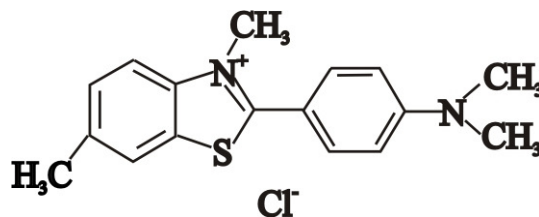
Terminą „amiloidas“ [gr. *amylon* – krakmolos + gr. *eidos* – pavidalas] pirmą kartą paminėjo Matthias Jakob Schleiden 1838 m. Vėliau, Rudolf Virchow 1854 m. šį terminą pavartojo aprašydamas makroskopinius žmogaus patologinius baltymų mėginius, kurie su sieros rūgštimi ir jodo tirpalu nusidažydavo mėlynai-violetine spalva (Sipe ir Cohen, 2000; Fändrich, 2007). Šiais laikais amiloidais yra vadinamos užląstelinės baltymų fibrilių sankaupos, kurios tiriant įvairiais metodais, tokiais kaip tyrimas atominės jėgos mikroskopija (AJM), rentgeno spindulių difrakcija bei atliekant specifines reakcijas su Kongo raudonuoju ir tioflavinu T, pasižymi tam tikromis ypatybėmis (Fändrich, 2007). Kai kurie amiloidams tirti naudojami metodai apžvelgiami detaliau.

Kongo raudonasis dažas (KR) (angl., Congo Red) yra naudojamas kiekybiniam amiloidų nustatymui audiniuose, o taip pat apibūdinant amiloidines fibriles *in vitro*. KR prisijungia prie fibrilių ir nudažo raudona spalva, o poliarizuotoje šviesoje švyti žaliai geltona spalva (1.2 pav.) (angl., green birefringence) (Thompson ir kt., 2000; Khurana ir kt., 2001). Manoma, kad dažas jungiasi su baltymais per elektrostazines ir hidrofobines sąveikas (Khurana ir kt., 2001).



1.2 pav. Amiloidinių fibrilių vaizdas nudažius Kongo raudonuoju dažu: fibrilės nusidažo raudonai (A), o poliarizuotoje šviesoje švyti žalia spalva (B) (Makštienė, 2005) ir Kongo raudonojo dažo cheminė struktūra (C).

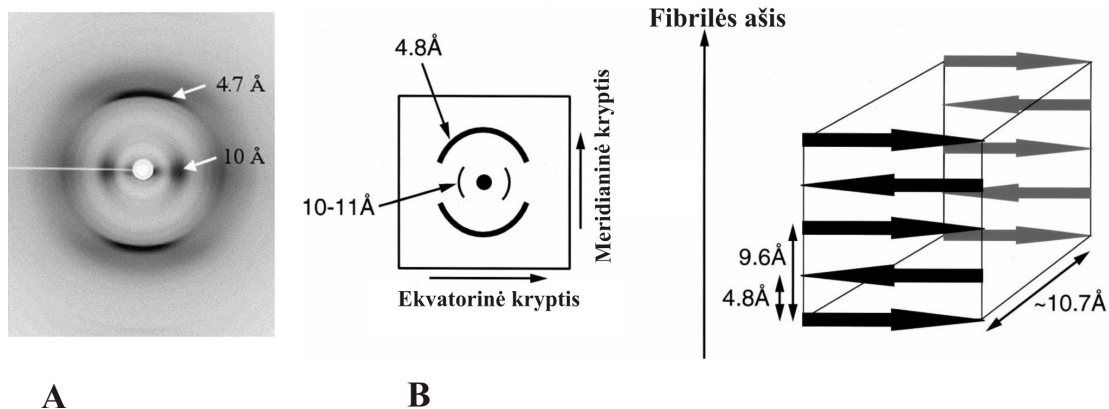
Tioflavinas T (ThT) yra benzotiazolo dažas (1.3 pav.), kurio fluorescencija sustiprėja jam prisijungus prie amiloidinių fibrilių. Dėl to, šis dažas naudojamas diagnozuojant amiloidines fibriles *ex vivo* ir *in vitro* (Khurana ir kt., 2005). ThT fluorescencija yra dažniausiai naudojama kinetiniams amiloidų augimo tirpaluose tyrimams.



1.3 pav. Tioflavino T cheminė struktūra. Šis dažas turi hidrofobinę dalį, kurioje dimetilamino grupė prijungta prie fenilo grupės, kitame gale yra labiau polinė benzotiazolo grupė su poliniais N ir S atomais. Tokia polinio ir hidrofobinio regiono kombinacija leidžia tioflavino T molekulėms vandeniniuose tirpaluose formuoti mices. Yra manoma, kad tiazolo N atomas vandenilinius ryšius sudaro su audinių struktūrų hidroksilo grupėmis, dėl to stebima specifinė sąveika tarp dažo molekulių ir amiloidų (Khurana ir kt., 2005).

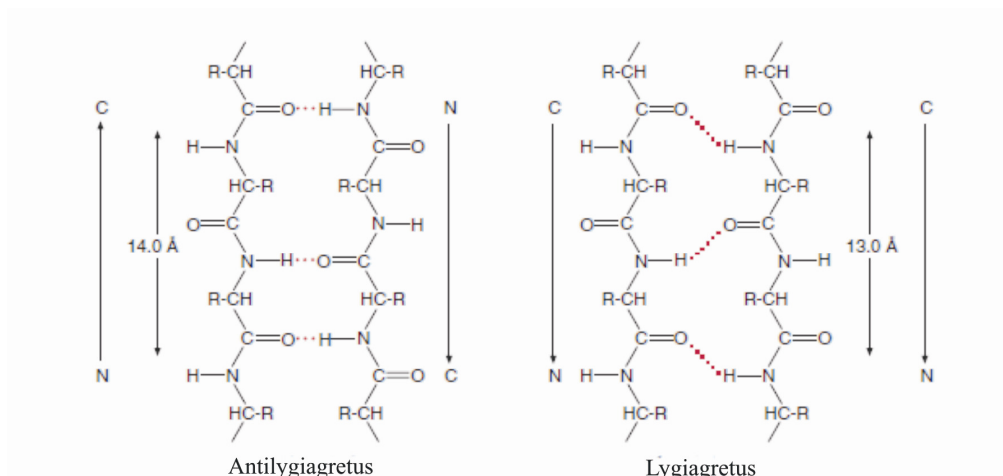
Nors amiloidiniai baltymai ir peptidai yra labai heterogeniški, jiems būdinga tai, kad jie visi formuoja antrines β klostines struktūras, kurios sudaro fibrilių pagrindą. Ir KR dažas, ir ThT jungiasi prie tvarkingos β -klostytos amiloidų struktūros.

Rentgeno spindulių difrakcijos metodu galima tirti struktūrinius amiloidinių fibrilių lygmenis bei stebėti susidariusias pasikartojančias β -klosčių struktūras (1.4 pav.).



1.4 pav. Rentgeno spindulių difrakcijos pavyzdys (A) iš dalinai surikiuotų amiloidinių fibrilių, suformuotų *in vitro* iš A β 2. Matomi skersinei β struktūrai būdingi difrakcijos signalai: ties meridianu 4,7 Å ir pusiauju 10 Å (Stromer ir Serpell, 2005). Schematinis rentgeno spindulių difrakcijos su amiloidinėmis fibrilėmis vaizdas (B). Stiprus 4,8 Å signalas ties meridianu atitinka vandenilinės jungties atstumą tarp L grandinių (L-strands), labiau išsklaidytas 10–11 Å signalas ties pusiauju nurodo atstumą tarp lakštų (10,7 Å). 9,6 Å tarpas atitiktų atstumą tarp pakartotinai antiparaleliai išsidėsčiusių L-grandinių (pagal Serpell, 2000).

Kiekvienos β -klostės atskiros grandinės išsidėsto statmenai fibrilių ašiai (4,7 Å tarpas), o β -klostės (~10 Å tarpas) išsidėsto lygiagrečiai fibrilių ašiai (Maji ir kt., 2009). Priklausomai nuo baltymo ar peptido, β -klosčių grandinės gali būti išsidėsčiusios lygiagrečiai arba antilygiagrečiai (1.5 pav.) (Balbach ir kt., 2002).

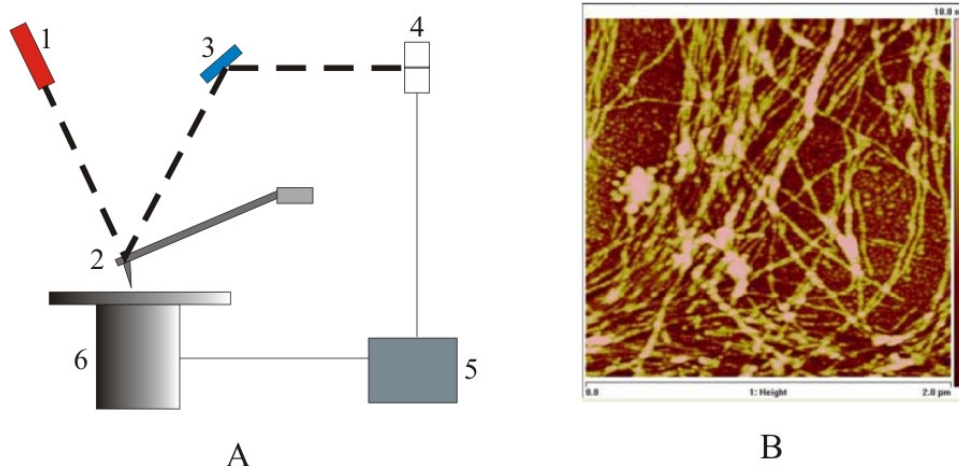


1.5 pav. Dvi β -klosčių struktūros išsidėstymo formos. Vandeniliniai ryšiai pavaizduoti punktyrine linija. (McKee–McKee: Biochemistry: The Molecular Basis of Life, Third Edition, 2003).

Beta lakštinė struktūra stabilizuojant baltymo struktūrą dažniausiai veikia kaip karkasas. Be to, ji yra svarbus atpažinimo motyvas baltymo–baltymo bei baltymo–DNR sąveikose, reguliuojančiose kai kuriuos biologinius procesus bei vaidina svarbų vaidmenį ligų patogenezėje (Harrison ir kt., 2007).

Vienas iš pagrindinių metodų, naudojamų kokybiškai ir kiekybiškai aprašant fibriles, yra atominės jėgos mikroskopija (AJM). Šis svarbus ir universalus metodas pritaikomas įvairiose mokslo srityse. Su AJM galima vizualizuoti paviršiaus savybes, nustatyti biomolekulines sąveikas ir t.t. Šiuo metu labai sparčiai vystosi AJM pagrįstos nanotechnologijos, tokios kaip nanomanipuliacija, nanolitografija, nanoskiepėjimas, nanooksidacija. AJM yra naudojama atliekant mėginio paviršiaus fizines ir chemines modifikacijas nanometrinėje skalėje. AJM metodu pagrįstos nanotechnologijos turi didžiuosius pritaikymo galimybes nanoelektronikoje, bioanalizėje, biojutiklių ir kitų nanoprietaisų kūrime (Tang ir kt., 2004).

AJM (1.6 pav.) leidžia tirti fibrilių morfologiją, tiesiogiai atlikti fibrilogenozės kinetikos matavimus. Šiuo metodu galima nustatyti *in situ* kaip aplinkos sąlygos lemia fibrilių morfologiją ir formavimąsi, matuoti fibrilių mechanines savybes ir kt. (Goldsbury ir kt., 1999; Chamberlain ir kt., 2000; Blackley ir kt., 2000; Khurana ir kt., 2003).



1.6 pav. Atominės jėgos mikroskopo (AJM) veikimo schema (A). 1 – lazerinis diodas, 2 – skenavimo adata, 3 – veidrodis, 4 – fotodetektorius, 5 – elektronika, 6 – skeneris su mėginiu (Braga ir Ricci, 2004). Lizocimo fibrilių vaizdas stebimas AJM (B) (Šetkus ir kt., 2009).

Yra ir kitų metodų, kuriais galima charakterizuoti amiloidines fibriles. Tai branduolio magnetinis rezonansas (BMR) atliekamas fibrilių struktūrai nustatyti (Antzutkin ir kt., 2000; Balbach ir kt., 2002; Petkova ir kt., 2002; Jaroniec ir kt., 2004), apskritiminis dichrozmas ir Furje transformacinė infraraudonosios spinduliuotės (FTIR) spektroskopija. Ji naudojama nustatant antrinę baltymų/fibrilių struktūrą bei nustatant fibrilogenezės greitį (Chiti ir kt., 1999). Fibrilių morfologija ir kinetinė fibrilogenezė *ex situ* tiriama peršviečiamuoju (TEM) ar skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM) (Sunde ir Blake, 1997; Malinchik ir kt., 1998; Tjernberg ir kt., 1999, 2002).

Šiuo metu amiloidiniai baltymai yra skirstomi į kelias grupes. Pirmai grupei priskiriami amiloidozes sukeltys patologiniai amiloidiniai baltymai ir jų pirmtakai. Antrą grupę sudaro neamiloidogeniniai baltymai ar peptidai, kurie formuoja fibriles *in vivo*. Trečioji grupė – nepatologiniai amiloidiniai baltymai, kurie ląstelėje atlieka tam tikrą funkciją (Harrison ir kt., 2007).

1.2.1. Amiloidozes sukeltys baltymai

Nemažai žmogaus ligų yra siejamos su baltymų ar peptidų natyvios konformacijos praradimu. Amiloidai susiformuoja iš tirpių baltymų, kurie neįprastai agreguoja ir suformuoja tvarkingus darinius už ląstelės ribų arba ląstelės viduje (Chiti and Dobson, 2006). Šios amiloidinės sankaupos yra sudarytos iš savo morfologija panašių struktūrinių vienetų (Stromer ir Serpell, 2005).

Šiuo metu yra žinoma daugiau nei 30 žmogaus ligų, kurias sukelia amiloidinės prigimties baltymai (patvirtinta Tarptautinės amiloidozių organizacijos nomenklatūros komiteto). Amiloidozės yra skirstomos į kelias grupes (Harrison ir kt., 2007):

- Neurodegeneracinės ligos – sergant šiomis ligomis agregacija pasireiškia smegenyse;
- Neneuropatinės lokalizuotos amiloidozės – kai agregacija pasireiškia tam tikro tipo audiniuose, bet ne smegenyse;

- Neneuropatinės sisteminės amiloidozės, kai agregacija pasireiškia keliuose ir daugiau audinių, bet ne smegenyse (1 lentelė) (Chiti ir Dobson, 2006):

1.1 lentelė. Neurodegeneracinių ligų sąrašas

Liga	Agreguojantys baltymai ar peptidai	Aminorūgščių skaičius
Neurodegeneracinės ligos		
Alzheimerio liga	Amiloido β peptidas	40–42
Spongiforminė encefalopatija	Priono baltymas arba jo fragmentai	253
Parkinsono liga	α -Sinukleinas	140
Demensija su Lewy kūneliais	α -Sinukleinas	140
Frontotemporalinė demensija su parkinsonizmu	Tau	352–441
Amiotrofinė lateralinė sklerozė	Superoksido dismutazė 1	153
Hantingtono liga	Hantingtinas su poliglutaminų seka	3144
ir kt.		
Ne neuropatinės sisteminės amiloidozės		
AL amiloidozė	Imunoglobulino lengvosios grandinės ar fragmentai	~90
AA amiloidozė	Serumo amiloido A baltymo fragmentai	76–104
Šeiminė Viduržemio jūros karštligė	Serumo amiloido A baltymo fragmentai	76–104
Senatvinė sisteminė amiloidozė	Laukinio tipo transtiretinas	127
Šeiminė amiloidotinė polineuropatija	Transtiretino mutantai	127
Suomių paveldima amiloidozė	Gelsolino mutantų fragmentai	71

Lizocimo amiloidozė	Lizocimo mutantai	130
Fibrinogeno amiloidozė	Fibrinogeno α grandinės variantai	27–81
Ne neuropatinės lokalizuotos ligos		
II tipo diabetas	Amilinas	37
Skyd liaukės modulinė karcinoma	Kalcitoninas	32
Prieširdžio amiloidozė	Prieširdžio natriuretinis faktorius	28
Paveldima cerebralinė hemoragija su amiloidoze	Amiloido β peptido mutantai	40–42
Hipofizės prolaktinoma	Prolaktinas	199
Ragenos amiloidozė susieta su trichiaze	Laktoferinas	692
Katarakta	γ kristalinai	varijuojantis
ir kt. ligos		

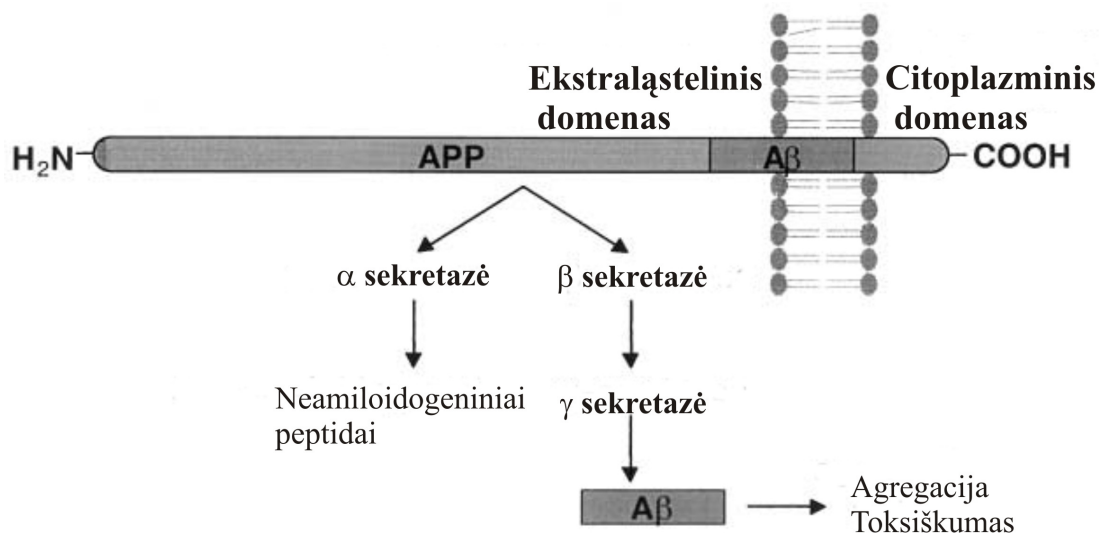
Kol kas nėra aišku, kas lemia baltymų konformacinius pokyčius *in vivo*. Yra žinoma, kad už toksiškumą ir amiloidinių ligų patologijas tarpinės tirpios agreguotos būsenos yra atsakingos labiau nei netirpūs polimeriniai agregatai (Gregersen ir kt., 2005; Chiti and Dobson, 2006). Amiloidinės sankaupos gali formuotis įvairiuose organuose ir audiniuose (Harrison ir kt., 2007). Beveik visi šie baltymai (išskyrus daug glutamino turinčius baltymus) yra nepanašūs tarpusavyje: skiriasi jų ilgis, hidrofobiškumas. Be to, *in vivo* stabilūs baltymai gali formuoti amiloidines fibriles, esant destabilizuojantiems veiksniams, tokiems kaip rūgštinis pH, organiniai tirpikliai ir pan. (Chiti ir Dobson, 2006, Harrison ir kt., 2007).

1.2.1.1. A β peptidai

Viena iš labiausiai tiriamų amiloidozių yra Alzheimerio liga (AL), kurios patologiniai žymenys yra amiloidinių plokštelių sankaupos smegenyse. Šios užląstelinės sankaupos yra sudarytos iš 40- ir 42-aminorūgščių liekanų

peptidų, vadinamų β amiloidiniais arba A β peptidais (~4 kDa) (Stromer ir Serpell, 2005). Normaliomis fiziologinėmis sąlygomis amiloido pirmtako baltymas β APP (angl., β amyloid precursor protein), kurį koduoja 21-os chromosomos q petyje randamas genas (Walsh ir Selkoe, 2007), yra I tipo ląstelės paviršiaus glikoproteinas, dalyvaujantis branduolio signalų keliuose. Jį sudaro iki 770 aminorūgščių. Baltymas taip pat gali stimuliuoti augimo procesą. Eksperimentai rodo, kad β APP fragmentai dalyvauja ir aksoniniame transporte (Kamal ir kt., 2000), ląstelės adhezijos procese, ląstelės išgyvenimo procese, cholesterolio metabolizme, genų transkripcijoje ir kognityviniuose procesuose (Turner ir kt., 2003). Šis baltymas *in vivo* yra proteolitiškai skaldomas trijų tipų proteazių: α -, β - ir γ - sekretazių (1.7 pav.). Veikiant β - ir γ - sekretazėms nuskeliami A β regiono N ir C galai. Priklausomai nuo vietos, kurioje skelia γ -sekretazė, susiformuoja kelių tipų A β peptidai (38, 39, 40, 42, 43- aminorūgščių ilgio) (Steiner ir kt., 1999; Clippingdale ir kt., 2001; Harrison ir kt., 2007; Walsh ir Selkoe, 2007). Trečioji α -sekretazė skelia A β amiloido domeno viduryje. Taip suardoma A β seka ir pasigamina neuroapsauginis sAPP α fragmentas. α - ir β -sekretazės gali konkuruoti dėl β APP skėlimo vietos, nes jų taikiniai yra šalia vienas kito (Silvestri ir Camaschella, 2008). Tokie subrendę A β peptidai yra sekretuojami į plazmą arba smegenų skystį.

A β peptidų gamyba *in vivo* yra normalus reiškinys (Stromer ir Serpell, 2005), bet kai kuriuose individuose yra stebima padidėjusi visų A β peptidų variantų gamyba arba padidėjęs A β 42 ir kitų A β peptidų santykis. Tai sukelia ankstyvą AL pradžią (Bentahir ir kt., 2006; Kumar-Singh ir kt., 2006; Rovelet-Lecrux ir kt., 2006). Manoma, kad A β 40 peptidas gali reguliuoti K⁺ kanalų aktyvumą ir moduluoti sinapsių transmisiją (Sgourakis ir kt., 2007). A β peptidai gali dalyvauti ir Ca²⁺ pralaidžių kanalų susidaryme ląstelės membranoje. Be to, susidarę A β oligomerai suardo tam tikras neuronų sinapses. Dėl šių citotoksinių procesų pradeda gamintis ir yra sekretuojamos toksiškos molekulės, pvz. azoto monoksidas (Arimon ir kt., 2005).



1.7 pav. Proteolizinis β APP baltymo skaldymas ir $A\beta$ peptidų brendimas *in vivo* (pagal Clippingdale ir kt., 2001).

Yra nustatyta, kad didžiąją dalį amiloidinių plokštelių sudaro $A\beta_{42}$ (labiausiai hidrofobinė ir neurotoksiška žmogaus $A\beta$ peptidų forma) (Arimon ir kt., 2005), nors $A\beta_{40}$ yra labiau vyraujanti – santykis $A\beta_{40}:A\beta_{42}$ yra $\sim 7:1$ (Olofsson ir kt., 2007). Amiloidų gamyba ir sancaupų formavimasis taip pat priklauso ir nuo kelių genetinių rizikos faktorių, įskaitant du homologiškus presenilinus koduojančių genų mutacijas (PS1 ir PS2, kurie skatina γ -sekretazės aktyvumą) bei mutacijas β APP gene (Steiner ir kt., 1999).

$A\beta$ amiloidinių fibrilių charakterizavimas yra sudėtingas procesas, nes susiformavusios sancaupos *in vivo* yra beveik netirpios ir dėl to jas labai sudėtinga išskirti (Olofsson ir kt., 2007).

1.2.1.2. α -Sinukleinas

α -Sinukleinas (α -Syn) yra sudarytas iš 140 aminorūgščių (~ 14 kDa) ir yra aptinkamas beveik tik neuronuose ir dažniausiai tik ląstelių viduje. α -Syn yra mažas tirpus baltymas, ekspresuojamas pirmiausiai presinaptiniuose galuose centrinėje nervų sistemoje. Susidomėjimas šiuo baltymu išaugo nustačius, kad jis susijęs su Parkinsono liga (PL). Tikslī α -Syn funkcija kol kas nežinoma, bet manoma, kad jis dalyvauja palaikant membranos stabilumą ir neuronų plastiškumą. Dėl biocheminių ir struktūrinių savybių yra manoma, kad

α -Syn priklauso su riebalų rūgštimis besijungiančių baltymų šeimai ir dėl to gali vykdyti riebalų rūgščių transportą neuronų citoplazmoje (Sharon ir kt., 2001). Įvairūs aplinkos ar genetiniai veiksniai gali lemti neteisingą α -Syn susisukimą ar normalios funkcijos praradimą (Recchia ir kt., 2004). PL yra antra labiausiai progresuojanti neurodegeneracinė smegenų liga (po Alzheimerio ligos) (Recchia ir kt., 2004). PL atveju yra stebimi citoplazminiai Lewy sankaupiniai kūneliai dopaminerginiuose neuronuose (Recchia ir kt., 2004; Tsigelny ir kt., 2008). Daugeliu PL atveju α -syn seka yra mutuota, tačiau ląsteliniai procesai taip pat turi įtakos nenormaliam šio baltymo metabolizmui ir kaupimuisi. α -syn (genas yra 4q21) priklauso sinukleinų šeimai, kuriai priklauso ir β -syn (5q35) bei γ -syn (10q23). Konservatyvūs α -Syn baltymo homologai būdingi žmonėms, paukščiams, pelėms, jaučiams ir žiurkėms, bet nerandami *Escherichia coli*, mielėse, *Caenorhabditis elegans* ar *Drosophila melanogaster*. α -Syn yra mažas labai karščiui atsparus rūgštinis baltymas.

Yra žinoma, kad $A\beta$ skatina α -Syn agregaciją ir toksiškumą *in vivo*. Be to, α -Syn ir $A\beta$ gali sąveikauti tarpusavyje *in vivo*, tačiau šios sąveikos molekulinės savybės ir pasekmės kol kas nėra aiškios (Tsigelny ir kt., 2008). Tyrimai parodė, kad $A\beta$ ir α -Syn sąveikauja *in vivo*, o ankstyvose stadijose $A\beta$ monomerų ir dimerų N galinis regionas sąveikauja su α -Syn N ir C galais. Dėl to susiformuoja pentamerai ir heksameras – į žiedą panašios struktūros (Tsigelny ir kt., 2008). Be to, ankstesni tyrimai parodė, kad AL atveju amiloidinių plokštelių sudėtyje yra α -Syn fragmentų (Kallhoff ir kt., 2007).

Dauguma modifikuotų α -Syn baltymų tyrimų yra nukreipta į toksiškumo ląstelėje mažinimo procesą (Recchia ir kt., 2008). Kol kas žinomi tik pavieniai tyrimai, kuriuose α -Syn baltymo formuojamos fibrilės yra naudojamos kaip statybinis elementas formuojant nanostruktūras, pvz.: α -Syn fibrilės buvo naudojamos kaip matrica paladžio, aukso, ir sidabro nanodalelių grandinių sintezei (Colby ir kt., 2008).

1.2.2. Nepatogeniniai amiloidiniai baltymai

Yra baltymų, kurie, esant tam tikroms sąlygoms, formuoja amiloidus *in vivo*, tačiau gali formuoti ir *in vitro*, pvz.: α -, β -, γ - kristalinai (Meehan ir kt., 2004), κ -kazeinas (Farrell ir kt., 2003), β -laktoglobulinai iš *Bos taurus* (Hamada ir Dobson, 2002), alkoholio dehidrogenazė iš *S. cerevisiae* (Zhang ir kt., 2004) ir kiti. Kai kurie žmogaus baltymai taip pat nėra linkę formuoti fibrilių *in vivo*, bet formuoja fibriles *in vitro* destabilizuojančiomis sąlygomis, pvz.: acetilcholinesterazės fragmentas (586–599 ar.) (Cottingham ir kt., 2002) arba CA150 (antras WW domenas) (Ferguson ir kt., 2006).

Bakterijos taip pat sintetina amiloidinius baltymus, kurių funkcija yra svarbi bakterijų fiziologijai. *E. coli* ir *Salmonella* spp. naudoja labai agreguotas iš kurlino baltymų sudarytas fibriles. Šios struktūros padeda kolonizuotis ir formuoti bioplėveles (biofilmus) (Loferer ir kt., 1997; Chapman ir kt., 2002).

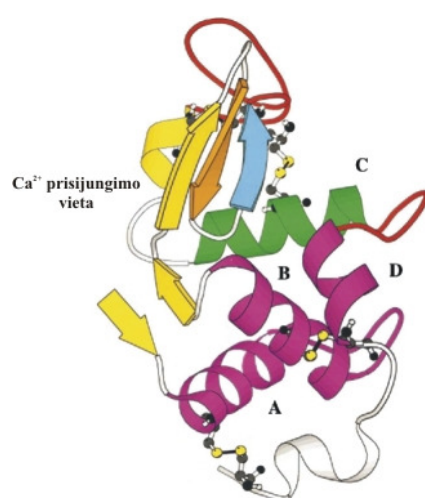
Siūlinės bakterijos *Streptomyces coelicolor* sekretuoja paviršiaus aktyvius baltymus, vadinamus čaplinais. Minėti baltymai formuoja neįprastas, į amiloidines panašias fibriles, reikalingas orinių struktūrų susidarymui (Talbot, 2003).

Grybams, kaip ir bakterijoms, reikia prisitvirtinti prie įvairių paviršių. I ir II klasės hidrofobinai yra maži, mikromicetinių grybų sekretuojami, cisteinu turtingi baltymai, kurie atlieka daug svarbių funkcijų grybų gyvybiniuose procesuose. Jie gali dalyvauti formuojantis hifams bei hifams prisijungiant prie hidrofobinių paviršių. Hidrofobinai savo funkcijas atlieka naudodami mechanizmus, paremtus jų savybe formuoti savitvarkes struktūras, esant hidrofilinei-hidrofobinei sąveikai (Wösten ir kt., 2001). Dėl polimerinės formos ir galimybės ją išardyti, paskutiniaisiais metais hidrofobinai vis labiau naudojami nanotechnologijoje (Sunde ir kt., 2008).

1.2.2.1. Kumelės pieno lizocimas

Kaip ir kiti amiloidiniai baltymai ($A\beta$, α -Syn), kumelės pieno lizocimas (EL) gali formuoti fibrilines struktūras. EL yra Ca^{2+} prisijungęs baltymas, turintis tiek c-tipo lizocimų tiek ir α -laktalbuminų savybių.

Tam tikromis sąlygomis šis baltymas formuoja žiedo formos protofilamentus, kurie dėl savo struktūrinių savybių gali būti įdomūs nanobiomolekulinių darinių formavimosi dėsningumams tirti. Šis procesas vyksta per tarpinę stabilios globulės stadiją, kuri būdinga daugeliui lizocimų. Lizocimai, kaip ir α -laktoalbuminai, yra sudaryti iš dviejų domenų: α -domenas yra turtingas α -spiralinių struktūrų, tuo tarpu β -domeną sudaro trys β -klostės ir keletas kilpų. Lizocimų sudėtyje yra konservatyvus cisteino liekanų skaičius, kurie sudaro keturis disulfidinius tiltelius (1.8 pav.) (Morozova-Roche, 2007).



1.8 pav. Schematinė EL erdvinė struktūra. A, B ir D sritys (pažymėtos violetine spalva) formuoja α -spirales. Mėlyna spalva žymi sritį apimančią 59–61 aminorūgštis, kurios formuoja β -klostę, C-spiralė (pažymėta žalia spalva), antrinės struktūros elementai (pažymėti geltona spalva), vidurinė sritis apimanti 51–55 aminorūgštis sudaro β -grandinę. Raudona spalva pažymėtos lėtai stabilizuojamos kilpos. 4 disulfidiniai tilteliai pažymėti geltonais sujungtais rutuliukais (Morozova-Roche, 2007).

Aktyviajame EL centre esančios Glu35 ir Asp52 liekanos yra atsakingos už fermentinį aktyvumą (Morozova-Roche, 2007).

Žmogaus ir vištos lizocimai taip pat yra $\alpha+\beta$ (sudaryti iš α -spiralinių ir β -klosčių) baltymai (Chamberlain ir kt., 2000; Ohnishi ir Takano, 2004).

EL gali būti lengvai gryninamas iš pieno, tačiau kai kuriems struktūriniams tyrimams ar baltymo mutagenezei reikalingas rekombinantinis baltymas. Iki šiol, EL buvo ekspresuotas *Aspergillus niger* filamentiniuose grybuose (Spencer ir kt., 1999).

Naudojant susidariusias iš EL amiloidines fibriles kaip biomatričią, buvo gautos 1 nm ir apie 2 μ m ilgio sidabrinės vielės, kurios gali būti pritaikomos nanobiotechnologinėje gamyboje (Mališauskas ir kt., 2008).

Naudojant lizocimo vandeninį tirpalą buvo gauti ir fibriliniai hidrogeliai, kurie gali būti panaudojami audinių auginimui kaip matrica (Yan ir kt., 2006).

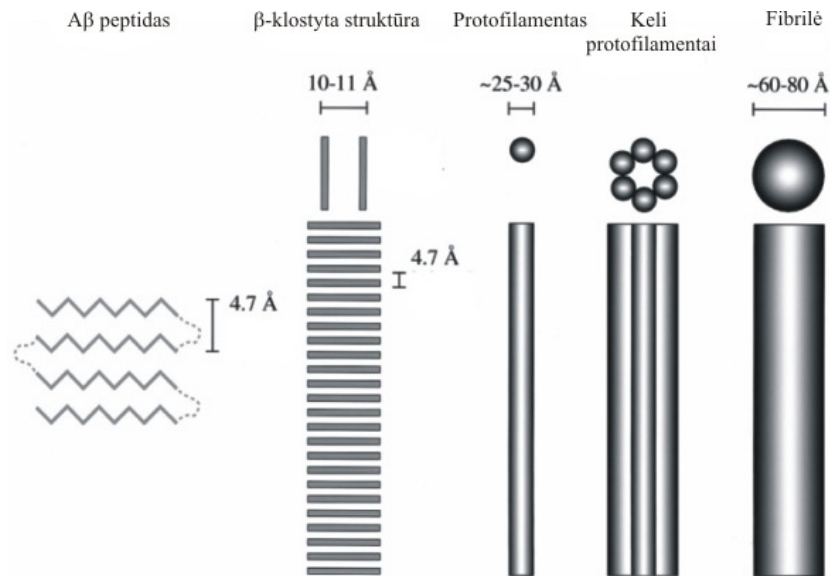
1.3. FIBRILIŲ SUSIDARYMAS *IN VITRO* IR *IN VIVO*.

Amiloidinės fibrilės yra siūliniai agregatai. Jie susidaro spontaniškai agreguojant įvairiems baltymams (Paravastu ir kt., 2008). Formuoti amiloidines struktūras su vidumolekulinėmis β klostėmis yra įgimta polipeptidinės grandinės savybė. Esant tinkamoms sąlygoms, visi baltymai turi potencialą formuoti tokias struktūras (Calamai ir kt., 2005). Tirpūs amiloidų agregatų pirmtakai gali būti arba globuliniai baltymai, arba jų fragmentai, arba natyviai nesusisukę polipeptidai. Globuliniai baltymai paprastai turi būti destabilizuojami mutacijomis, karščiu, aukštu slėgiu, žemu pH arba organiniais denatūratais (Calamai ir kt., 2005). Aplinka, kurioje baltymai bei peptidai susirenka į amiloidines fibriles, lemia fibrilių makromolekulinius morfologijos pokyčius, kai susiformuoja skirtingi susisukimo variantai ar protofilamentų skaičius, ar agregatų formos (Stromer ir Serpell, 2005).

Kol kas yra mažai žinoma apie savitvarkių sistemų procesų dinamiką. Baltymas bandydamas teisingai susisukti, išmėgina visas galimas konformacijas. Levintalis pasiūlė (Levintalio paradoksas), kad baltymai neatlieka atsitiktinės konformacijų paieškos, o susisuka formuodami daugybę tarpinių meta-stabilių būsenų. Nuo baltymo priklauso kiek laiko užtruks susisukimas (Honig, 1999).

Amiloidinės fibrilės, sudarančios AL plokšteles, yra labai stabilios ir netirpios. Šie agregatai yra sudaryti iš nesusisukusių ar neteisingai susisukusių baltymų, sujungtų nekovalentinėmis sąveikomis. Tokie agregatai nėra stabilūs ir turėtų disocijuoti, kol galiausiai nusistovėtų dinaminė pusiausvyra. Tačiau grįžtamumas neįmanomas dėl labai susipynusios fibrilių struktūros. Kai kuriais atvejais, priklausomai nuo agregacijos sąlygų, grįžtamumas vis tik yra įmanomas (O’Nuallain ir kt., 2005).

Eksperimentiniai duomenys rodo, jog savitvarka yra daugiapakopis procesas. Jis vyksta susidarant skirtingoms tarpinėms struktūroms (1.9 pav.) (Serpell, 2000; Zhang ir kt., 2002).



1.9 pav. Aβ peptidų fibrilių susirinkimo hierarchinė schema (Serpell, 2000).

Amiloidų formavimasis susideda iš kelių etapų: pradinės agregacijos, nukleacijos ir elongacijos. Pirmame etape agreguoja natyvos ar dalinai išsivyniojusios monomerinės ir oligomerinės baltymo ar peptido formos. Ir tai yra termodinamiškai nepalankus procesas. Kitame etape agreguotos baltymų ir peptidų formos susijungia nekovalentiniais ryšiais ir suformuoja branduolį. Kai formuojamas branduolys pasiekia kritinį dydį, prasideda fibrilės formavimasis. Tokios susiformavusios fibrilės pasižymi didesniu termodinaminiu stabilumu nei destabilizuotas natyvus baltymas. Trečiame etape monomerinės baltymo ar peptido formos jungiasi prie fibrilės galų (Harrison ir kt., 2007).

Amiloidų polimorfizmas yra labai susijęs ir su Aβ fibrilių formavimo mechanizmu, kai *in vitro* vyksta nuo nukleacijos priklausoma polimerizacija. Kaip greitai vyks polimerizacija priklauso nuo susiformavusių oligomerų dydžio. Branduolio formavimasis vyksta labai trumpą laiką, tačiau formavimosi greitis skiriasi netgi homogeniškuose vandeniniuose tirpaluose ir yra jautrus daugeliui sąlygų (pH, joninei jėgai, temperatūrai, agitacijai). Jei susiformuoja skirtingos branduolio struktūros, po polimerizacijos skirsis ir

susiformavusių fibrilių molekulinė struktūra. Be to, nukleacija *in vivo* gali būti inicijuojama, sąveikaujant su fosfolipidinėmis membranomis (Nichols ir kt., 2005). Taigi, hidrofobinė sąveika nukleacijos etape yra esminė (Lin ir kt., 2008).

Atlikti tyrimai rodo, kad agregacijos (nukleacijos) fazės metu susidarę oligomerai yra netvarkingų spiralinių ir tarpmolekulinių nefibrilinių β -struktūrų mišinys. Oligomerų skaičius ir nefibrilinių β -struktūrų kiekis auga per visą nukleacijos fazę, o elongacijos fazėje šios nefibrilinės struktūros yra transformuojamos į fibrilines β -struktūras, kurios susiformuoja prisijungus didesnės molekulinės masės tarpiniams junginiams (Benseny-Cases ir kt., 2007). $A\beta$ fibrilogenezės tyrimai *in vitro* parodė, kad perėjimas iš spiralinės struktūros į β -klosčių struktūrą yra vienas iš esminių veiksmų susirenkant fibrilėms (Fezoui ir Teplow, 2002).

Pastebėta, kad amiloidogeninių baltymų fibrilių formavimąsi galima pagreitinoti į reakcijos mišinį pridėjus susiformavusių fibrilių – šis reiškinys vadinamas užsėjimu (angl., seeding) (Krebs ir kt., 2007). Pavyzdžiui, vištos lizocimo fibrilių formavimosi efektyvumas priklauso nuo užsėjamų baltymų sekos panašumo (Krebs ir kt., 2007). α -Syn fibrilių formavimasis buvo pagreitinamas, jei buvo pridedama *E. coli* šaperonino GroES, vištos lizocimo, ar jaučio insulino suformuotų fibrilių (Yagi ir kt., 2005). Kadangi pagrindinė polipeptidinės grandinės struktūra yra tokia pat visuose baltymuose, šerdinė dalis, sudaranti β -klostę, bus panaši. Šoniniai radikalai taip pat turi įtakos amiloidinių struktūrų bei specialių struktūros detalių formavimuisi (Krebs ir kt., 2007).

α -Syn fibrilizacija *in vitro* yra pagreitinama, esant didelėms skirtingų polimerų (baltymų, polisacharidų ir polietilenglikolio) koncentracijoms, o fibrilizacijos greitis priklauso nuo polimero prigimties ir ilgio, tačiau didžiausias efektas stebimas didinant polimero koncentraciją (Uversky ir kt., 2002).

Baltymo ar peptido koncentracija taip pat lemia fibrilizacijos pobūdį ir greitį. Priklausomai nuo koncentracijos, galimi skirtingi A β peptidų agregacijos keliai. Gali formuotis β struktūros (tvarkingai išsidėsčiusių A β 40 peptidų, kurie gali būti protofibrilių pirmtakais) arba nestruktūrizuoti agregatai (neturintys reguliarios antrinės struktūros) (Huang ir kt., 2000). Koks kelias bus pasirinktas, priklauso nuo baltymo koncentracijos ir nuo fibrilizacijos trukmės (Huang ir kt., 2000).

Kol kas tiksliai nežinoma, kaip formuojasi fibrilės. Manoma, kad prie augančios fibrilės galo prisijungiant monomerinei baltymo ar peptido formai fibrilė pertvarko struktūrą, kad galėtų prisijungti kitas monomeras (Harisson ir kt., 2007). Yra pasiūlyta keletas hipotetinių amiloidinių fibrilių formavimosi mechanizmų. Polinis užtrauktuko modelis, kuriame β klostes stabilizuoja vandenilinių ryšių tinklas, įtraukiami poliniai aminorūgščių radikalai (glutaminą ir asparaginą). Tokie glutaminu ir asparaginu turtingi regionai dažnai aptinkami žinduolių ir mielių prionų N gale bei kituose amiloidines fibriles formuojančiuose polipeptiduose (Ohnishi ir Takano, 2004). Kitas siūlomas modelis yra domenų apsikeitimo modelis. Pagal jį, dvi ar daugiau baltymų molekulių formuoja chimera ar oligomera, pasikeisdamos vienu ar daugiau struktūrinių domenų. Toks modelis nustatytas priono baltymo PrP^c ir žmogaus cistatino fibrilių susidaryme, tačiau maži peptidai domenais keistis negali (Ohnishi ir Takano, 2004).

Vandenyje tirpių baltymų agregacija *in vitro* gali būti stebima esant įvairioms sąlygoms: švelnioms denatūruojančioms sąlygoms (kai baltymai yra dalinai išlankstomi), inkubuojant aukštoje temperatūroje, esant santykinai didelei baltymo koncentracijai, esant didelei druskų koncentracijai, pakeičiant pH į artimą izoelektriniam taškui, kai terpėje organinio tirpiklio, sudarant vandens-oro ar vandens-lipidų sąveikas, kai terpėje sunkiųjų metalų arba esant nejoniniam polimerui (Ohnishi ir Takano, 2004). Nedideli baltymų fibrilinimo mėginių paruošimo skirtumai taip pat lemia skirtingą fibrilių susirinkimą (Olofsson ir kt., 2007).

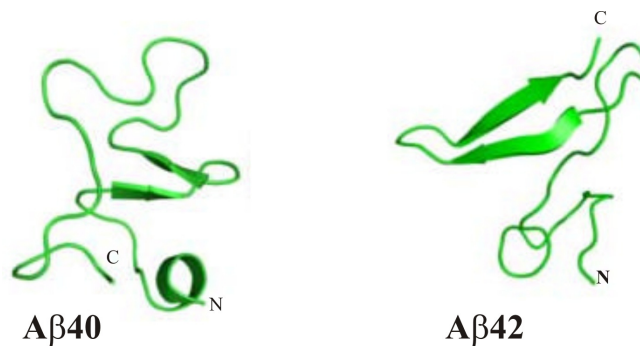
Taip pat buvo nustatyta, kad kai kurios pre- ir po-modifikacijos sukelia α -Syn agregaciją. Pavyzdžiui, Ser129 fosforilinimas α -Syn turėjo teigiamos įtakos agregacijai ir tokia modifikacija aptinkama PL pataloginiuose mėginiuose (Iwatsubo, 2003; Beyer, 2006).

Baltymų agregacijai yra svarbūs keli veiksniai: baltymo aminorūgščių sąstatas ir jų seka, krūvis, koncentracija, poliariškumas, aromatiškumas ir polinkis į β -klostes, pH, temperatūra, joninė jėga, hidrostatinis slėgis, metalų prisijungimas, sąveikos su membrana (Klement ir kt., 2007).

1.3.1. Aminorūgščių sekos ir sąstato įtaka fibrilių susidarymui

Įvairūs mutagenzės tyrimai atskleidė, kad yra tam tikros baltymų sekos, kurios yra labiau linkusios formuoti β -klosčių struktūras. Amiloidinių fibrilių atveju, β lakštai yra dominuojantis antrinės struktūros elementas, o α spiraliniai segmentai kol kas nebuvo aptikti amiloidinių fibrilių šerdinėje struktūroje (Petkova ir kt., 2006).

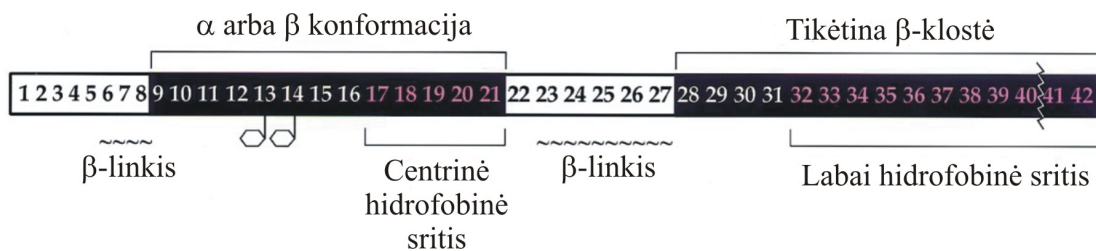
Nors formuoti β -klostines struktūras yra visų baltymų savybė, tačiau BMR tyrimai parodė, kad A β peptidai turi struktūrizuotus regionus. Buvo nustatyta, kad A β 42 C galas yra labiau struktūrizuotas negu A β 40 (Sgourakis ir kt., 2007). β smeigtuko susiformavimas A β 40 sekoje apima trumpas 31-**IIGLMVGGVVIA**-42 peptido sritis 31–34 ir 38–41, tai sumažina C galo lankstumą, todėl A β 42 peptidas yra labiau linkęs formuoti fibriles nei A β 40. Be to, A β 40 turi unikalias struktūras: trumpą 3_{10} spiralę N gale, γ -smeigtuko struktūrą, sudarytą iš peptido 12–18 aminorūgščių srities, bei lankstų C galą (25–40 ar.), kuri iš dalies stabilizuoja β -sūkliai (1.10 pav.) (Sgourakis ir kt., 2007).



1.10 pav. Galimos Aβ40 ir Aβ42 peptidų konformacijos vandenyje. Aβ40 N gale yra trumpas spiralinis srities regionas. Aβ42 gali sudaryti daugiau konformacijų, tačiau visoms būdinga tai, kad C galas yra “užrakintas” su β-smeigtuko struktūra arba išsiplėtusia kilpa (pagal Sgourakis ir kt., 2007).

Taip pat nustatyta, kad Aβ40 peptide N galinės aminorūgščių liekanos, ypač Phe4 ir Arg5, yra dalinai apsaugotos. Tai patvirtina, kad šiame regione susidaro papildoma antrinė struktūra, kuri gali formuoti tarpmolekulinius ir vidumolekulinius vandenilinius ryšius (Olofsson ir kt., 2007). Papildomos C galinės aminorūgščių liekanos Ile41 ir Val42 Aβ42 peptiduose lemia antrinės struktūros susidarymą ir galimą metalų jonų prisijungimą (Olofsson ir kt., 2007).

Aβ peptidų β-klostinė struktūra yra susijusi su jų netirpumu ir neurotoksiškumu. Manoma, kad Aβ peptidai pakeičia konformaciją iš α-spiralės į β-klostės struktūrą amiloidogenezės metu, o N galas yra svarbus α-β konformaciniam pokyčiui (1.11 pav.) (Serpell, 2000).



1.11 pav. Hipotetinė, skaičiavimais pagrįsta, schema, rodanti peptido sritis, kurios formuoja atitinkamą antrinę struktūrą. Peptido regionai, labiausiai linkę formuoti β-klostinę struktūrą, pavaizduoti juodame fone (pagal Serpell, 2000).

Labiausiai tikėtina yra tai, kad Aβ40 ir Aβ42 peptidai formuoja lygiagrečias β-klostes su β-posūkiu tarp aminorūgščių Asp23 ir Lys28. Labiausiai lankstūs peptido regionai yra pirmosios 10 aminorūgščių N gale,

kelios aminorūgštys C gale (aminorūgščių 39–42) ir β -posūkio regionas (Petkova ir kt., 2002; Urbanc ir kt., 2004).

β amiloido peptido 17–21 aminorūgščių motyvas Leu-Val-Phe-Phe-Ala yra hidrofobinis regionas ir esminis fibrilizacijai (Serpell, 2000). Be to, nustatyta, kad toks oligopeptidas slopino A β 40 ir A β 42 fibrilizaciją (Balbach ir kt., 2000). Buvo susintetinti trumpesni A β peptidų variantai, kurie taip pat geba formuoti fibriles. β (25–35) amiloidinė fibrilė gali sąveikauti su tirpiaisiais baltymais, dėl to susiformuoja amorfiniai baltymų agregatai. Manoma, kad tokia oligopeptido fibrilė suardo natyvią baltymo konformaciją ir taip sukelia agregaciją. Tai vyksta dėl elektrostatinės sąveikos, panašiai kaip β (25–35) amiloidas sąveikauja su lipidinėmis membranomis (Konno, 2001). Šerdinė hidrofobinė A β peptidų sritis Leu-Val-Phe-Phe-Ala taip pat gali susirinkti į tipines amiloidines fibriles *in vitro*, kurios morfologiškai yra labai panašios į pilno ilgio A β peptidų formuojamas fibriles (Dong ir kt., 2007).

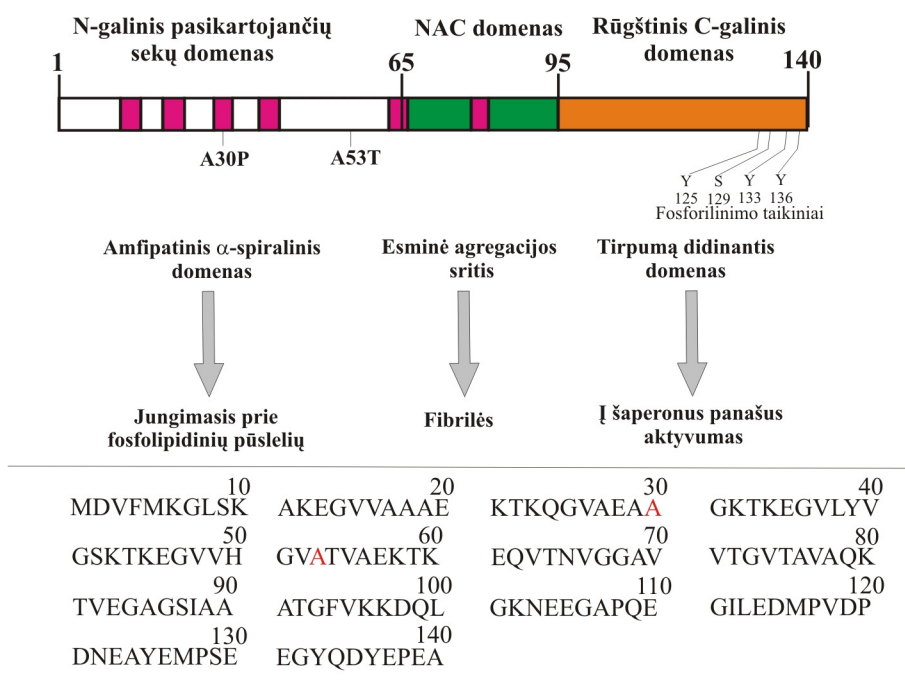
Kritinė aminorūgštis, nuo kurios prasideda A β 42 oligomerizacija yra Ile41, o Ala42 palengvina susirinkimą į β -klostinę struktūrą. Tuo skiriasi pirminė A β 40 ir A β 42 oligomerizacija (Bitan ir kt., 2002). Susidariusi ilgesnė A β 42 peptido forma yra labiau linkusi oligomerizuotis ir formuoti amiloidines fibriles negu gausiau produkuojamas A β 40 (Walsh ir Selkoe, 2007).

Įdomu tai, kad ~ 60% senatvines plokšteles sudarančių A β 42 N gale neturi aminorūgščių (Nakamura ir kt. 2007). Tarp visų trumpesnių N galo peptidų labiausiai vyrauja A β 3–42 forma (Piccini ir kt., 2005).

Eksperimentiniai ir teoriniai duomenys patvirtina hipotezę, kad aromatinių aminorūgščių liekanų išsidėstymas (angl., stacking) gali būti pagrindinis veiksnys, nuo kurio prasideda molekulinis atpažinimas, savitvarka ir pradeda formotis fibrilės. Keičiant aminorūgštis β amiloido sekoje nustatyta, kad didinant hidrofobinių aminorūgščių skaičių ir/arba krūvį polinkis į agregaciją didėja (Kim ir Hecht, 2008).

α -Syn baltymas yra suskirstytas į labiau konservatyvius domenus (1.12 pav.):

- labai konservatyvus su lipidais besijungiantis N galo α -spiralės (1–61 aminorūgščių liekanos) domenas;
- variabilus vidinis hidrofobinis NAC (angl., nonamyloid component) domenas (61–95 aminorūgščių liekanos);
- variabilus C galo domeną, sudarytas beveik vien tik iš neigiamai įkrautų glutamato ir aspartato liekanų.



1.12 pav. Žmogaus α -Syn galimi domenai. Violetine spalva pažymėti netobuli KTKEGV pasikartojimai. Raudonai pažymėtos alanino (A) liekanos nurodo mutacijų taikinius A30P ir A53T (pagal Recchia ir kt., 2004).

35 aminorūgščių NAC domeną yra statybinis α -Syn agregatų blokas (Mandal ir kt., 2006). Nustatyta, kad NAC regione yra devynių aminorūgščių motyvas 66-VGGAVVTGV-74, kuris yra esminis fibrilių formavimuisi (Du ir kt., 2003). Centrinis hidrofobinis α -Syn domeną dar yra žinomas kaip ne A β komponentas AL plokštelėse (angl., NAC-non A β component) (Giasson ir kt., 2001). Šis domeną (66–95 aminorūgščių sritis) sudarytas iš labai amiloidogeninės dalies, kuri atsakinga už α -Syn fibrilizaciją (El-Agnaf ir kt., 2002). α -Syn molekulėje yra 6 netaisyklingi motyvo KTKEGV sekos pasikartojimai, kurių funkcija kol kas nėra žinoma (Mandal ir kt., 2006). Labai konservatyvus N galo domeną (1–65 aminorūgščių sritis) tirpale yra

nestruktūrizuotas, bet esant tam tikroms sąlygoms, gali formuoti spiralinę struktūrą (George, 2002), kuri sudaryta iš dviejų α -spiralių (Chandra ir kt., 2003). Šis domenas jungiasi prie neigiamai įkrautų fosfolipidų ir po prisijungimo tampa spiraliniu, todėl yra manoma, kad šis domenas jungiasi su membrana (Davidson ir kt., 1998; Eliezer ir kt., 2001). Be to, tyrimai rodo, kad lipidinė aplinka skatina ne tik α -Syn baltymo erdvinės struktūros suformavimą, bet ir agregaciją (Lee ir kt., 2002). Buvo parodyta, kad A30P ir A53T mutacijos padidina α -Syn oligomerizacijos greitį (Rochet ir kt., 2000). Esant mažoms baltymo koncentracijoms, šie mutantai, kaip ir laukinio tipo α -Syn, tirpale yra nestruktūrizuoti (Conway ir kt., 1998). Rūgštinis karboksilinio galo domenai (96–140 aminorūgščių sritis) neturi struktūrinių elementų, bet yra stipriai neigiamai įkrautas, nes sudarytas iš rūgštinių aminorūgščių (George, 2000). Šis α -Syn C galas nuo kitų dviejų domenų skiriasi savo variabilumu tarp rūšių (Lavedan, 1998). Be to, nustatyta, kad šiam domeniui būdingas aktyvumas panašus į šaperonų (Kim ir kt., 2002; Park ir kt., 2002). Taip pat buvo parodyta, kad tam tikrais poliaminiais prailgintas α -Syn C galas paspartina agregaciją (Hoyer ir kt., 2004). Esant mažoms baltymo koncentracijoms, natyvus α -Syn ir jo mutuotos (A53T ir A30P) formos neformuoja pastebimų antrinių struktūrų vandeniniame tirpale, tačiau esant didelėms koncentracijoms, α -Syn agreguoja ir formuoja amiloidines fibriles (Wood ir kt., 1999).

Galiausiai, α -Syn NAC regiono sekos analizė parodė, kad yra tam tikra seka, būdinga visiems amiloidus formuojantiems baltymams. Ji yra esminė agregacijai. Keturių aminorūgščių motyvas Gly–Ala–X–X, kuriame X yra bet kokia aminorūgštis su alifatiniais šoniniais radikalais, yra būdingas A β , priono baltymui, α -Syn ir amiloido polipeptidui (IAPP, angl., Islet amyloid polypeptide) (Uversky ir Fink, 2002). Yra žinoma, kad kiekvienam baltymui ar peptidui būdinga skirtinga kritinė koncentracija, nuo kurios prasideda nukleacija.

1.3.2 Įvairių fizikocheminių veiksnių įtaka amiloidinių fibrilių formavimui

Amiloidinių fibrilių ir kitų baltymų agregatų formavimasis labai priklauso nuo įvairių fizikocheminių veiksnių: pH, temperatūros, joninės jėgos, hidrostatinio slėgio, metalų prisijungimo ir pan. (Klement ir kt., 2007).

Amiloidinės fibrilės susiformuoja, kai baltymas destabilizuojamas, pavyzdžiui, sumažinus terpės pH. Yra žinoma, kad dauguma baltymų yra mažiausiai tirpūs kai pH yra artimas baltymo izoelektriniam taškui (pI). Tiriant pI įtaką amiloidų formavimui, nustatyta, kad fibrilės lengviausiai formuojasi esant minimaliam baltymo tirpumui (Schmittschmitt ir Scholtz, 2003). Tiriant jaučio fosfatidilinozitol-3'-kinazės (PI3-SH3) SH3 domeno α -subvieneto amiloidinių fibrilių formavimąsi nustatyta, kad fibrilinių struktūrų morfologija kito priklausomai nuo baltymo tirpalo pH. Manoma, kad pasikeitęs pH tirpale sutrikdo elektrostatinės sąveikas, kurios stabilizuoja kontaktus tarp protofilamentų, formuojančių fibriles (Zurdo ir kt., 2001). Skirtingi agregacijos mechanizmai buvo stebimi, esant mažai ir didelei joninei jėgoms. Esant mažai joninei jėgai, elektrostatinė stūma tarp A β monomerų padidėja ir polimerizacija vyksta tik iš abiejų fibrilės galų, tada susidaro ilgos ir plonos fibrilės. Esant didelei joninei jėgai, ryšiai tarp fibrilių susidaro ne tik prie abiejų galų, bet ir tarp dviejų ašies pusių. Tai yra dėl to, kad joninės sąveikos paslepia elektrostatinę stūmą. Dėl to susidaro trumpos ir storos fibrilės (Lin ir kt., 2008).

Tiriant beta(2)-mikroglobulino (beta(2)m) agregaciją į amiloidines fibriles, nustatyta, kad rekombinantinio monomerinio beta(2)m fibrilogenezė labai priklauso nuo pH ir nuo joninės jėgos. Geriausiai fibrilės formuojasi esant žemam pH ir didelei joninei jėgai (McParland ir kt., 2000). Fibrilinant A β 40 skirtinguose pH, buvo gautos skirtingos morfologijos fibrilės (Wood ir kt., 1996; Stromer ir Serpell, 2005). Fibrilių susidarymas dažniausiai yra spontaninis reiškinys. Susidaro nekovalentiniai ryšiai, tokie kaip vandeniliniai ryšiai, hidrofobinės ar Van der Valso sąveikos. Nors kiekviena iš šių sąveikų

atskirai yra gana silpnos, jų suma lemia labai stabilų struktūrų susidarymą (Zhang ir kt., 2002).

Agreguojant A β 40 peptidas formuoja β -klostinę antrinę struktūrą ir šie konformaciniai pokyčiai vyksta žymiai greičiau, kai padidinama temperatūra ir joninė jėga (Lin ir kt., 2008).

Buvo parodyta, kad daugelis druskų stipriai įtakoja agregacijos procesus. Didžiausias efektas buvo stebimas su katijonais, pvz.: MgCl₂. Manoma, kad A β 40 agregacija priklauso nuo tiesioginės sąveikos tarp jonų ir A β 40 peptido, bei koreliuoja su jonų indukuotais pokyčiais. Druskos taip pat turi didelę įtaką fibrilių struktūrai. Esant įvairioms druskoms, fibrilės yra mažesnio skersmens, siauresni atstumai tarp persisukimų/susiaurėjimų, tačiau, priklausomai nuo naudojamos druskos prigimties ir koks baltymas yra fibrilinamas, buvo stebimas skirtingas efektas fibrilių susidarymui (1.13 pav.) (Klement ir kt., 2007).

	Didelė įtaka \longrightarrow Maža įtaka
Chlorido katijonai	Mg ²⁺ > Li ⁺ > Na ⁺ > K ⁺
Natrio anijonai	SO ₄ ²⁻ > I ⁻ > Cl ⁻ > NO ₃ ⁻ \approx ClO ₄ ⁻

1.13 pav. Katijonų ir anijonų įtaka fibrilių susidarymui (pagal Klement ir kt., 2007).

β -klostinė struktūra yra stabilizuojama vidumolekulinėmis hidrofobinėmis sąveikomis ir tai yra pagrindinis veiksnys nukleacijos procese.

Kai A β 40 buvo fibrilinama, esant 600 μ M peptido koncentracijai, buvo stebimos naujos struktūros – 20–200 μ m skersmens sferos, dar vadinamos β amy kamuoliukais (angl., β amy balls). Įdomu tai, kad A β 42 tokiomis pačiomis sąlygomis panašių sferų neformuoja, o į A β 40 mišinį pridėjus A β 42, β amy kamuoliukų formavimasis buvo slopinamas (Westlind-Danielsson ir Arnerup, 2001). Minimali α -Syn koncentracija, kad prasidėtų fibrilių formavimasis, yra ~15 μ M (van Raaij ir kt., 2008).

Kai kurie metalai (geležis (Fe^{3+}), varis (Cu^{2+}) ar cinkas (Zn^{2+})) jungiasi prie peptido N galo ir pagreitina A β peptidų agregaciją *in vitro* (Atamna ir Frey, 2004, Olofsson ir kt., 2007, Dong ir kt., 2007). Be to, AL ligonių smegenyse stebimos nenormalios aliuminio, geležies, cinko ir vario koncentracijos (Silvestri ir Camaschella, 2008). Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} ir Zn^{2+} taip pat pagreitina α -Syn agregaciją (Uversky ir kt., 2001, Rasia ir kt., 2005), kai su metalais jungiasi centrinis α -Syn domenas NAC, o susidariusios fibrilės yra trumpesnės nei įprastai (Khan ir kt., 2005).

Cu^{2+} susirišimo vietos A β peptide yra His 6, His13, His 14 (Nakamura ir kt., 2007). Cu^{2+} jonų koncentracija yra padidėjusi AL pacientų smegenų senatvinėse plokštelėse (Raffa ir kt., 2005). A β 42 varį prijungia didesniu afiniškumu negu A β 40. Be to, His13 aminorūgštis variui nėra esminė. Pakeitus šią aminorūgštį, A β peptidai ir toliau jungėsi su vario jonais (Clippingdale ir kt., 2001). Nors Cu(II)-A β kompleksas yra labiau toksiškas neuronų kultūrai negu A β atskirai, pavieniai vario jonai yra dar labiau toksiški, negu kai jis yra komplekse su A β . Be to, A β gali apsaugoti mažo tankio lipoproteinus nuo vario indukuojamos lipidų peroksidacijos, o geležimi indukuojama ląstelių žūtis irgi gali būti sumažinama su A β 42. Manoma, kad specifinė A β 42 sąveika su oksidaciniu būdu pažeistomis membranomis, lemia A β 42 fibrilių formavimąsi, tuo pačiu ir neurotoksiškumą (Nakamura ir kt., 2007).

Zn^{2+} jonai taip pat paspartina fibrilių susirinkimą, sudarydami koordinacinius ryšius su dviejų skirtingų peptidų histidino šoniniais imidazolo radikalais (Dong ir kt., 2007). Zn^{2+} gali savitai kontroliuoti savitvarkos greitį ir labai pakeisti amiloidų morfologiją skirtingose aplinkose. Yra daugybė eksperimentų, kurie rodo, kad cinkas taip pat skatina A β amiloidų formavimąsi *in vitro* pridėjus fiziologines cinko koncentracijas (Lovell ir kt., 1998, Huang ir kt., 1997). Tokia stipri A β agregacijos moduliacija cinku, gali būti paaiškinama atskiru cinko jungimosi domenu A β struktūroje.

Trivalentė ir divalentė geležis taip pat sukelia A β agregaciją *in vitro*, kai koncentracija buvo 1 mM ir baltymo koncentracija 1⁻¹⁰ M, kuri yra panaši į esančią *in vivo* (Clippingdale ir kt., 2001). Manoma, kad geležis gali tiesiogiai daryti įtaką A β gamybai per furino moduliaciją. Pastarasis dalyvauja reguliuojant α -sekretazės aktyvumą (Silvestri ir Camaschella, 2008).

Atlikta daugybė tyrimų, kurie rodo, kad vario, geležies ir cinko jonai gali būti neuroninių ląstelių oksidacinio pažeidimo priežastis, nes A β peptidų sąveika su metalais reguliuoja peptidų neurotoksiškumą (Silvestri ir Camaschella, 2008).

Aliuminis taip pat yra randamas AL plokštelėse. Be to, šis metalas buvo pirmasis nustatytas metalas, kuris yra susijęs su AL patologine (Clippingdale ir kt., 2001).

Skirtingas metalo jonų prisijungimas lemia skirtingą savitvarkių struktūrų morfologiją, nuo tipinių amiloidinių fibrilių, susisukusių kaspinių iki nanovamzdelių (Dong ir kt., 2007).

1.3.3. Oligomerų formavimasis ir toksiškumas

Oligomerinės amiloidines fibriles formuojančių baltymų formos yra labai svarbios formuojantis fibrilėms. Tai, kad smegenų skystyje bei amiloidinių plokštelių ekstraktuose randami NDS stabilūs dimerai ir trimerai, rodo, kad mažos molekulinės masės A β oligomerai yra esminiai statybiniai netirpių amiloidų blokai (Walsh ir Selkoe, 2007).

A β fibrilinimo tyrimai *in vitro* parodė, kad susiformuoja kelių tipų oligomerai:

- A β 40 oligomerai (nuo dimerų iki heksamėru);
- oligomeriniai A β ligandai (ADDL's, angl., A β derived diffusible ligands) ir A β 42 oligomerai, kurių molekulinė masė siekia nuo 17 iki 42 kDa (nuo tetramerų iki dekamėru);
- protofibrilės (siauros, lanksčios fibrilių tarpinės struktūros) (Bitan ir kt., 2001).

A β peptidai yra aptinkami visų sveikų žmonių smegenyse ir smegenų skystyje (Walsh ir kt., 2000). Ilgą laiką buvo manoma, kad neuronų pažeidimai atsiranda dėl susiformavusių fibrilių, tačiau naujausi tyrimai rodo, kad būtent tirpūs A β oligomerai yra neurotoksiški (Walsh ir Selkoe, 2007). Protofibrilės ir mažos molekulinės masės A β rūšys yra taip pat neurologiškai aktyvūs (Nishida ir kt., 2007).

Siūlomas A β toksiškumo mechanizmas: A β peptidai sąveikauja su ląstelės paviršiaus receptoriais, tokiais kaip tachikinino receptoriai, pakeičia ląstelės jonų koncentraciją, aktyvuoja oksidacinius kelius ir tokiu būdu padidina oksidacinį stresą ląstelėje. Manoma, kad A β ląstelės plazminėje membranoje formuoja Ca²⁺ jonams pralaidžius kanalus. Pasikeitęs Ca²⁺ jonų lygis ląstelėje suardo normalią ląstelės kalcio homeostazę ir tai, galbūt, yra pagrindinis veiksnys lemiantis A β toksiškumą (Lin ir kt., 2001). Be to, buvo nustatyta, kad A β 42 dimerai sąveikauja su mitochondrijos galine oksidaze. Tai sukelia mitochondrijų disfunkciją, nes gaminasi deguonies radikalai (Nakamura ir kt., 2007). Rekombinantiniai ir sintetiniai A β 40 ir A β 42 peptidai pasižymi panašiu toksiškumu neuronų kultūrai (Walsh ir kt., 2008).

1.3.4. Fibrilių susidarymo slopikliai

Kaip buvo minėta anksčiau, amiloidų formavimas yra susijęs su daugeliu neurodegeneratyvinių ligų, todėl daugybė tyrimų yra nukreipta į amiloidų susidarymą slopinančių medžiagų paiešką. Tokie junginiai yra potencialūs vaistai.

Jungdamasis su monomerine A β forma, hemas gali slopinti A β 40 ir A β 42 agregaciją *in vivo*, o susidaręs kompleksas gali egzistuoti, pvz., liposominėse-endocitinėse pūslelėse, ląstelės membranoje, mitochondrijose, citozolyje. Be to, A β -hemo kompleksas veikia kaip peroksidazė (Atamna ir Boyle, 2006). Su hemu gali jungtis trys histidino liekanos A β 42 sekoje. Hemas gali jungtis kovalentiškai prie baltymo, kuris sekoje turi histidino/metionino porą arba bis-histidinus – kaip globinuose ir citochromuose (Hernandez ir kt., 2004). *In vitro* hemas taip pat slopina A β 40 ir A β 42 peptidų agregaciją, tokiu

būdu neuroninės ląstelės apsaugomos nuo A β toksiškumo (Howlett ir kt., 1997). Be to, galimas hemo reguliacinis motyvas buvo nustatytas ir β APP (A β pirmtako baltymo) C galinėje sekoje (Atamna ir Frey, 2004). Prisijungęs prie A β sekoje esančių histidinių, hemas neleidžia prisijungti cinko, vario, ar geležies jonams ir taip apsaugo nuo agregacijos (Howlett ir kt., 1997). Manoma, kad laisvo hemo koncentracija ląstelės viduje yra pakankamai didelė ir gali laisvai konkuruoti su laisvais šių metalų jonais. Po to, kai hemas susijungia su monomerine A β forma, keičiasi peptido konformacija ir hidrofobiškumas, o trys His liekanos yra paslepiamos (Atamna ir Frey, 2004). Vėliau ląstelės proteazės arba hemo oksigenazė (HO), kuri degraduoja hemo dalį, inaktyvuoja hemo–A β kompleksą (Atamna ir Frey, 2004). Nustatyta, kad hemo metabolizmas AL ligonių smegenyse yra pakitęs: jose padaugėja HO ir bilirubino, kuris yra hemo degradacijos produktas (Dore ir kt., 2002; Atamna ir Frey, 2004).

Kai kurie natūralūs polifenoliai, ypač kurkuminas, resveratrolis, žaliosios arbatos katechinai, yra potencialios medžiagos, kurias būtų galima taikyti AL terapijoje (Kim ir kt., 2006). Resveratrolis (3,4,5-trihidroksi-*trans*-stilbenas) atrankiai susijungia su tirpiomis A β 42 oligomerinėmis formomis, fibriliniiais tarpiniais dariniais ir amiloidinėmis fibrilėmis ir sudaro didelės molekulinės masės nestruktūrizuotas agreguotas formas, kurios jau nebėra toksiškos. Su monomerine A β 42 forma sąveikaudamas resveratrolis neleidžia jai agreguoti (Ladiwala ir kt., 2010). Kliokinolis (clioquinol) taip pat gali slopinti A β agregaciją *in vitro* ir *in vivo* (Bush ir kt., 2003). Tokios molekulės kaip tanino, rozmarino ir ferulo rūgštys, kurkuminas ir tetraciklinas (priklausomai nuo kiekio) slopina α -Syn fibrilių formavimąsi. Šios medžiagos taip pat destabilizuoja jau susidariusias α -Syn fibriles (Beyer, 2006). Paskutiniu metu didelis dėmesys skiriamas ir nikotinui, kuris slopina α -Syn fibrilių formavimąsi (Buckingham ir kt., 2009; Hong ir kt., 2009; Shimohama, 2009).

Įvairios smegenų skystyje esančios molekulės, tokios kaip apolipoproteinai E ir J, serumo amiloido P komponentas (SAP), transtiretinai (TTR), α 1-antichimotripsinas (ACT) ir α 2-makroglobulinas (α 2M) slopina A β formavimąsi *in vitro* (Ono ir kt., 2005). Be to, nustatyta, kad natūraliai susiformavę žmogaus antikūnai prieš A β blokuoja A β formavimąsi ir apsaugo nuo A β indukuojamo neurotoksiškumo *in vitro* (Dodel ir kt., 2003).

Yra ir A β degraduojantys fermentai, tokie kaip insuliną degraduojantis baltymas (IDE) ir neprilizinas (NEP). IDE yra ~110 kDa metalo joną prisijungusi endopeptidazė, kuri degraduoja mažus peptidus, tokius kaip insulinas ir A β . NEP yra prie membranos prisitvirtinusi cinko endopeptidazė (Caccamo ir kt., 2005).

1.4. FIBRILIŲ SAVYBĖS

Dėl netirpios ir nekristalinės šių medžiagų prigimties, iš įvairių baltymų ir peptidų susiformavusių amiloidinių fibrilių molekulinės struktūros kol kas nėra iki galo išaiškintos (Olofsson ir kt., 2007). Amiloidai yra labai polimorfiški molekuliniam lygmenyje – vienas polipeptidas gali neteisingai susisukti į daugybę skirtingų konformacijų (Chien ir kt., 2004, Nichols ir kt., 2004). Yra atlikta daugybė fibrilogenozės tyrimų, bet juos sunku interpretuoti dėl skirtingų fibrilinimo sąlygų (Bitan ir kt., 2003). Amiloidinės fibrilės turi keletą panašių savybių. Dažniausiai tai nešakoti, proteazėms atsparūs filamentai, kurių ilgis gali siekti iki 10 mikronų, o skersmuo, priklausomai nuo protofilamentų skaičiaus, kinta nuo 1,5 iki 10 nm (Jimenez ir kt., 2002). Protofilamento dydis priklauso nuo to, kaip susijungia β -klostės, bet nėra susijęs su pirmine baltymo aminorūgščių seka (Chamberlain ir kt., 2000). Kai kurie eksperimentai rodo, kad fibrilių morfologinė įvairovė yra dėl polipeptidinės β -klostinės struktūros formavime nedalyvaujančių grandinės regionų skirtingo susipakavimo (Chamberlain ir kt., 2000). Bendra amiloidinių agregatų morfologija priklauso nuo sąlygų, kokiomis vyko fibrilogenozė. Skirtingos morfologinės ypatybės yra dažnai stebimos netgi fibriles paruošus tuo pačiu būdu (Jimenez ir kt., 2002).

Labiausiai ištirtos yra A β peptidų formuojamos fibrilės. Subrendusios A β fibrilės yra polimorfiškos, kairinio sūkio arba plataus susukto kaspino struktūros (Goldsbury ir kt., 2005). Anksčiau buvo manoma, kad A β 40 ir A β 42 fibrilinas tokio pačiu principu, tačiau paaiškėjo, kad abiejų peptidų oligomerizacija vyksta skirtingais keliais ir formuojasi skirtingos fibrilės (Bitan ir kt., 2003). A β 40 fibrilės su skirtingomis morfologijomis turi bendrą antrinę ir tretinę struktūrą, bet skiriasi bendra simetrija ir ketvirtine struktūra ir ne β -grandinės segmentų konformacija (1.14 pav.) (Paravastu ir kt., 2008).

A β 42 fibrilės yra sudarytos iš tvarkingai lygiagrečiai išsidėsčiusių β -klosčių protofilamentuose. Oligomerizuodamasis peptidas sudaro dvi β -grandines (18–26 ir 31–42 aminorūgščių regionai), kurios sudaro β -klostę, ir nestruktūrizuotą N galą (1–17 aminorūgštys) (van Gestel ir de Leeuw, 2007). A β 40 fibrilės yra sudarytos iš lygiagrečių β -grandinių (12–24 bei 30–40 aminorūgščių regionai), tarp kurių yra sūkis (25–30 aminorūgštys), o pirmosios 10 aminorūgščių yra nestruktūrizuotos (Antzutkin ir kt., 2002; Stromer ir Serpell, 2005).

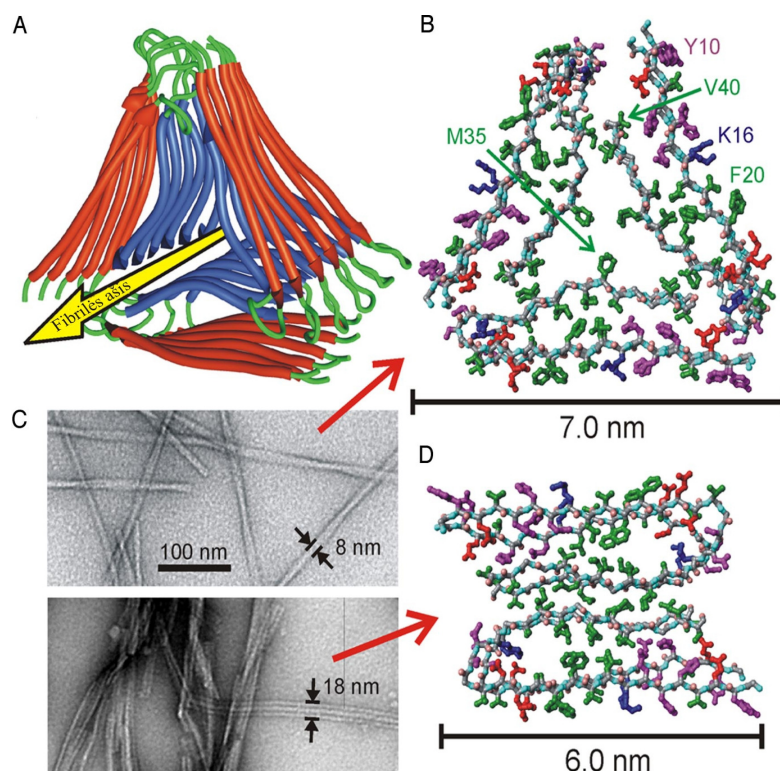
Nors A β 40 ir A β 42 formuoja lygiagrečiai išsidėsčiusias β -klostes, kai kurie baltymai ir peptidai, įskaitant ir kai kuriuos A β fragmentus, sudaro antilygiagrečiai išsidėsčiusias β -klostes (Shivaprasad ir Wetzel, 2006). Pavyzdžiui, 15 aminorūgščių A β 40 peptido fragmentas (A β (11-25)) formuoja antilygiagrečias β -klostes (Stromer ir Serpell, 2005).

A β 40 fibrilėse esančios β -klostės turi tik tarpmolekulinius vandenilinius ryšius, kitų baltymų (HET baltymas iš *Podospora anserina*) β -klostės sudaro tarpmolekulinius ir vidumolekulinius vandenilinius ryšius (Paravastu ir kt., 2008).

AJM (virpančiojo zondo) metodu nustatyta, kad A β 40 fibrilės yra 3,5–7,0 nm aukščio ir 100–500 nm ilgio, lygios filamentinės struktūros, tuo tarpu A β 42 peptido formuojamos fibrilės yra tokio pat aukščio, bet ilgesnės. Jų ilgis gali siekti iki kelių μ m (Olofsson ir kt., 2007). Alzheimerio liga sergančių asmenų smegenų mėginiuose aptinkamos A β netirpios fibrilės, kurių skersmuo

yra 6–10 nm. Sintetinės A β fibrilės yra panašios (Walsh ir Selkoe, 2007). Gel-filtracijos ir elektroninės mikroskopijos metodais nustatyta, kad A β 40 ir A β 42 peptidai formuoja skirtingų tipų sankaupas: didesni agregatai buvo tipinės amiloidinės fibrilės, o mažesni – heterogeniškas struktūrų mišinys nuo sferų (skersmuo ~5 nm) iki lenktų linijinių struktūrų, kurios gali būti iki 200 nm ilgio (Walsh ir Selkoe, 2007).

Atlikus masės/ilgio ir elektroninės krio-mikroskopijos matavimus, nustatyta, kad A β 42 fibrilė turi tik vieną protofilamentą. A β 40 turi du protofilamentus. Detali palyginamoji A β 40 ir A β 42 fibrilių struktūrų analizė atskleidė, kad joms būdinga ašinė 2x simetrija ir panaši protofilamentų struktūra, be to, abiejų peptidų protofilamentai turi po tą patį skaičių A β molekulių (~2,5 peptido) vienam beta struktūros pasikartojimui. Be to skersiniai A β 40 ir A β 42 protofilamentų pjūviai yra vienodi (4x11nm) (Schmidt ir kt., 2009).



1.14 pav. Eksperimentais pagrįsti A β fibrilių struktūros modeliai. Fibrilių, su susuktos virvės morfologija, modelis (A). Skaičiavimais ir eksperimentais pagrįsta triklostė simetrija; atominis modelis (B), vaizdas statmenas fibrilių ašiai. Hidrofobinės aminorūgštys pažymėtos žaliai, polinės – violetine, neigiamai įkrautos – raudonai ir teigiamai – mėlynai. Azoto ir karbonilo

deguonies atomai pavaizduoti žydra ir rausva spalva. Nestruktūrizuoti N galai (1-8 aminorūgštys) į modelį neįtraukti. Susuktos virvės (viršutinis paveikslas) ir dryžuoto kaspino (apatinis paveikslas) fibrilių morfologijų TEM vaizdai (C). Atominis dryžuoto kaspino morfologijos fibrilių modelis (D). Dryžuotų kaspinių morfologijos fibrilės gaunamos, kai pirminis Aβ40 tirpalas buvo kratomas fibrilinimo metu, o susuktos virvės morfologijos fibrilės gaunamos nekratant (pagal Paravastu ir kt., 2008).

In vitro Aβ gali formuoti skirtingus agregatus: amiloidines fibriles (Ban ir kt., 2004), mažus toksiškus oligomeras (Walsh ir kt., 1997; Lambert ir kt., 1998), sferines amiloidų daleles (Westlind- Danielsson ir Arnerup, 2001; Hoshi ir kt., 2003), žiedines poras formuojančias struktūras (Lashuel ir kt., 2002), karoliukų pavidalo protofibriles (Huang ir kt., 2000), sferocilindrines mices (Lomakin ir kt., 1996; Yong ir kt., 2002).

Nustatyta, kad α-Syn ir jo mutantai taip pat formuoja skirtingas fibriles. Priklausomai nuo skirtingo fibrilių paruošimo, stebimos skirtingo ilgio ir aukščio fibrilės. Švelniomis fibrilinimo sąlygomis (HEPES buferyje, pH 7,4) α-Syn formuoja 10,0±1,1 nm fibriles, o periodiškumas yra kas 65 nm. α-Syn E46K mutantas formuoja 9±0,8 nm, o periodiškumas yra kas 55 nm. α-Syn A30P formuoja 8,1±1,2 nm diametro fibriles ir yra įvairaus periodiškumo (van Raaij ir kt., 2006). Fibrilinant laukinio tipo α-Syn, A53T ir A30P (PBS buferyje, pH 7,4), buvo gautos 8–10 nm aukščio ir ~ 10 nm pločio fibrilės. Esant didesnei baltymo koncentracijai (~300 μM), susidarė dviejų susisukusių filamentų struktūros fibrilės, ypač A53T mutanto atveju (Conway ir kt., 2000). Taip pat formavosi ir pavieniai filamentai, kurių aukštis apie 5 nm, bei maži 4 nm aukščio sferiniai dariniai (Conway ir kt., 2000; Hoyer ir kt., 2004).

Kai EL buvo fibrilinamas esant pH 4,5 ir 57 °C temperatūrai, susiformavo 2 nm pločio protofilamentai. Nesant Ca²⁺ jonams protofilamentai yra žiedinės struktūros, kurių skersmuo 40–50 nm. Esant 10 mM CaCl₂, EL protofilamentai yra tiesūs arba lenktos formos. Jie gali susirinkti ir į storesnius siūlus, bet nesudaro žiedinių struktūrų. Kai EL yra fibrilinamas pH 2, 37 °C ir 57 °C, susidaro žiedinės ir tiesios struktūros. Stebimas periodiškumas – kas 35

nm. Kai pH reikšmė 2, žiedinių struktūrų skersmuo yra 70–80 nm (Malisauskas ir kt., 2003).

EL protofilamentai, lyginant su per kelis etapus (brendimas, ilginimas ir storinimas) susidarančiomis žmogaus lizocimo fibrilėmis, lieka vienagrandžiai ir neviršija kelių šimtų nanometrų. Tai siejama su stabilios šerdinės struktūros susidarymu, nepriklausomai nuo amiloidų formavimo sąlygų. Be to, EL, lyginant su kitais c-tipo lizocimais, yra labai nestabilūs ir formuoja trijų būsenų tarpines struktūras (Morozova-Roche, 2007).

Daugelis literatūros šaltinių nurodo, kad susiformavusios fibrilinės struktūros yra gana stabilios ir atsparios proteazėms ir mechaniniams veiksniams (Meersman ir Dobson, 2006; Harrison ir kt., 2007).

Proteazė K gali paploninti α -Syn fibriles nuo ~6,6 iki ~4,7 nm storį, tačiau visiškai fibrilės buvo išardytos su šlapalu (Zhang ir kt., 2008). Taip pat buvo parodyta, kad mechaninė $A\beta$ peptidų disociacija yra labai anizotropinis procesas ir vyksta skirtingomis kryptimis, kai jėga buvo panaudota lygiagrečiai ar statmenai fibrilių ašiai. Be to, buvo parodyta, kad fibrilinės struktūros yra mechaniškai stipresnės nei dauguma baltymų domenų (Raman ir kt., 2007).

Pritaikius didelės raiškos skenuojantį elektroninį mikroskopą, buvo tirtas amiloidų superstruktūrų chiraliskumas. Buvo nustatyta, kad $A\beta_{40}$ ir vištos lizocimas formuoja visada tik kairio sūkio (prieš laikrodžio rodyklę) spiralines struktūras. Skirtingai nuo jų, serumo A amiloido N galo seka (SAA1-12) formuoja dešiniojo sūkio spirales. Amiloidinių fibrilių supramolekulinis chiraliskumas yra apspręstas ne tik sudedamųjų molekulių chiraliskumo, bet ir nuo jų struktūrinės organizacijos (Rubin ir kt., 2008).

Žinios apie vienos fibrilės savybes būtų labai naudingos, norint jomis manipuliuoti kuriant nanostruktūras.

1.5. FIBRILINIŲ STRUKTŪRŲ PANAUDOJIMAS BIOTECHNOLOGIJOJE

Kuriant nanostruktūras, molekulinė savitvarka yra esminis „statyba iš apačios“ metodas. Amiloidinių baltymų ir peptidų fibrilės jau yra savitvarkės

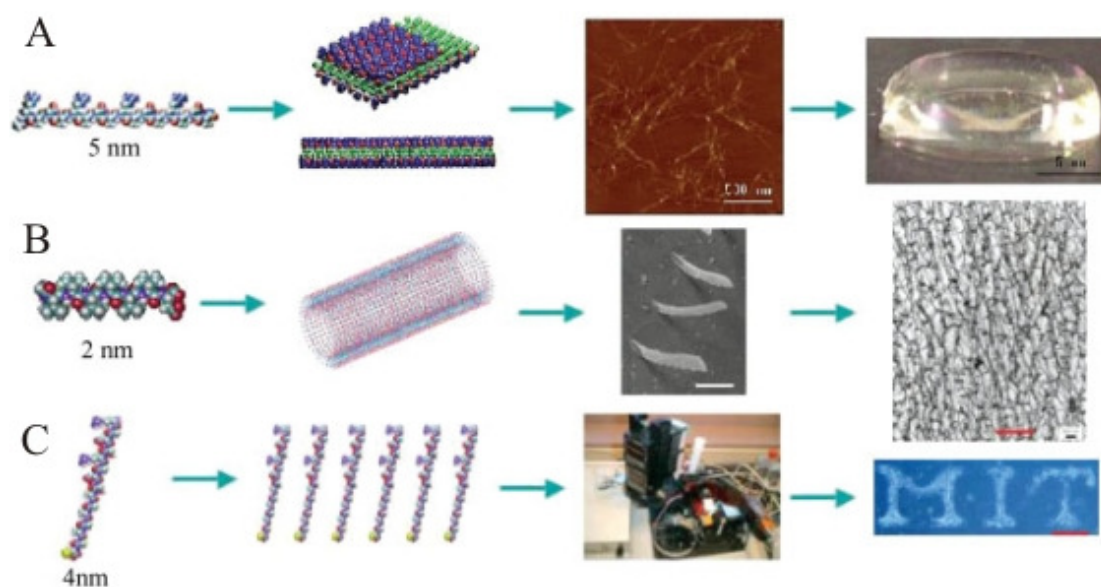
nanosuktūros su unikaliomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis (stabilumas, esant įvairiam pH ir temperatūrai, atsparumas proteolitiniams fermentams) yra patrauklios dėl molekulinio atpažinimo savybių bei biosuderinamumo. Tokia molekulinė baltymų savitvarka į organizuotus darinius leidžia juos panaudoti įvairių nanosuktūrų, kurios bus pritaikytos bioanalitiniuose bei mediciniuose tyrimuose, kūrimui. Žinios apie savitvarkių nanosuktūrų formavimąsi yra pritaikomos kuriant nano-dydžio prietaisus. Amiloidinės fibrilės, sudarytos iš gana paprastų statybinių blokų, gali tarnauti kaip matrica nanolaideliams ir nanokarkaso audinių auginimui (Zhang ir kt., 2002; Reches ir Gazit, 2003; Yemini ir kt., 2005). Nanovamzdeliai gali tarnauti kaip matrica metalizacijai. Kai tik organinis karkasas yra pašalinamas, laidi viela gali būti suformuojama ir imobilizuojama ant paviršiaus (Zhang ir kt., 2002).

Tikslus iš peptidų sudarytų nanosuktūrų išdėstymas yra didžiausias privalumas pritaikant juos nanotechnologijoje, o jų kontroliuojama savitvarka, išdėstymas ir integracija į mikrosistemas yra aktuali problema (Dinca ir kt., 2008).

Sintetiniais ar genų inžinerijos metodais sukurti kelių rūšių peptidai gali formuoti hibridines fibriles. Tokios hibridinės fibrilės gali būti toliau funkcionalizuojamos. Biotinilinti peptidai yra dažnai naudojami tokių hibridinių fibrilių gamybai, kai biotinilinti peptidai įstatomi į fibriles, sudarytas iš nebiotinilintų peptidų. Tokiu būdu fibriles galima funkcionalizuoti streptavidinu (Kodama ir kt., 2004).

Vienas iš peptidų savitvarkos pavyzdžių yra „Lego“ peptidas, kuris formuoja tvarkingai išsidėsčiusius nanopluoštus, kurie naudojami trimatėms (3D) ląstelių kultūroms ir regeneracinėje medicinoje. Šie peptidai vandeniame tirpale formuoja β -lakštines struktūras, turinčias du skirtingus paviršius: vieną hidrofiliinį ir vieną hidrofobinį. Šie „Lego“ peptidai gali spontaniškai susirinkti į taisyklingas nanosuktūras molekuliniam lygmenyje (1.15 pav.). Be to, buvo sukurti paviršinio aktyvumo peptidai, kurie naudojami vaistų, baltymo bei geno pernašoje, o taip pat tirpinant ir stabilizuojant

membraninius baltymus. Tai grupė peptidų, kurie turi hidrofobines uodegėles ir hidrofilies galvutes, dėl kurių jie vandenyje lengvai susirenka į savitvarkes struktūras (30–50 nm skersmens nanovamzdeliai ir nanopūslelės) (Zhao ir Zhang, 2007)



1.15 pav. Medžiagos, gautos iš peptidų savitvarkių struktūrų. Lego peptidai (A), dar vadinami joniniai savikomplimentarūs peptidai sudaryti iš 16 aminonorūgščių. Tokios nanofibrilės sudaro hidrogelį. Surfaktantiniai/detergentiniai peptidai (B), jie gali susirinkti į nanovamzdelius ir nanopūsleles, kurių skersmuo 30–50 nm, tokie vamzdeliai formuoja vidinį tinklą. Rašalo peptidas (C). Toks peptidas turi atskirus tris segmentus. Funkcinis segmentas, kuris sąveikauja su kitais baltymais ir ląstelėmis, lankstus jungiamasis segmentas, ir segmentą – inkarą, kuris kovalentiniu būdu prisijungia prie paviršiaus (Zhao ir Zhang, 2007).

Molekulinis paviršiaus susirinkimas gali būti nukreiptas į medžiagos cheminių bei fizikinių savybių pakeitimą. Paviršiaus padengimai tuoj pat pakeičia medžiagos tekstūrą, spalvą ir suderinamumą su aplinka bei atsaką į aplinką (Zhao ir Zhang, 2007).

Literatūroje minima keletas pavyzdžių, kuriuose streptavidinas yra naudojamas kaip sulietas baltymas. Vienas tokių variantų yra streptavidino ir kristalinio bakterijų ląstelių paviršiaus baltymo S (angl. S-layer) hibridas. Jis formuoja savitvarkį monomolekulinį baltymo tinklą, o susidarę hibridinio baltymo kristalai su streptavidinu galėjo jungtis su biotinu ir biotinilintais

baltymais (Huber ir kt., 2006). Pilkington ir kt. (2009) insulino amiloidines fibriles panaudojo imobilizuojant gliukozės oksidazę (GOD), kuri buvo funkciškai aktyvi.

Su biomolekulėmis konjuguotos nanodalelės yra vis dažniau naudojamos biojutiklių kūrimui. Optinės ir struktūrinės nanodalelių savybės yra pritaikomos kurti metodus, kuriuose detektuojami biocheminiai procesai ir sąveikos (Roy ir Dasgupta, 2007). Tiolinė arba amino funkcinės baltymo grupės jungiasi su metalo nanodalelės paviršiumi, dėl to susiformuoja biokonjugatas. Tačiau, dėl nehomogeniško pasiskirstymo tarp baltymo ir metalo koloido, susidarę konjugatai gali būti didelės agregavusios struktūros (Samanta ir kt., 2006). Nors nanodalelės-baltymo konjugatai yra sintetinami įvairiems pritaikymams, biokonjugacija išlieka didžiuliu iššūkiu, nes baltymas dažnai denatūruoja arba yra prarandama baltymo funkcija (Aubin-Tam ir kt., 2009).

Nanobiotechnologija yra viena iš labai sparčiai besivystančių nanotechnologijos krypčių, kuri yra grindžiama daugiamolekulinių darinių kūrimu ir jų tyrimais. Biomolekulinių darinių savaiminis susirinkimas gali pasižymėti struktūros ir savybių įvairove. Tikslingas pradinių „statybinių blokų“ bei sąlygų parinkimas leidžia sukurti daugiadalelius junginius. Priklausomai nuo individualių savybių, jie gali tikti įvairiausiems prietaisams ir sistemoms, tokiems kaip kvantinių efektų dariniai, „protingos“ membranos, jutikliai, atminties elementai ir t.t. (Gilead ir kt., 2005; Iwahori ir kt., 2005; Burger ir kt., 2006; Cross, 2006; Yap ir kt., 2007). Panaudojant peptidų struktūrinius pokyčius būtų galima valdyti molekulinį darinių savitvarkos procesus ir keisti jų fizines savybes. Dėl to nemažai mokslinių grupių atlieka darbus, kuriuose yra tiriamos savaiminę biomolekulių organizaciją lemiančios sąlygos (Woolfson ir kt., 2006; Zhao ir kt., 2007). Tikslingai susiformuojančios erdvinės struktūros leistų kurti naujos kartos medžiagas.

Literatūrinėje dalyje buvo apžvelgti amiloidines fibriles formuojantys baltymai ir peptidai, jų struktūrinės ir fizikinės savybės. Šios žinios buvo pritaikytos darbe, atliekant fibrilinimo bei kitus eksperimentus. Pasitelkus įvairius biotechnologinius ir biocheminius metodus, bei pritaikius AJM ir TEM buvo analizuojami įvairūs amiloidines fibriles formuojantys baltymai. Pagrindinis darbo tikslas buvo konstruoti amiloidines fibriles formuojančius baltymus ir šių amiloidinių baltymų pagrindu kurti nanostruktūras.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. REAGENTAI

Medžiagos	Šaltinis
Acetonitrilas (ACN)	Riedel-de Haën, Vokietija
Acto rūgštis	Lachema, Čekija
Agarozė	Serva, Vokietija
Amonio acetatas	Sigma, JAV
Ampicilinas	Actavis, Danija
Aukso nanodalelių suspensija	Sigma, JAV
Bakto-triptonas (Trypton bacto)	Ferak, Vokietija
BHI (Brain Heart Infusion)	Oxoid, Didžioji Britanija
CaCl ₂	Penta, Čekijos Respublika
Chloramfenikolas	Serva, Vokietija
Dimetilformamidas (DMF)	Merck, Vokietija
EDTA	Sigma, JAV
Etidžio bromidas	Serva, Vokietija
Etilo alkoholis	Vilniaus degtinė, Lietuva
Glicerolis	Lachner, Čekijos Respublika
Guanidino hidrochloridas	Fluka, Vokietija
Imidazolas	Fluka, Vokietija
Kalio acetatas	Sigma, JAV
Kanamicinas	AppliChem, Vokietija
KCl	Achema, Čekijos Respublika
Mielių ekstraktas	Becton, Dickinson and company, Prancūzija
NA (Nutrient Agar)	Oxoid, Didžioji Britanija
NaCl	Chempur, Lenkija
NaOH	Merck, Vokietija
Natrio dodecilsulfatas (SDS)	Sigma, JAV
NB (Nutrient Broth)	Oxoid, Didžioji Britanija

Pradmenys	Metabion, Vokietija
Restrikcijos ir ligavimo fermentai, IPTG,	UAB Fermentas, Lietuva
PGR reakcijos fermentai	
Šlapalas	Fluka, Vokietija
TioflavinasT	Fluka, Vokietija
Tetrametilbenzidinas (TMB)	Sigma, JAV
Trifluoracto rūgštis (TFA)	Merck, Vokietija
Tris-HCl	Sigma, JAV
β-merkaptioetanolis	Ferak, Vokietija
Filtrai ant švirkštų (Acrodisc Syringe Filters)	Pall Corporation, JAV
Millipore dializės filtrai Type VS ir VSWP 0,025 μm	Millipore, JAV
Hi Trap™ Chelating HP kolonėlė (1 ml ir 5 ml)	Amersham, Pharmacia
Hi trap CM FF kolonėlė	Amersham, Pharmacia
Sepharose SP FF kolonėlės	GE Healthcare
Neutravidinu konjuguotos Au nanodalelės	Nanopartz, JAV

2.2. BAKTERIJOS IR PLAZMIDĖS

Bakterijos	Genotipas, savybės	Šaltinis
<i>Escherichia coli</i> DH5α kamienas	φ80dlacZΔM15 Δ(lacZY- argF)U169 <i>deoR recA1</i> <i>endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>sup</i> <i>E44 thi-1 gyrA96 relA1</i>]	Pharmacia
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm lon</i> (DE3)	Avidis, Prancūzija
Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (R _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Avidis, Prancūzija

pLysSRARE (Cam^R)

Plazmidės	Savybės	Šaltinis
pUC57-SHA, pUC57-SA	Plazmidės, kuriose klonuoti streptavidiną ir Aβ40 bei streptavidiną, hidrofobiną ir Aβ40 koduojantys genai	GenScript Corporation (JAV)
pET3a- <i>trx-aβ40</i> , pET3a- <i>trx-aβ40cys2</i> , pET3a- <i>trx-aβ40cys39</i>	Plazmidės, kuriose klonuoti <i>trx-aβ40</i> , <i>trx-aβ40cys2</i> , <i>trx-aβ40cys39</i>	Dr. Anders Olofsson dovana
pETM-11, pETM-50, pETM-52, pETM-80, pETM-82	Plazmidės–ekspresijos vektoriai	Dr. Gunter Stier dovana
pET28-EL	Plazmidė, kurioje klonuotas kumelės pieno lizocimą koduojantis genas	Dr. Manto Mališausko dovana
pET3a- <i>casp7</i>	Plazmidė, kurioje yra kaspazės7 genas	Dr. Anders Olofsson dovana
pRK172	Plazmidė, kurioje klonuotas α-Syn koduojantis genas	Dr. Ludmilla Morozova-Roche dovana
pASKIBA3-PT15	Plazmidė, kurioje klonuotas GDH iš <i>Acinetobacter sp.</i> koduojantis genas	Meissner ir kt., 2004
pET-11M- <i>ylil</i>	Plazmidė, kurioje klonuotas GDH i, <i>E. coli</i> koduojantis genas	Southall ir kt., 2006
Šio darbo metu sukonstruotos plazmidės		
pET3a- <i>trx-aβ40H6A</i>		Šis darbas
pET3a- <i>trx-aβ40H6S</i>		Šis darbas
pET3a- <i>trx-aβ40H6C</i>		Šis darbas

pET3a- <i>trx-aβ40</i> H13A	Šis darbas
pET3a- <i>trx-aβ40</i> H14A	Šis darbas
pET3a- <i>trx-aβ40</i> H6/13A	Šis darbas
pET3a- <i>trx-aβ40</i> H6/14A	Šis darbas
pET3a- <i>trx-aβ40</i> H6/13/14A	Šis darbas
pET21d- <i>sa-aβ40</i>	Šis darbas
pET21b- <i>sa-hfb-aβ40</i>	Šis darbas
pTabpvu16	Šis darbas
pTabecol	Šis darbas
pET21a- <i>syn</i>	Šis darbas
pET21a- <i>syncys</i>	Šis darbas
pTsyneco	Šis darbas
pETM11-EL	Šis darbas
pYliab9 ir pYliab10	Šis darbas

2.3. TERPĖS

Terpės	Paruošimas
BHI terpė	37g BHI 1l H ₂ O
SOB terpė	20 g/l Bakto-triptono, 5 g/l mielių ekstrakto, 0,6 g/l NaCl, 0,19 g/l KCl, 10 ml/l 1M MgCl ₂ , 10 ml/l 1M MgSO ₄
NA (Nutrient Agar) terpė	28 g NA 1 l H ₂ O
NB (Nutrient Broth) terpė	13 g NB 1 l H ₂ O.
LB (Luria bertonii) terpė	10 g/l Bakto-triptono, 5 g/l mielių ekstrakto, 10 g/l NaCl, pH=7

Visos terpės buvo sterilinamos autoklavuojant 30 min 121 °C temperatūroje. Bakterijos ant agarizuotų terpių buvo auginamos 37 °C termostate, skystoje terpėje –30 °C temperatūroje, aeruojant.

2.4. PLAZMIDINĖS DNR IŠSKYRIMAS

Bakterinės ląstelės buvo auginamos per naktį, NB terpėje 30 °C, aeruojant. Biomasė surenkama centrifuguojant 30 min 4000 g šaldant. Gauta ląstelių masė buvo suspenduojama viename tūryje I-ojo tirpalo (1360 µl H₂O, 100 µl 1 M Tris-OH pH 8.0, 500 µl 40% gliukozės, 40 µl 0,5 M EDTA) ir palaikoma 15–20 min kambario temperatūroje. Po to buvo įpilami 2 tūriai II-ojo tirpalo (0,2 N NaOH, 1% SDS), ir palaikoma 10–15 min kambario temperatūroje. Kai tirpalas nuskaidrėdavo buvo pripilama 1,5 tūrio 7,5 M amonio acetato tirpalo ir laikoma 2 val. ledo vonioje, kol iškrenta nuosėdos. Gautas tirpalas buvo centrifuguojamas (30 min, 5000 g). Į supernatantą buvo pripilami 2 tūriai etilo alkoholio ir paliekama šaltai (–20 °C). Nuosėdoms iškritus tirpalas buvo centrifuguojamas 30 min 5000 g. Nuosėdos buvo išdžiovinamos ir ištirpinamos nedideliame kiekyje vandens ar buferio (Sambrook ir kt., 1989).

2.5. GREITAS PLAZMIDINĖS DNR IŠSKYRIMO METODAS

Plazmidinė DNR buvo skiriama su GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (UAB Fermentas) rinkiniu. Rekombinantinių plazmidžių sekos buvo patikrintos atliekant DNR sekoskaitą Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre.

2.6 POLIMERAZĖS GRANDININĖ REAKCIJA (PGR)

Šiame darbe buvo naudojama rekombinantinė *Taq* DNR polimerazė su atitinkamu buferiu ir priedais (Fermentas) arba 2X PCR Master Mix (Fermentas), arba *Pfu* DNR polimerazė su atitinkamu buferiu ir kitais priedais (Fermentas) prisilaikant gamintojo rekomendacijų. Polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama *Mastercycler personal* ir *Mastercycler epgradient S* PGR aparatais (Eppendorf). Šiame darbe naudotos PGR programa: 94 °C 4 min, 50 °C 1–2 min, 72 °C 1min – 30 ciklų, 72 °C 5 min – 1 ciklas.

2.6.1. Pradmenys

Šiame darbe naudoti pradmenys:

Pradmuo	Seka 5' → 3'
14-15ALAF	CGAAGTTGCGGCGCAGAAACTG
14-15ALAR	CAGTTTCTGCGCCGCAACTTCG
14ALAF	CGAAGTTGCGCACCAGAAACTG
14ALAR	CAGTTTCTGGTGCACCAACTTCG
15ALAF	CGAAGTTCACGCGCAGAAACTG
15ALAR	CAGTTTCTGCGCGTGAACCTTCG
4036F	CACAACGGTTTCCCTCTAGA
4612R	TCCTTTCGGGCTTTGTTAGC
6ALAF	CTGAATTCGTCGCGGACTCC
6ALAR	GGAGTCCGCACGGAATTCAG
6SERF	CTGAATTCGTCGCGGACTCC
6SERR	GGAGTCGCTACGGAATTCAG
EclNcoF	CGCCATGGAGCTCGACGCTGAATTCGTCACG
EclNcoR	GTCGAGCTCCATGGCGTCTACTTCATCAGAAG
M13sqncF	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
M13sqncR	GAGCGGATAACAATTCACACAGG
Syn F	ATAGATATCGATGTATTCATGAAAGGACTTTC
Syn R	TTTCGATATCTTAGCCGGCTTCAGGTTCGTAG
SyncysR	TACTCGAGTTAACAGGCTTCAGGTTCGTAG
SYNF	ATAGATATCGATGTATTCATGAAAGGACTTTC
SYNR	TTTCGATATCTTAGCCGGCTTCAGGTTCGTAG
SnaBR	GCCGGATCCTCTACGTAAACAACACCACCAACCATC
T7pro	TAATACGACTCACTATAGCG
T7ter	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Tyr10TrpF	ACGACTCCGGTTGGGAAGTT
Tyr10TrpR	AACTTCCCAACCGGAGTCGT

2.7. DNR HIDROLIZĖ RESTRIKCIJOS ENDONUKLEAZĖMIS

DNR buvo hidrolizuojama, prisilaikant UAB „Fermentas” pateiktų rekomendacijų. DNR buvo veikiama restrikcijos endonukleazėmis 15 min–2 val. 37 °C temperatūroje.

2.8. DNR ELEKTROFORETINIS FRAKCIONAVIMAS AGAROZĖS GELYJE

DNR elektroforetinis frakcionavimas buvo atliekamas horizontaliame 1,0 % agarozės gelyje TAE buferyje (50 x TAE buferis: 121 g Tris-OH, 18,6 g EDTA, 28,6 ml acto rūgšties, H₂O iki 500 ml). Po elektroforezės gelis buvo dažomas etidžio bromido tirpalu ir analizuojamas ultravioletinėje šviesoje. DNR fragmentų molekulinės masės buvo nustatomos sulyginant jų nueitus kelius su Gene RulerTM DNA ladder Mix žinomų molekulinų masių fragmentų nueitais keliais.

2.9. DNR FRAGMENTŲ IŠ AGAROZĖS GELIO GRYNINIMAS

Tiriama plazmidinė DNR buvo hidrolizuojama reikiamomis restrikcijos endonukleazėmis ir analizuojama elektroforezės metodu. Iš agarozės gelio buvo išpjunami reikiamų dydžių fragmentai ir išskiriami, DNR gryninimo rinkiniu (DNA Extraction Kit), prisilaikant UAB „Fermentas“ pateiktų rekomendacijų.

2.10. DNR LIGAVIMAS

Hidrolizuota DNR buvo susiuvama T4 DNR ligaze su atitinkama restrikcijos endonukleaze hidrolizuotu plazmidiniu vektoriumi, 10 °C temperatūroje 15–17 valandų. Po to, mišinys buvo palaikomas 10 min 65 °C temperatūroje ir atvėsinaamas, o vėliau ligavimo mišiniais transformuojamos *E. coli* DH5α ląstelės.

2.11. ELEKTRO-IMLIŲJŲ LAŠTELIŲ RUOŠIMAS IR ELEKTROPORACIJA

E. coli ląstelės užsėjamos į 5 ml BHI terpės ir auginama per naktį (15–16val.) 30 °C temperatūroje aeruojant. 1 ml naktinės kultūros užsėjamas į 20 ml BHI terpės. Auginama aeruojant 37 °C temperatūroje, kol optinis tankis 600 nm bangoje (OD₆₀₀) pasiekia 0,5–0,8. Tuomet ląstelės atvėsinaamos laikant 15 min ledo vonioje. Paskui centrifuguojama 10 min 4000 g šaldant, supernatantas pašalinamas. Ląstelės du kartus praplaunamos 40 ml šalto

vandens: ląstelės resuspenduojamos, surenkamos centrifuguojant anksčiau minėtomis sąlygomis. Po to, užpilama 10 ml šalto 10 % glicerolio tirpalo ir ląstelės resuspenduojamos. Dar kartą centrifuguojama ir ląstelės suspenduojamos 1 ml šalto 10% glicerolio tirpalo (Sharma ir Schimke, 1996).

Elektroporacijai naudojamos ląstelės ir kiuvetės atšaldomos ledo vonioje. Į 100 µl elektro-imliųjų ląstelių įdedama 1 µl DNR ir inkubuojama kelias minutes lede. Tuomet ląstelių ir DNR suspensija perkeliama į atšaldytą kiuvetę. Ši įdedama į elektroporacijos aparatą, kuriame iš anksto nustatoma 2.0 kV/cm įtampa. Elektros impulso trukmė 4–5 ms. Po elektroporacijos nedelsiant ant ląstelių užpilama 200 µl BHI terpės, suspensija perkeliama į mėgintuvėlį. Ląstelės inkubuojamos 45 min 37 °C temperatūroje. Paskui ląstelės išsėjamos ant NA terpės su atitinkamu antibiotiku (Sharma ir Schimke, 1996).

2.12. NUKLEOTIDŲ SEKOS NUSTATYMAS

Plazmidinė DNR išgryninta 2.5 skyrelyje nurodytu būdu. DNR koncentracija buvo nustatoma elektroforezės agarozės gelyje, naudojant Mass Ruler™ DNA Ladder (High Range) molekulinės masės ir kiekio žymenis (Fermentas). Nukleotidų sekos buvo nustatytos Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre. Buvo naudojamas BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing rinkinys (Applied Biosystems). Sekų nustatymui buvo naudojami standartiniai M13/pUC pradmenys (Fermentas). Sekvenavimo chromatogramos buvo analizuojamos su *Chromas* 2.24 programa (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), o nukleotidų sekos analizuojamos *Vector NTI Advance™ 9.0* programa. Nukleotidų ir aminorūgščių sekų palyginimai buvo atliekami BLAST grupės programomis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

2.13. BELĄSTELINIO EKSTRAKTO PARUOŠIMAS

E. coli DH5α, *E. coli* BL21 (DE3) arba Rosetta kamieno ląstelės buvo transformuojamos tiriamomis plazmidėmis, išsėjamos ant NA terpės su

atitinkamu antibiotiku, vėliau ląstelės, paimtos iš vienos kolonijos buvo persėjamos į skystą terpę (NB, BHI, LB) su antibiotiku. 1:50 naktinės kultūros buvo perkeliama į 1 l skystos terpės su antibiotiku ir auginama 30 °C arba 37 °C temperatūroje aeruojant. Po 4–5 val., kai OD₆₀₀ pasiekia 0.6–1.0 buvo indukuojama pridedant 0.5 mM IPTG, ir kultūros buvo toliau auginamos 30 °C temperatūroje gerai aeruojant. Praėjus 4 arba 18 valandų po indukcijos, ląstelių biomasė buvo surenkama centrifuguojant (4000 g, 30 min). Po to ląstelės buvo praplaunamos 50 mM Tris-HCl pH 8.5 ir vėl centrifuguojamos. Praplautos bakterijos buvo suspenduojamos tame pačiame buferyje ir suardomos veikiant 2 min ultragarsiniu dezintegratoriumi (22 kHz, ledovandens vonioje). Ląstelių nuolaužos buvo pašalinamos centrifuguojant (10000 g, 60 min).

2.14. BALTYMŲ FRAKCIONAVIMAS POLIAKRILAMIDINIAME GELYJE (NDS PAAG)

Baltymų elektroforezė buvo atliekama denatūruojančiomis sąlygomis, naudojant 4,5 % koncentruojantį ir 12 % skirstomąjį gelius. Baltymai buvo dažyti Coomassie Brilliant Blue R-250 dažais, gelis buvo atplaunamas 7 % acto rūgštimi (Laemmli, 1970).

2.15. BALTYMŲ GRYNINIMAS

Baltymų gryninimui buvo naudojamos Ni chelatinė arba jonų mainų CM FF kolonėlės. Ląstelių ekstraktas be nuolaužų buvo užnešamas ant kolonėlės. Afininei chromatografijai naudojamas užnešimo buferis: 50 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl, pH 8,5; eliucijos buferis: 50 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl 0,5 M imidazolo, pH 8,5. Jonų mainų chromatografijai (CM FF kolonėlei) naudojamas užnešimo buferis: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, eliucijos buferis 50 mM Tris-HCl, 1,0 M NaCl, pH 7,5. Surinktos frakcijos su baltymais buvo tikrinamos 15 % NDS PAAG ir dializuojamas prieš užnešimo buferį arba prieš 20 mM amonio hidrokarbonatinį buferį ir liofilizuojama.

2.16. BALTYMŲ GRYNINIMAS IŠ INTARPINIŲ KŪNELIŲ

Ląstelių nuolaužos su intarpiniais kūneliais buvo suspenduojamos buferyje: 50 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl 0,5 M šlapalo, pH 8,5 ir vėl centrifuguojamos (10000 g 60 min). Supernatantas nupilamas, o intarpiniai kūneliai ištirpinami buferyje: 50 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl 6,0 M šlapalo, pH 8,5. Dar kartą centrifuguojama ir švarus ekstraktas gryninamas Ni chelatine kolonėle (5ml). Užnešimo buferis: 50 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl 6,0 M šlapalo, pH 8,5. Baltymas eliuojamas buferiu 50 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl 6,0 M šlapalo 500 mM imidazolo, pH 8,5. Surinktos baltymo frakcijos buvo dializuojamos prieš buferį 50 mM Tris-HCl 0,1 M NaCl, pH 8,5 ir analizuojamos 15 % NDS PAAG.

2.17. HIBRIDINIŲ A β IR TIOREDOKSINO BALTYMŲ HIDROLIZĖ KASPAZE 7

Hibridiniai sulieti Trx-A β baltymai buvo veikiami išgryninta kaspaze. Reakcijos mišinys: 20 mM 2-ME (reikalingas kaspazės aktyvumui), 5 mM CaCl₂ (kalcis reikalingas kaspazės aktyvumui), baltymas: kaspazė, įvairiais santykiais 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 laikomi 37 °C termostate, 10 val.

2.18. A β PEPTIDŲ GRYNINIMAS

Po veikimo kaspaze 7 hidrolizuoti baltymai buvo patikrinami NDS PAAG, po to, ištirpinami 6 M guanidino-HCl. Gautas tirpalas nufiltruojamas ir peptidai gryninami atvirkštinių fazių kolonėlėje (RPC15 3 mL). Kolonėlė buvo praplaunama 10 tūrių I_{RPC} tirpalo (0,05% TFA ir 5% ACN), užnešamas pavyzdys, tada kolonėlė praplaunama 2 tūriais I_{RPC} tirpalo ir tolygiai didinant II_{RPC} tirpalo (0,05% TFA ir 95% ACN) koncentraciją, buvo eliuojami peptidai (25tūriai).

Gautos frakcijos buvo analizuojamos NDS PAAG ir tinkamos frakcijos buvo užšaldomos -80 °C ir po to mėginiai liofilizuojami 12 val. Peptidai tirpinami atitinkamuose buferiuose.

2.19. MUTANTINIŲ HIBRIDINIŲ TRX-A β 40 BALTYMŲ KONSTRAVIMAS

Mutantiniai Trx-A β 40 baltymai buvo konstruojami kryptingos mutagenezės būdu. Nuo plazmidės pET3a-*trx-a β 40*, kurioje yra sulieti tioredoksino ir A β peptido genai, panaudojant dvi pradmenų poras (pvz.: 4612R+6AlaF ir 4036F+6AlaR), buvo susintetinti du DNR fragmentai I PGR metu. Toliau DNR produktai išgryninami iš gelio ir atliekama II PGR reakcija, kur vykdomi pirmieji ciklai be pradmenų, o po to pridedami tik galiniai pradmenys (4612R+4036F). Gautas PGR fragmentas hidrolizuojamas *Xba*I ir *Bam*HI restrikcijos endonukleazėmis ir susiuvamas su didesniu fragmentu, gautu hidrolizavus plazmidę pET3a-*trx-a β 40* taip pat su *Xba*I ir *Bam*HI. PGR reakcijose buvo naudojama *Pfu* polimerazė. Klonai su mutuota seka buvo patikrinami nustatant seką.

2.20. HIBRIDINIŲ A β 40, HIDROFOBINO IR STREPTAVIDINO BALTYMŲ KONSTRAVIMAS

Genų konstruktai *tsa-a β 40* ir *msa-hfb-a β 40* buvo klonuoti atitinkamai į ekspresijos vektorius pET21d ir pET21b. Plazmidė pUC57-*tsa-a β 40* buvo hidrolizuojama restrikcijos endonukleazėmis *Nco*I ir *Xho*I, o gautas 659 bp fragmentas klonuojamas į vektorių pET21d hidrolizuotą tomis pačiomis REazėmis. Plazmidė pUC57-*tsa-hfb-a β 40* buvo hidrolizuojama su restrikcijos endonukleazėmis *Bam*HI ir *Hind*III. Gautas 916 bp fragmentas buvo klonuotas į vektorių pET21b hidrolizuotą tomis pačiomis REazėmis.

E. coli DH5 α kamienas buvo transformuojamas ligavimo mišiniais pET21d-*sa-a β 40* ir pET21b-*sa-hfb-a β 40* ir išsėta ant NA terpės su 50 mg/ml ampicilino. Gauti klonai buvo tikrinami PGR reakcija naudojant pradmenis T7Pro ir T7Ter bei atliekant DNR hidrolizę su pasirinktų restrikcijos endonukleazių rinkiniu, galiausiai DNR sekos nustatytos sekvenavimo centre.

2.21. HIBRIDINIO NUO PIROLOCHINOLINO CHINONO (PQQ) PRIKLAUSOMOS GLIUKOZĖS DEHIDROGENAZĖS IŠ

ACINETOBACTER CALCOACETICUS IR A β 40 BALTYMO KONSTRAVIMAS

Plazmidėje pASKIBA3-PT15 yra iš *Acinetobacter calcoaceticus* klonuotas GDH genas. Šioje rekombinantinėje plazmidėje, GDH baltymo C galą kodojančioje sekoje yra vienintelė *Eco47III* restrikcijos endonukleazės skėlimo vieta, paliekanti bukus DNR galus. Be to *gdh* geno viduryje (baltymo aktyviajame centre) yra *PvuII* skėlimo vieta. Šios dvi vietos buvo pasirinktos A β 40 peptidą koduojančio geno įterpimui.

A β 40 peptidą koduojantis genas buvo padaugintas nuo plazmidės pET3a-*trx-a β 40* plazmidėje su pradmenimis *EclNcoF* ir *SnaBR*.

Padaugintas 120 bp fragmentas buvo veikiamas *Ecl136II* ir *SnaBI* restrikcijos endonukleazėmis ir klonuojamas į pASKIBA3-PT15 plazmidės per *PvuII* skėlimo vietą (gauta plazmidė pTabpvu16) ir per *Eco47III* skėlimo vietą (gauta plazmidė pTabeco1). Gautais konstruktais buvo transformuotas *E. coli* DH5 α kamienas.

2.22. HIBRIDINIO NUO PIROLOCHINOLINO CHINONO (PQQ) PRIKLAUSOMOS GLIUKOZĖS DEHIDROGENAZĖS IŠ ACINETOBACTER CALCOACETICUS IR α -SYN BALTYMO KONSTRAVIMAS

Kaip ir prieš tai aprašytame pavyzdyje, buvo išnaudota GDH gene esanti *Eco47III* hidrolizės vieta. α -syn buvo padaugintas su pradmenimis SynF ir SynR, kuriuose buvo įterptos *EcoRV* veikimo vietos.

Gautas fragmentas buvo hidrolizuojamas restrikcijos endonukleaze *EcoRV* ir klonuojamas į plazmidę pASKIBA3-pT15 per *Eco47III* skėlimo vietą (gauta plazmidė pTsyneco).

2.23. HIBRIDINIO NUO PIROLOCHINOLINO CHINONO (PQQ) PRIKLAUSOMOS GLIUKOZĖS DEHIDROGENAZĖS IŠ *E. COLI* IR A β 40 PEPTIDO BALTAMO KONSTRAVIMAS

Plazmidėje pET11M-*yl1* esantis gliukozės dehidrogenazės genas turi vienintelę *AjiI* hidrolizės vietą, kuri buvo naudojama *a β 40* geno įterpimui. Nuo plazmidės pET3a-*trx-a β 40* panaudojus *EclNcoF* ir *SnaB*R pradmenis buvo padaugintas 120 bp fragmentas, kuris buvo hidrolizuojamas *Ecl136II* ir *SnaBI* restrikcijos endonukleazėmis ir klonuotas į pET11M-*yl1* plazmidės *AjiI* atpažinimo vietą. *E. coli* DH5 α kamienas buvo transformuojamas kaip aprašyta 2.12 skyrelyje. Po atrankos buvo gautos 2 plazmidės *pyli-ab9* ir *pyli-ab10*

2.24. α -SYNCYS141 KONSTRAVIMAS; α -SYN IR α -SYNCYS141 RAIŠKA IR GRYNINIMAS

α -Syn cisteino mutanto konstravimui buvo naudojama plazmidė pRK172 ir pradmenys (*SynF* ir *SyncysR*), su kuriuo vienu įvedama papildoma cisteino aminorūgštis (*SyncysR*).

Gautas PGR fragmentas buvo hidrolizuojamas restrikcijos endonukleazėmis *XbaI* ir *XhoI* ir liguojamas su plazmide pET21a, hidrolizuota su *XbaI* ir *XhoI*. Ligavimo mišiniu buvo transformuojamas *E. coli* DH5 α kamienas. Atrinktos kelios kolonijos buvo patikrintos restrikcijos endonukleazių deriniu ir PGR reakcija.

2.25. α -SYN IR α -SYNCYS141 RAIŠKA IR GRYNINIMAS

E. coli BL21 (DE3) kamienas transformuojamas pET21a-Syn ir pET21a-Syncys141, ląstelės išsėjamos ant NA su Ap 50 μ g/ml. Ląstelės auginamos 37 °C iki OD₆₀₀ pasiekia 0,8 ir indukuojama su 0,2 mM IPTG, tada auginama 4 val. 30 °C. Ląstelių biomasė suspenduojama buferyje: 50 mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, pH 8,0 ir ardoma ultragarsiniu dezintegratoriumi. Tada gautas suardytų ląstelių mišinys pakaitinamas 10 min 100 °C, po to centrifuguojama. Baltymų ekstraktas buvo užnešamas ant Q XL

1 ml kolonėlės (užnešimo buferis: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, eliuacijos buferis: 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,5) (Der-Sarkissian ir kt., 2003). Jei baltymas nebuvo grynas, jis papildomai užnešamas ant ANX kolonėlės. (Užnešimo buferis: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; eliuacijos buferis: 50 mM Tris-HCl 1 M NaCl pH 7,5). Po gryninimo frakcijos buvo tikrinamos 15 % NDS PAAG.

2.26. KUMELĖS PIENO LIZOCIMO (EL) BALTYMĄ KODUOJANČIO GENO KLONAVIMAS

EL koduojantis DNR frgmentas iš pET28a plazmidės iškirptas *NcoI* ir *NotI* buvo liguojamas su plazmidėmis pETM-11, pETM-50, pETM-52, pETM-80 ir pETM-82, hidrolizuotomis tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis. *E. coli* DH5 α ląstelės buvo transformuojamos tiriamomis plazmidėmis ir išsėtos ant NA lėkštelių su 40 μ g/ml kanamicino. Tinkami klonai su įstatytu 412 bp fragmentu buvo atrinkti po *NcoI* ir *NotI* hidrolizės ir patvirtinta DNR sekoskaitos būdu.

2.27 EL BALTYMĄ KODUOJANČIO GENO RAIŠKA IR GRYNINIMAS

Rekombinantinio EL raiškai buvo naudojami *E. coli* BL21 (DE3) arba C43 (DE3) ląstelės. Nuo NA lėkštelių su kanamicinu 40 μ g/ml ląstelės buvo inokuliuojamos NB terpėje. 10 mM CaCl₂ buvo pridedama į auginimo terpę. Ląstelės auginamos 30 °C, kol OD₆₀₀ pasiekia 0,8 ir tada buvo indukuojama su 0,5 mM IPTG 30 °C. Po 5 val. biomasė buvo surenkama centrifuguojant 4000 g, 20 min, 4 °C. Ląstelės praplaunamos ir resuspenduojamos 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 ir suardomos ultragarsu. Ląstelių nuolaužos buvo surenkamos centrifuguojant 10 000 g, 20 min, 4 °C. Netirpūs kūneliai buvo tirpinami 50 mM Tris-HCl 6 M šlapalo, pH 8,5. Baltymų ekstraktas užnešamas ant Ni chelatinės kolonėlės. Baltymai buvo eliuojami su 500 mM imidazolo, frakcijos su denatūruotu His-EL buvo surenkamos ir dializuojamos prieš 20 mM Tris-HCl, 1 mM 2-ME, 10 mM arginino, pH 8,0. Po renatūracijos tirpūs baltymai

buvo atskirti centrifuguojant. Polihistidininė „uodega“ buvo pašalinama veikiant tabako mozaikos viruso proteaze (TEV) 3 val. kambario temperatūroje. Hidrolizuotų baltymų mišinys buvo užnešamas ant Sepharose SP FF kolonėlės (GE Healthcare) su 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 buferiu ir EL buvo eliuojamas NaCl gradientu (0–1 M). Frakcijos su švariu EL buvo surenkamos ir dializuojamos prieš 20 mM amonio hidrokarbonatinį buferį, pH 7,5, užšaldoma ir liofilizuojama. Baltymo koncentracija buvo nustatoma Lowry metodu ir spektroskopiškai 280 nm bangoje, naudojant ekstinkcijos koeficientą $34\,530\text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$.

2.28. EL AKTYVUMO NUSTATYMAS

Fermentinis lizocimo aktyvumas buvo matuojamas pagal *Micrococcus luteus* ląstelių hidrolizę. Optinio tankio mažėjimas buvo matuojamas spektrofotometru 25 °C temperatūroje 450 nm ilgio bangoje. Reakcijos mišinį sudarė 50 mM Tris-HCl buferis, pH 7,5, 15 mg/ml *Micrococcus luteus* ląstelių (Sigma) ir 1 μl (0.1 mg/ml) baltymo. Bendras mišinio tūris buvo 1 ml. Vienas fermento aktyvumo vienetas – tai toks fermento kiekis, kuris sumažina absorbciją 0,001 vieneto per minutę (Kikuchi ir kt. 1988).

2.29. HIBRIDINIŲ TRX IR Aβ40 MUTANTINIŲ BALTYMŲ SAŲVEIKOS SU HEMU NUSTATYMAS

Baltymų koncentracijos buvo nustatomos spektroskopiškai pagal sugertį 280 nm bangoje (ekstinkcijos koeficientas $15460\text{ M}/\text{cm}$). Hibridinių baltymų ir hemo komplekso formavimas buvo nustatomas esant santykiu 1:1 (Galutinė koncentracija PBS pH 7.5 tirpale buvo 6 μM). Buvo užrašomas sugerties spektras nuo 350 nm iki 750 nm. Kai hemas susijungdavo su Trx-Aβ hibridiniais baltymais buvo stebimas smailės padidėjimas ties 380 nm banga.

2.30. PEROKSIDAZĖS AKTYVUMO NUSTATYMAS HIBRIDINIŲ TRX-A β 40 BALTYMŲ IR HEMO KOMPLEKSE

Susidariusio hibridinių baltymų ir hemo komplekso peroksidazinis aktyvumas buvo nustatomas matuojant 3,3',5,5' tetrametilbenzidinas (TMB) oksidaciją vandenilio peroksidu ir stebint sugerties padidėjimą 652 nm bangoje kas 5 ir 10 min. Peroksidazės aktyvumas buvo nustatomas esant 1,2 μ M PBS pH 7,5 tirpale (Reakcijos mišinys (1 ml): 100 μ l TMB, 200 μ l mišinio (6 μ M baltymo, 6 μ M hemo tirpalo PBS buferyje, pH 7,5) ir 700 μ l PBS, pH 7,5).

2.31. BALTYMŲ FIBRILINIMAS

Priklausomai nuo baltymo ar peptido, buvo pritaikomos skirtingos fibrilinimo sąlygos. Baltymai ar peptidai buvo ištirpinami atitinkamame buferyje:

Buferio sudėtis	pH
100 mM HCl-glicininis	2,7–3,0
10 mM Na-actetatinis	4,6
50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl	7,0

ir fibrilinama 37 °C arba 57 °C temperatūroje, kratant 550 apm arba nekratant, 3–10 dienų, kai baltymo koncentracija 1–10 mg/ml, o terpės pH 2–8, esant 0,01% NaN₃.

2.32. TIOFLAVINO T (ThT) FLUORESCENCIJOS MATAVIMAS

ThT tirpalo (1 mM PBS buferyje) pridedama į fibrilių mėginius, galutinė koncentracija ThT ir baltymo (skaičiuojant nuo pradinės koncentracijos prieš fibrilinant) 5 μ M (LeVine, 1993) ir inkubuojama 30 min kambario temperatūroje. ThT fluorescencijos spektras matuojamas nuo 460 iki 600 nm bangos, sužadinant ties 450 nm banga, o emisija stebima ties 485 nm. ThT fluorescencijos emisijos spektras buvo užrašomas PerkinElmer Precisely LS55 luminescenciniu spektrometru.

2.33. AJM PAVYZDŽIŲ PARUOŠIMAS

Molekuliniai sluoksniai žėručio paviršiuje buvo formuojami nusodinant juos iš fibrilių tirpalų. Paviršiaus, ant kurio buvo lašinamas tirpalas, temperatūra buvo lygi kambario temperatūrai (+ 21 °C), santykinis aplinkos drėgnumas buvo 40–50 %. Užlašinus baltyminio tirpalo (1–10 µl), bandinys buvo džiovinamas pasirinktą laiką (2–30 min) kambario temperatūroje, t. y. atliekama imobilizacija. Po imobilizacijos bandinys buvo plaunamas distiliuotu vandeniu, taip pašalinant tirpale buvusias, tirpalo stabilizavimui reikalingas komponentes (dažniausiai įvairias druskas), kurios labai apsunkina baltymų vizualizavimą skenuojančio zondo mikroskopu (SZM). Po plovimo distiliuotu vandeniu, bandiniai buvo džiovinami (+30 °C) temperatūroje.

Siekiant suformuoti plonesnius biomolekulinius sluoksnius baltymų tirpalai prieš nusodinimą ant paviršiaus buvo skiedžiami distiliuotu vandeniu.

Paviršiai buvo vizualizuojami skenuojančio zondo mikroskopu (SPM D3100/Nanoscope IVa (Veeco)) kontaktiniu ir virpančiojo zondo režimais. Eksperimentų metu buvo naudoti SZM zondai pagaminti iš silicio (virpančio zondo režimui, rezonansinis virpinamo liežuvėlio dažnis 200-350 kHz), bei silicio nitrido (kontaktiniam režimui). Zondų adatos galo skersmuo buvo 2–25 nm.

Paviršių analizė buvo atliekama ir Agilent 5500 AFM / STM skenuojančio zondo mikroskopu (Agilent Technologies Inc, JAV). Buvo naudojami virpinamieji liežuvėliai TESP (Veeco, Plainview, NY) ($f = 257\text{--}301$ kHz) (Nanosensors, Neuchatel, Šveicarija).

Duomenims apdoroti ir vizualizuoti buvo naudojama Veeco programa Nanoscope, kompanijos Image Metrology sukurta programa Scanning Probe Image processor (SPIP) bei atviro kodo programa Gwyddion.

2.34. FIBRILIŲ MODIFIKAVIMAS BIOTINU

Biotino maleimido (Sigma-Aldrich) 4,5 mg ištirpinama 1 ml 20 % DMSO tirpale (pradinio tirpalo koncentracija 10 mM). Biotinilinio reakcijai

naudojama 5 moliais daugiau biotino nei biotinilinio baltymo. Po biotinilinio, baltymai dializuojami prieš atitinkamą buferį.

2.35. TEM MĖGINIŲ PARUOŠIMAS

1 μ l mėginio užnešama ant anglimi dengto paladžio tinklelio (1 mm 400 akučių). Mėginys džiovinamas kambario temperatūroje 5–10 min. Užlašinami keli lašai 2% uranilo acetato (Reachim, Rusija), paliekama 30 sekundžių išdžiūti kambario temperatūroje. Mėginiai buvo analizuojami peršviečiamuoju elektroniniu mikroskopu (JEOL-JEM-100S TEM, Japonija). Instrumentinis didinimas yra 25000 kartų. Fibrilių matmenys nustatomi tiesiogiai iš mikrografinių vaizdų.

2.36. TETRAMERINIO STREPTAVIDINO AKTYVUMO NUSTATYMAS

Tetramerinis streptavidinas buvo tikrinamas, naudojant biotiną sujungtą su stilbazolio fluoroforu (Dr. Olego Eicher-Lorkos dovana), sužadindamas ties 479 nm, emisija ties 594 nm banga (cheminė formulė $C_{37}H_{55}ClN_4O_6S$, molekulinė masė 719,37 g/mol). Mėginiai su streptavidinu buvo sumaišomi su 5 moliais daugiau biotino-stilbazolo junginiu ir analizuojama NDS PAAG pusiau denatūruojančiomis sąlygomis. Po elektroforezės gelis buvo analizuojamas ultravioletinėje šviesoje. Biotino ir streptavidino sąveika buvo nustatoma, stebint švytėjimą toje vietoje, kurioje yra baltymas.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Vis dažniau baltymai yra naudojami įvairių nanodarinių konstravimui, kurie bus pagrindas naujų nanoprietaisų gamybai. Yra žinoma nemažai baltymų ar peptidų, kurie formuoja amiloidinius agregatus, tačiau dažniausiai tiriami su neurodegeneracinėmis ligomis susiję baltymai. Šiame darbe buvo pasirinkti keli baltymai ($A\beta_{40}$, α -Syn, EL), kurie amiloidines fibriles formuoja *in vivo* ir *in vitro*. $A\beta_{40}$, α -Syn, pagrindu buvo kuriami mutantiniai variantai ir hibridiniai baltymai, kuriuose $A\beta_{40}$ ir α -Syn buvo suliejami su kitais baltymais. Taip pat buvo tiriamas rekombinantinis iš *E. coli* ląstelių išskirtas EL. Šių baltymų savybės ir galimybės panaudoti juos funkcionalių nanomedžiagų kūrimui buvo analizuojamos pasitelkus įvairius metodus.

3.1. $A\beta$ AMILOIDINIAI PEPTIDAI

$A\beta_{40}$ yra 40 aminorūgščių peptidas, kuris būdamas tirpale, esant tam tikroms sąlygoms, labai greitai agreguoja ir formuoja tvarkingas β -klosčių struktūras. Šiame darbe, genų inžinerijos metodais, buvo konstruojami $A\beta_{40}$ mutantai ir hibridiniai baltymai, kuriuose šis peptidas buvo sulietas su kitais neamiloidiniais baltymais. Buvo tikimasi, kad tokie baltymai formuos amiloidines fibriles ir pasižymės kitokiomis savybėmis nei $A\beta_{40}$ fibrilės. Susidarę naujai sukonstruotų ir išgrynintų baltymų agregatai buvo vizualizuojami, įvertinant ThT fluorescencijos padidėjimą ir struktūras stebint AFM metodu.

3.1.1. Rekombinantinių $A\beta$ peptidų gryninimas

$A\beta$ peptidai yra labai maži ir toksiški, todėl jų raiška *E. coli* ląstelėse yra kebli. Tam, kad bakterijos galėtų sintetinti tokius peptidus, šie yra suliejami su bakterinės kilmės nedideliais baltymais, kurie palengvina baltymo raišką ir gryninimą. Šiame darbe, rekombinantinių $A\beta$ peptidų sintezei *E. coli* ląstelėse, $A\beta_{40}$ koduojantis genas buvo sulietas su tioredoksiną koduojančia seka (*trx*) (3.1 pav.). Toks sulietų genų konstruktas buvo pET3a-*trx-a β_{40}* plazmidėje.

Tarp *trx* ir *aβ40* genų sekų yra įterpta keturių aminorūgščių motyvą DEVD koduojanti seka, kuri yra savita kaspazės 7 proteolizės vieta. Ši proteazė skelia ties savo taikiniu ir taip atskiria tioredoksina nuo Aβ40, kuris vėliau yra išgryninimas. Kaspazę 7 koduojantis genas yra pET3a-*casp7* plazmidėje. Taigi, Aβ40 peptido gryninimas susideda iš kelių etapų: pirmiausiai išgryninami sulieti Trx-Aβ40 baltymai ir kaspazė 7, kitame etape vykdoma sulieto baltymo proteolizė kaspazė 7, o paskutiniame etape – išgryninami Aβ40 peptidai.

```

M S D K I I H L T D D S F D T D V L K A D G A I L V
atgagcgataaaattattcacctgactgacgacagtttgacacggacgtactcaaagcggacggggcgatcctcgtc

D F W A E W C G P C K M I A P I L D E I A D E Y Q G
gatttctgggcagagtgggtgcggtccgtgcaaaatgatcgccccgattctggatgaaatcgctgacgaatatcagggc

K L T V A K L S I D Q N P G T A P K Y G I R G I P T
aaactgac cgttgc aaaactgagcatcgatcaaaaccctggcactgcgccgaaatatggcatccgtggtatcccgact

L L L F K N G E V A A T K V G A L S K G Q L K E F L
ctgctgctgttcaaaaacggtgaagtggcggcaaccaagtgggtgcactgtctaaggtcagttgaaagagttcctc

D A N L A G S G S G H M H H H H S S D E V D D A
gacgctaacctggccggttctggttctggccacatgcaccatcatcaccatcattctctgatgaagtagacgacgct
* * * * *

E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K
gaattccgtcacgactccggttac gaagtcca ccca gaaactggtttctcgtcga agacgttggtccaacaaa

G A I I G L M V G G V V
ggtgctatcatcgggtctgatggttggtggtgtgtt

```

3.1 pav. Sulieto tioredoksino (*trx*) ir *aβ40* genų bei jų koduojamo baltymo sekos. Baltame laukelyje pažymėtas *trx* geno seka, žvaigždutėmis pažymėta histidinių uodegėlę koduojanti seka, paryškintame langelyje pažymėta kaspazės 7 atpažinimo seka, o pilkame langelyje nurodyta Aβ40 peptidą koduojanti seka.

E. coli ląstelės buvo transformuojamos pET3a-*trx-aβ40* plazmide. Geriausia hibridinių Trx-Aβ40 baltymų raiška buvo stebima, kai ląstelės buvo auginamos 37 °C, 4 val. po indukcijos. Esant šioms sąlygoms ląstelių optinis tankis (OD₆₀₀) siekė 2,5–3,0. Suardytų bakterinių ląstelių nuolaužų, ištirpintų 6 M šlapalo buferyje, ir tirpių ląstelės baltymų ekstraktai buvo frakcionuojami

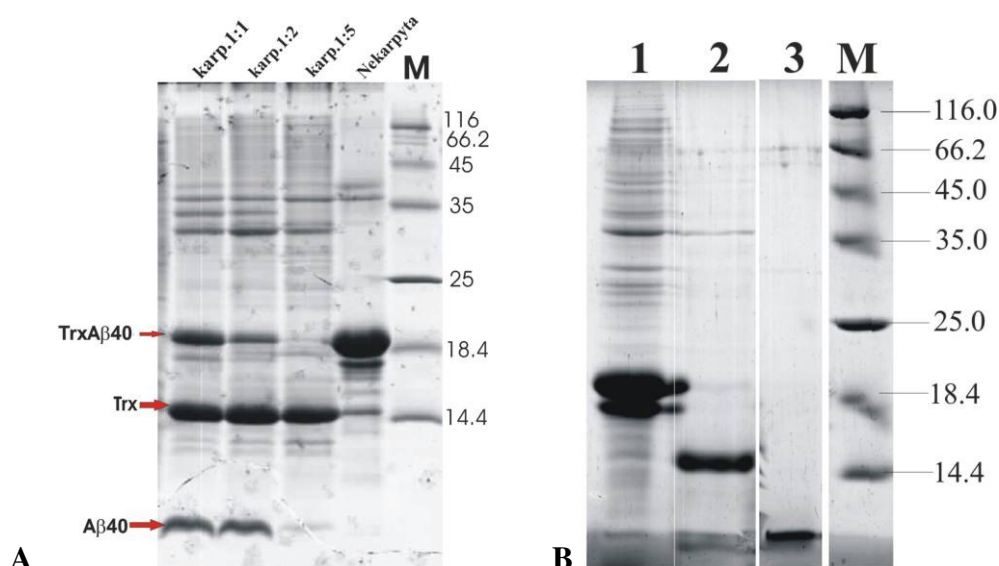
NDS PAAG. Buvo nustatyta, kad didžioji dalis Trx-A β 40 hibridinių baltymų buvo ekstraktuose su šlapalu. Tai rodo, kad baltymai yra ekspresuojami intarpinių kūnelių pavidalu. Kai indukcija buvo vykdoma žemesnėje temperatūroje (25 °C), buvo stebima nedidelė baltymo raiška. Auginant ląsteles 30 °C, 50 % hibridinio baltymo buvo tirpus ir 50 % buvo ekspresuojamas intarpiniuose kūneliuose. Taigi, indukuojant aukštesnėje temperatūroje, didžioji dalis hibridinio baltymo buvo surenkama netirpioje frakcijoje ir taip atsikratoma didžiosios dalies *E. coli* ląstelių tirpių baltymų.

Netirpūs hibridiniai baltymai buvo ištirpinami buferyje su 6 M šlapalo ir užnešami ant Ni²⁺ chelatinės kolonėlės. Chromatografija buvo vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis. Surinktos denatūruotos frakcijos buvo renatūruojamos dializės metu ir tikrinamos 15 % NDS PAAG. Buvo stebima apie 18 kDa juostelė. Ji atitinka hibridinio Trx-A β 40 baltymo molekulinę masę, kuri yra lygi 18159,53 g/mol (3.2 pav.). Iš 1 l kultūros buvo gauta apie 10 mg Trx-A β 40 baltymo.

Hibridinio Trx-A β 40 baltymo proteolizei buvo naudojama rekombinantinė kaspazė 7. Kaspazę koduojantis genas buvo pET3a-*casp7* plazmidėje, kuria buvo transformuojamas *E. coli* Rosetta bakterinis kamienas. Šio baltymo raiška stebima, indukuojant 24 °C. Aukštesnėje temperatūroje baltymas nėra sintetinas. Kaspazė7 yra heterotetrameras, sudarytas iš dviejų heterodimerų (20 kDa ir 11 kDa subvienetai). Kaspazė 7 yra tirpus baltymas, todėl buvo gryninama kaip ir tirpūs Trx-A β 40 hibridai.

Išgryninti Trx-A β 40 baltymai buvo hidrolizuojami su rekombinantine kaspaze 7, kuri atpažįsta DEVD aminorūgščių motyvą ir atskiria A β 40 peptidą nuo tioredoksino. Hibridiniai baltymai buvo hidrolizuojami minėta kaspaze skirtingomis dalimis (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20). Reakcijos mišinyje buvo 20 mM β -merkaptoetanolio, 5 mM CaCl₂, kurie reikalingi kaspazės fermentiniam aktyvumui. Hibridinių baltymų proteolizė priklausė nuo inkubacijos/reakcijos laiko ir nuo kaspazės koncentracijos. Geriausiai kaspazė 7 hidrolizuoja esant santykiui 1:5 37 °C, laikant 12 val. (3.2 pav.).

Po hidrolizės dalis baltymų iškrito į nuosėdas. Nuosėdų ir skystos frakcijos ekstraktai buvo analizuojami 15 % NDS PAAG. Nustatyta, kad didžioji dalis Aβ40 peptidų yra skystoje frakcijoje. Žinant, kad Aβ40 monomerinė forma yra labai nestabili ir linkusi oligomerizuotis, baltymų hidrolizatas buvo ištirpinamas 6 M guanidino-HCl buferyje ir gryninamas atvirkštinių fazių kolonėlėje (RPC15 3 mL). Aβ peptidai eliuojami, kai acetonitrilo (ACN) koncentracija yra apie 40 %. Aβ peptidų išėiga 1 mg/1 l kultūros. Gautos frakcijos buvo analizuojamos 18 % NDS PAAG. Tos, kuriose buvo Aβ peptidai, buvo liofilizuojamos. Peptidų grynumas buvo nustatomas analizuojant gelius. Priklausomai nuo eksperimento, peptidai buvo tirpinami atitinkamuose buferiuose.



3.2 pav. Kaspaze 7 hidrolizuotų hibridinių Trx-Aβ40 baltymų 15% NDS PAAG vaizdas (A). Aβ40 peptidų po gryninimo RPC kolonėle elektroforetinis vaizdas (B), 1 – Trx-Aβ40, 2 – Trx, 3 – Aβ40, M – molekuliniai žymenys).

Be Aβ40 peptido, buvo gryninami ir Aβ40 cisteino mutantai. Sintetiniu būdu gauti mutantiniai Aβ40 peptidus koduojantys genai, kurie buvo klonuoti į ekspresijos vektorių pET-3a. Šių mutantinių peptidų N ir C gale, vietoj 2-oje padėtyje esančio alanino (Ala) ir 39-oje padėtyje esančio valino (Val) įstatytas cisteinas (Cys). Mutantiniai Aβ40cys2 ir Aβ40cys39 peptidai buvo sintetinami sulietoje formoje su tioredoksinu kaip ir Aβ40 peptidai. Yra

žinoma, kad A β 40 peptido N ir C galai yra nestruktūrizuoti, tačiau C galas yra labai hidrofobinis ir gali dalyvauti β -klostės susidaryme. Buvo sukurti A β 40 cisteino mutantai, kurie gali agreguotis į β -struktūras, o N ir C galuose esantys cisteinai (t.y. cisteino tiolinė grupė) bus prieinami modifikavimui. Šių mutantinių peptidų raiška ir gryninimas buvo atliekami taip pat kaip ir A β 40 peptidų. Šių peptidų išeiga ~1 mg/1l kultūros.

3.1.2. Mutantinių A β 40 peptidų fibrilinimas ir savaiminių β -klostinių struktūrų tyrimas

Sukonstruoti ir išgryninti mutantiniai peptidai buvo fibrilinami įvairiomis sąlygomis, keičiant temperatūrą, terpės pH, inkubavimo trukmę, baltymų koncentraciją. Laukinio tipo A β 40, A β 42 fibriles formuoja *in vivo* bei *in vitro*, esant įvairioms sąlygoms.

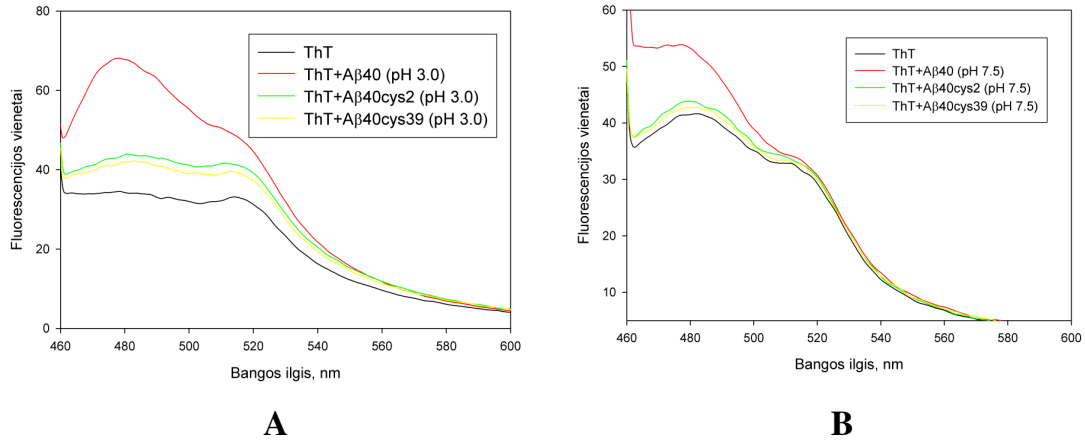
Norint ištirti kaip A β 40cys2, A β 40cys39 formuoja fibrilines struktūras, mėginiai buvo ruošiami skirtingomis sąlygomis, kai:

- pH 7,5 (50 mM Tris-HCl), peptido koncentracija 1 mg/ml (230 μ M), 37 °C, 5 dienos, 550 apm, 0,01% NaN₃, šios sąlygos toliau vadinamos neutraliomis;
- pH 3,0 (100 mM glicino-HCl), peptido koncentracija 1 mg/ml (230 μ M), 57 °C, 5 dienos, 550 apm, 0,01% NaN₃, šios sąlygos toliau vadinamos rūgštinėmis.

A β 40 peptidas buvo gryninamas ir fibrilinamas tomis pačiomis sąlygomis kaip ir mutantiniai A β 40cys2, A β 40cys39 peptidai ir naudojama kaip kontrolė įvertinant fibrilinių struktūrų skirtumus.

Rekombinantinių A β 40 ir jo mutantų susidariusios fibrilinės struktūros pirmiausiai buvo kiekybiškai įvertinamos matuojant ThT fluorescencijos padidėjimą (3.3 pav.). Tioflavinas T (ThT) yra vienas iš pagrindinių rodiklių, nustatant amiloidus. Iš literatūros žinoma, kad pH neturi reikšmės ThT dažo pokyčiams, kai pH nuo 3,0 iki 7,5, o fluorescencijos pokytis yra susijęs su baltymo struktūriniais pakitimais (Levine, 1993). 5 μ M (skaičiuojama nuo pradinės peptidų koncentracijos) fibrilių mėginių buvo

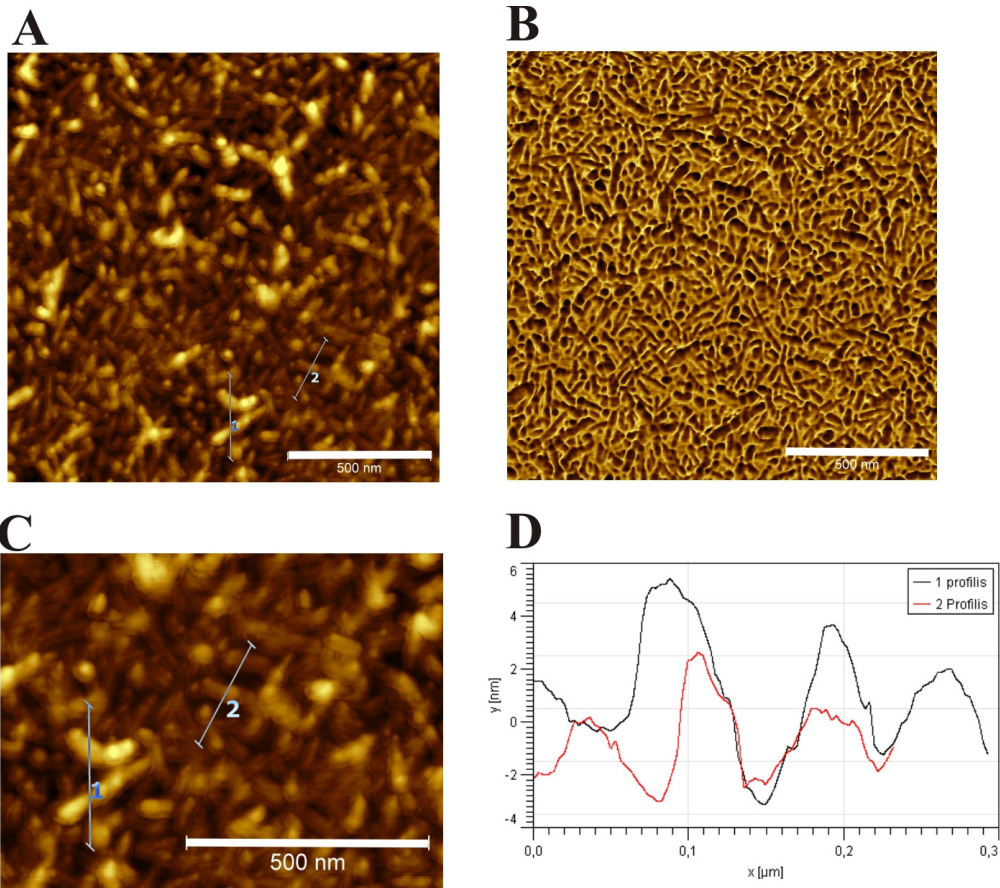
inkubuojami su 5 μ M ThT, PBS buferyje apie 30 min. Nefibrilinti peptidai nesijungė su ThT ir nebuvo stebimas ThT fluorescencijos padidėjimas (duomenys nepateikti).



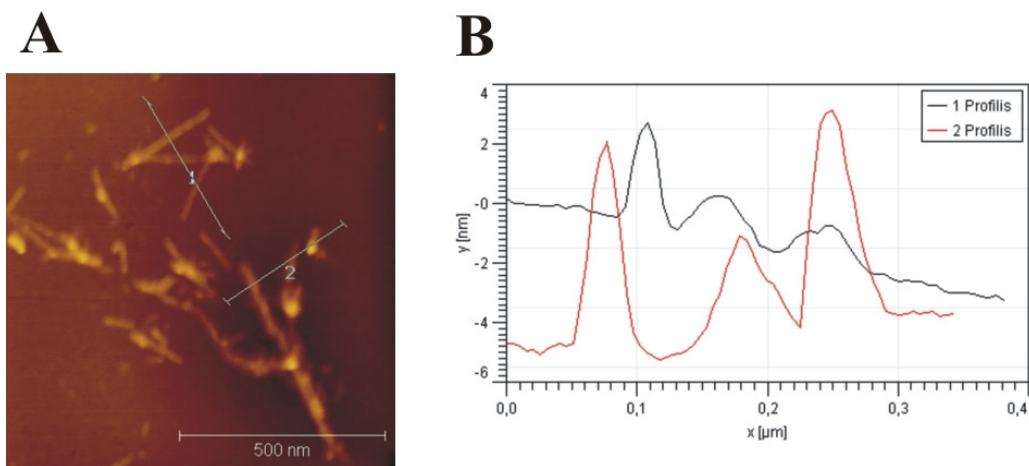
3.3 pav. ThT fluorescencijos spektrai su A β 40 ir A β 40cys2, A β 40cys39 fibrilių mėginiais, gautais fibrilinant pH 3,0 (A) ir pH 7,5 (B).

Iš ThT fluorescencijos spektrų matyti, kad rekombinantiniai A β 40 ir jo mutantai formuoja β -klosčių agregatus, o pH turi įtakos fibrilių susidarymui. Esant rūgštiniam pH, A β 40 peptidas agreguoja labiau nei A β 40 cys mutantai, o A β 40cys2 peptidas yra labiau linkęs formuoti fibriles nei A β 40cys39. Esant neutraliam pH, stebimi silpni fluorescencijos signalai mėginiuose su A β 40cys peptidais, kai A β 40 peptidas formavo panašų kiekį fibrilinių struktūrų kaip ir rūgštiniame pH.

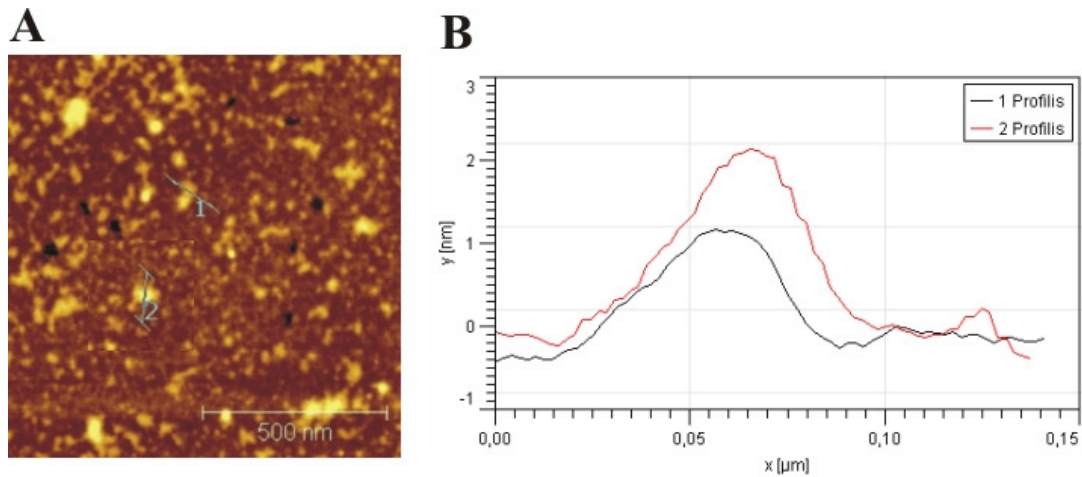
Nustačius, kad rekombinantiniai peptidai agreguoja, toliau pagrindinis uždavinys buvo ištirti A β 40 ir jo mutantų fibrilių savybes ir morfologiją *ex situ* virpančiojo zondo režimo AJM. Šiuo metodu buvo analizuojami rūgštiniame pH gauti A β 40 (3.4 pav.), A β 40cys2 (3.5 pav.) ir A β 40cys39 (3.6 pav.) fibrilių mėginiai. Topografinis vaizdas leidžia įvertinti fibrilių savybes, o fazinis fibrilių vaizdas papildo duomenis apie fibrilių prigimtį.



3.4 pav. A β 40 fibrilių *ex situ* AJM vaizdai. A β 40 fibrilių topografinis vaizdas (A) (fibrilinta rūgštinėmis sąlygomis), (B) fazinis vaizdas, (C) padidintas topografinis vaizdas, (D) skersiniai fibrilių pjūviai. Mastelis ir profiliai pažymėti baltais brūkšneliais. Skenavimo laukas pasirinktas atsitiktinai.



3.5 pav. A β 40cys2 fibrilių *ex situ* AJM vaizdai. Topografinis vaizdas (A) ir fibrilių profiliai (B). Fibrilinta rūgštinėmis sąlygomis. Mastelis ir profiliai pažymėti baltais brūkšneliais. Skenavimo laukas pasirinktas atsitiktinai.



3.6 pav. A β 40cys39 fibrilių *ex situ* AJM topografinis vaizdas (A) ir fibrilių profiliai (B). Fibrilinta rūgštinėmis sąlygomis. Mastelis ir profiliai pažymėti baltais brūkšneliais. Skenavimo laukas pasirinktas atsitiktinai.

Rekombinantinio A β 40 ir jo mutantinių variantų A β 40cys2 ir A β 40cys39 peptidų formuojamos fibrilinės struktūros skiriasi. Susidariusių fibrilių kiekį matuojant po dažymo ThT dažu, buvo nustatyta, kad esant rūgštinėms sąlygoms A β 40 peptidas, formuoja daugiau fibrilių negu jo mutantiniai variantai. Be to, A β 40cys2 peptidas formuoja daugiau fibrilių negu A β 40cys39. Šiuos rezultatus patvirtina ir AJM vaizdai. Šiuos peptidus fibrilinant neutraliomis sąlygomis buvo stebimas nedidelis susidariusių β -klostinių struktūrų kiekis, todėl jie nebuvo analizuojami AJM.

Tiriant šių peptidų fibrilių morfologiją, nustatyta, kad A β 40 peptido (3.4 pav.) formuojamos fibrilės yra 3,5–9 nm aukščio, vidutinio ilgio, nešakotos. A β 40cys2 (3.5 pav.) fibrilės išlieka ilgos ir nešakotos struktūros, o fibrilių aukštis 2–7 nm. A β 40cys39 fibrilės (3.6 pav.) formuoja 1,5–3 nm aukščio darinius, kurie savo forma skiriasi nuo kitų dviejų peptidų formuojamų fibrilių. A β 40cys2 peptidas formuoja panašios į A β 40 morfologijos fibriles. Mutantinis A β 40 peptidas, kuriame cisteinas yra N gale (A β 40cys2) yra labiau linkęs formuoti ilgas fibrilines struktūras nei A β 40cys39, kuriame cisteinas yra C gale. Iš literatūros žinoma, kad vandenyje A β 40 C galas yra hidrofobinis, o pakeitus vieną hidrofobinę aminorūgštį valiną į hidrofilinę aminorūgštį cisteiną yra sumažinamas C galo hidrofobiškumas ir yra sudaroma kliūtis

oligomerizuotis į ilgas fibrilines struktūras. Literatūroje nurodomas Aβ40 fibrilių aukštis nuo 3,5–13 nm, o ilgis gali siekti iki kelių šimtų mikrometrų. Fibrilės yra ilgos ir nešakotos. Fibrilinant mūsų pasirinktomis sąlygomis, buvo stebimos panašios struktūros, kokios yra minimos literatūroje.

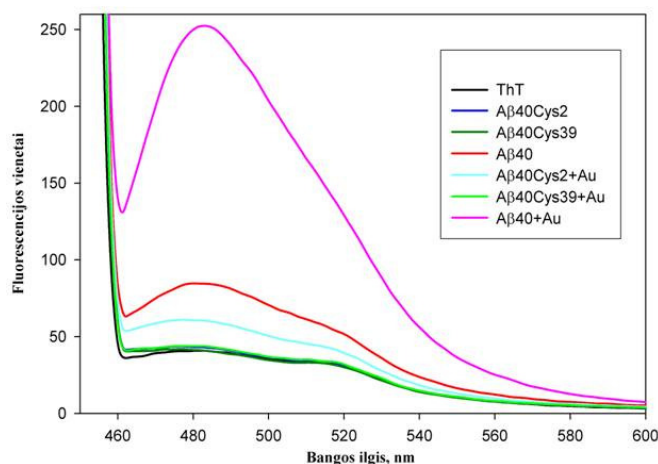
Po šių eksperimentų paaiškėjo, kad Aβ40cys2 peptidas, kuris formuoja ilgas fibrilines struktūras, gali būti modifikuojamas.

3.1.3. Mutantinių Aβ40cys2 ir Aβ40cys39 baltymų modifikavimas aukso nanodalelėmis

Ankstesniame skyrelyje buvo aprašyta kaip Aβ40cys2 ir Aβ40cys39 mutantiniai peptidai geba formuoti fibriles. Nustatyta, kad abu peptidai formuoja fibrilines struktūras, tik Aβ40cys2 peptidas yra labiau linkęs formuoti fibriles. Šiuos peptidus teoriškai būtų galima modifikuoti per cisteino tiolinę grupę. Šiam tikslui pasiekti buvo tiriama, kaip Au nanodalelės lemia fibrilinių struktūrų formavimąsi.

Yra žinoma, kad Au nanodalelės gali jungtis prie baltymo ar peptido tiolinės (-SH) grupės. Buvo išbandyti du būdai modifikuoti fibriles Au nanodalelėmis, t.y. fibrilinti kartu su Au nanodalelėmis, arba baltymus ar peptidus modifikuoti jau po fibrilinimo.

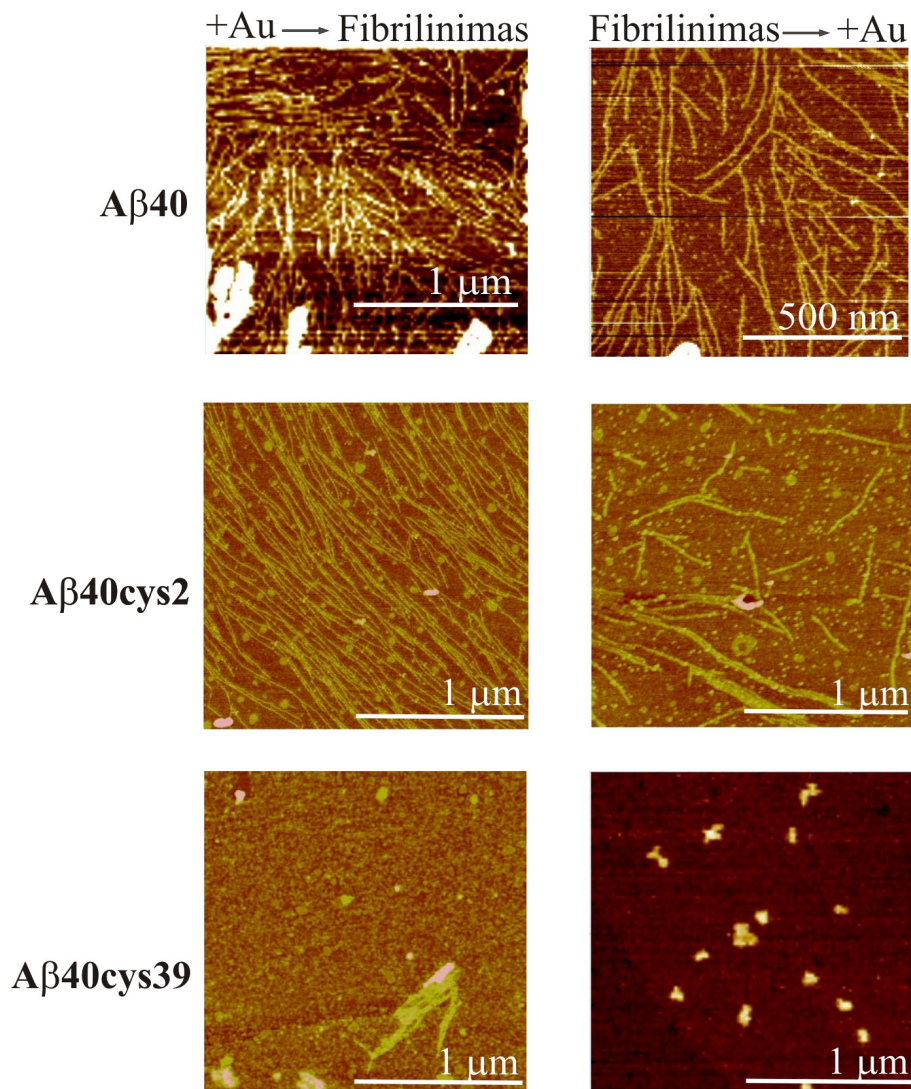
Aβ40 ir jo cisteino mutantų Aβ40cys2 ir Aβ40cys39 fibrilinimas buvo vykdomas šiomis sąlygomis: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, peptidų koncentracija 1 mg/ml, 37 °C, 550 apm, 5 dienos, 0,01% NaN₃. Aukso nanodalelių suspensijos (5 μl 0,01% HAuCl₄ (5 nm skersmens)) pridedama prieš fibrilinimą ir po jo, galutinė HAuCl₄ koncentracija tirpale buvo 0,0025%. Fibrilių mėginiai buvo įvertinami matuojant ThT fluorescenciją (3.7 pav.).



3.7 pav. Aβ40 ir Aβ40cys2, Aβ40cys39 fibrilių, gautų fibrilinant be (pridedama po fibrilinimo) ir su Au nanodalelėmis, jungimosi su ThT spektrai.

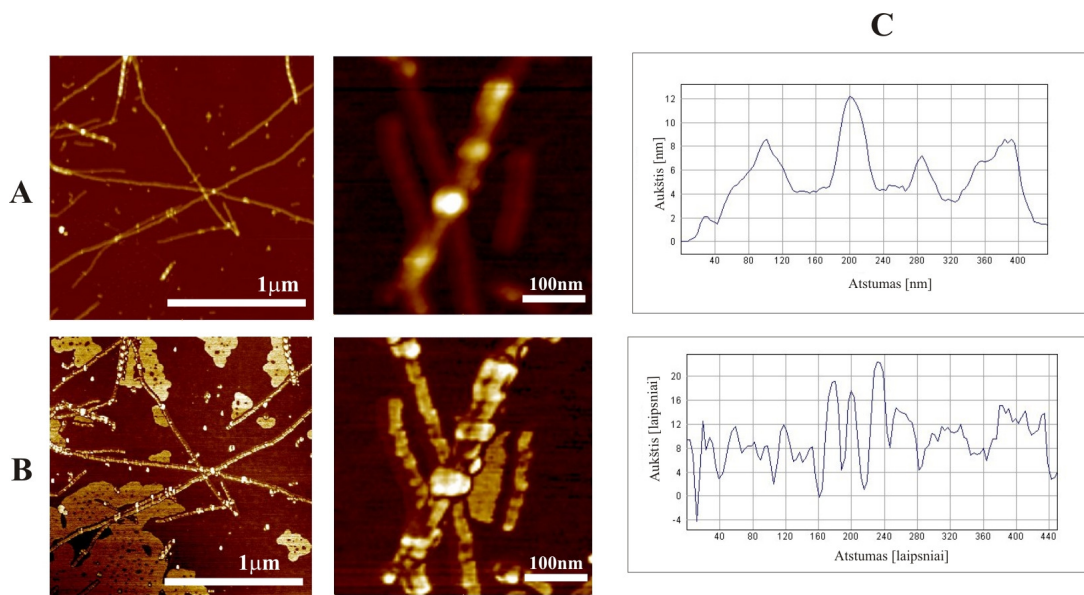
Kai Aβ40 peptidas buvo fibrilinamas kartu su Au nanodalelėmis, susidarė daugiau fibrilių, negu fibrilinant Aβ40 peptidą be Au nanodalelių – fluorescencijos spektras padidėjo apie 3 kartus. Aβ40cys2 peptido atveju taip pat buvo stebima Au nanodalelių įtaka fibrilių formavimuisi. Fibrilinant Aβ40cys2 su Au nanodalelėmis, ThT fluorescencijos spektras padidėjo apie 1,5 karto lyginant su spektru, gautu fibrilinant Aβ40cys2 be Au nanodalelių. Tuo tarpu Aβ40cys39 peptidas formavo mažiau fibrilinių darinių ir aukso nanodalelės neturi įtakos didesnei šio peptido agregacijai. Aukso nanodalelės, pridėtos po fibrilinimo, nedarė įtakos fibrilių formavimui (3.7 pav.).

Tie patys fibrilių mėginiai buvo analizuojami AJM. Paaiškėjo, kad Aβ40cys2 ir Aβ40 fibrilių formuojasi daugiau, kai Au nanodalelių buvo pridėta prieš fibrilinimą. Tuo tarpu Aβ40cys39 peptidas neformavo fibrilinių struktūrų, net kai terpėje buvo Au (3.8 pav.).



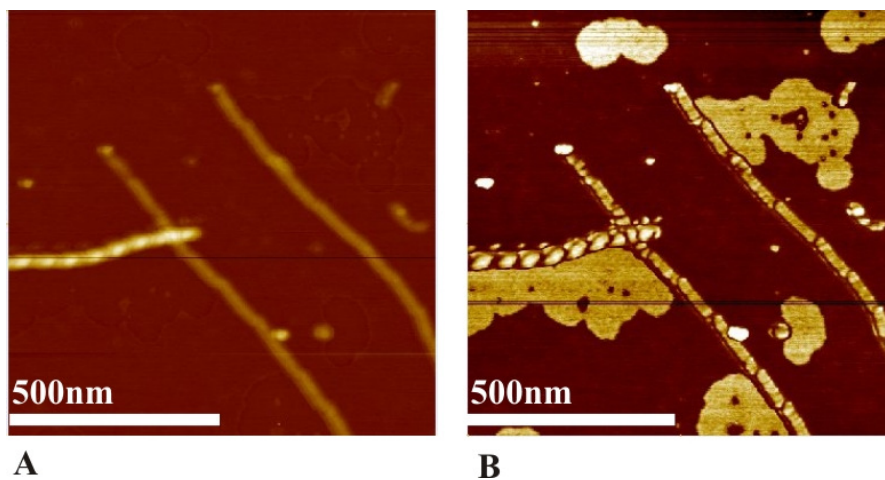
3.8 pav. Au nanodalelių įtaka Aβ40 ir mutantinių Aβ40cy2 bei Aβ40cys39 peptidų agregacijai. *Ex situ* AJM virpančiojo zondo režimu gauti vaizdai, kuriuose (esantys kairėje pusėje) peptidai buvo fibrilinami kartu su Au nanodalelėmis, dešinėje esančiame stulpelyje pateikti vaizdai, kurie gauti iš mėginių, kurie buvo fibrilinami be Au nanodalelių, o pridedama jų po fibrilinimo.

Aβ40cys2 mėginiuose, kurie buvo fibrilinami be Au, o jo pridedama po fibrilinimo, buvo stebimos susidariusios heteromorfinės fibrilės (3.9 pav.), kurios skyrėsi nuo Aβ40 peptido formuojamų fibrilių. Tokių struktūrizuotų fibrilių nebuvo aptikta su Aβ40cys2 fibrilėmis nepridedant Au nanodalelių. Kol kas nenustatyta, kokia šių fibrilių struktūra ir kokie veiksniai lemia šių fibrilių susidarymą.



3.9 pav. Aβ40cys2 fibrilės modifikuotos Au nanodalelėmis po fibrilinimo. Topografinis vaizdas (A), fazinis vaizdas (B), fibrilių profiliai (C).

Be to, buvo stebimos skirtingos morfologijos fibrilės tame pačiame mėginyje (3.10 pav.).

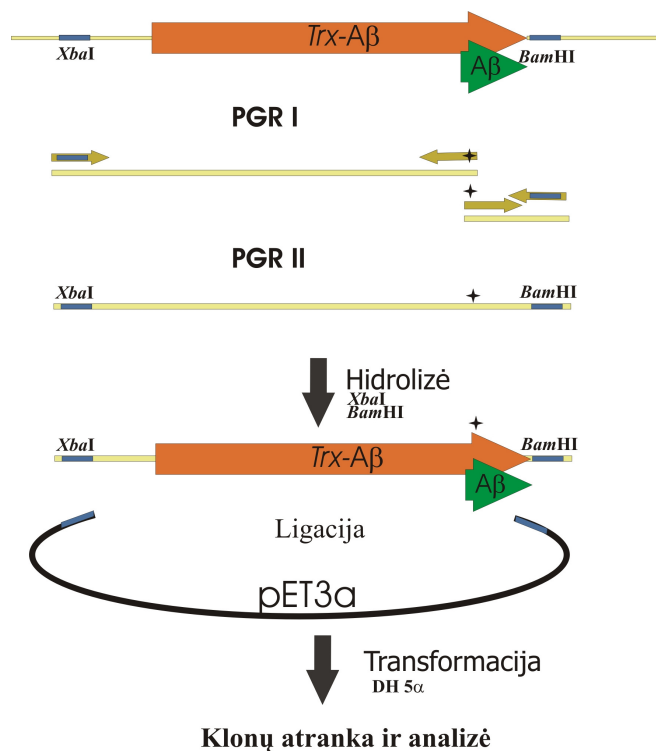


3.10 pav. Aβ40cys2 fibrilės modifikuotos aukso nanodalelėmis viename matymo lauke stebimos dvi skirtingos morfologijos fibrilės. Topografinis vaizdas (A), fazinis vaizdas (B).

Faziniai AFM vaizdai suteikė papildomos informacijos apie fibrilių morfologinius ypatumus (3.10 B pav.). Susidariusios fibrilės yra gana storos ir struktūrizuotos. Jų aukštis siekia iki 12 nm, be to, joms būdingas periodiškumas. Galima atskirti atskirus fibrilių segmentus.

3.1.4. Hibridinio Trx-A β 40 baltymo mutantų konstravimas, raiška ir gryninimas

Yra žinoma, kad A β 42 peptidas jungiasi su hemu (Atamna ir Boyle, 2006). Šioje sąveikoje yra svarbūs trys histidiniai, esantys 6-oje, 13-oje ir 14-oje padėtyse. Norint nustatyti, ar A β 40 taip pat sąveikauja su hemu, hibridinis Trx-A β 40 baltymas buvo naudojamas mutantų, kuriuose A β 40 sekoje esantys histidiniai buvo pakeisti kitomis aminorūgštimis, konstravimui. Mutantiniai sulieto Trx-A β 40 baltymo variantai buvo kuriami kryptingos mutagenzės būdu. Žemiau pateikiama mutantų konstravimo schema (3.11 pav.)



3.11 pav. Hibridinio Trx-A β 40 baltymo mutantų konstravimo schema kryptingos mutagenzės būdu. Žvaigždute pažymėta įvesta mutacija *a β 40* sekoje.

Buvo sukonstruota 10 mutantų. Juose vietoje histidino kodonų, įstatyti alanino, serino arba cisteino kodonai. Žemiau pateikiama lentelė, kurioje nurodyta, kokie mutantiniai baltymai buvo sukonstruoti (Lentelė 3.1):

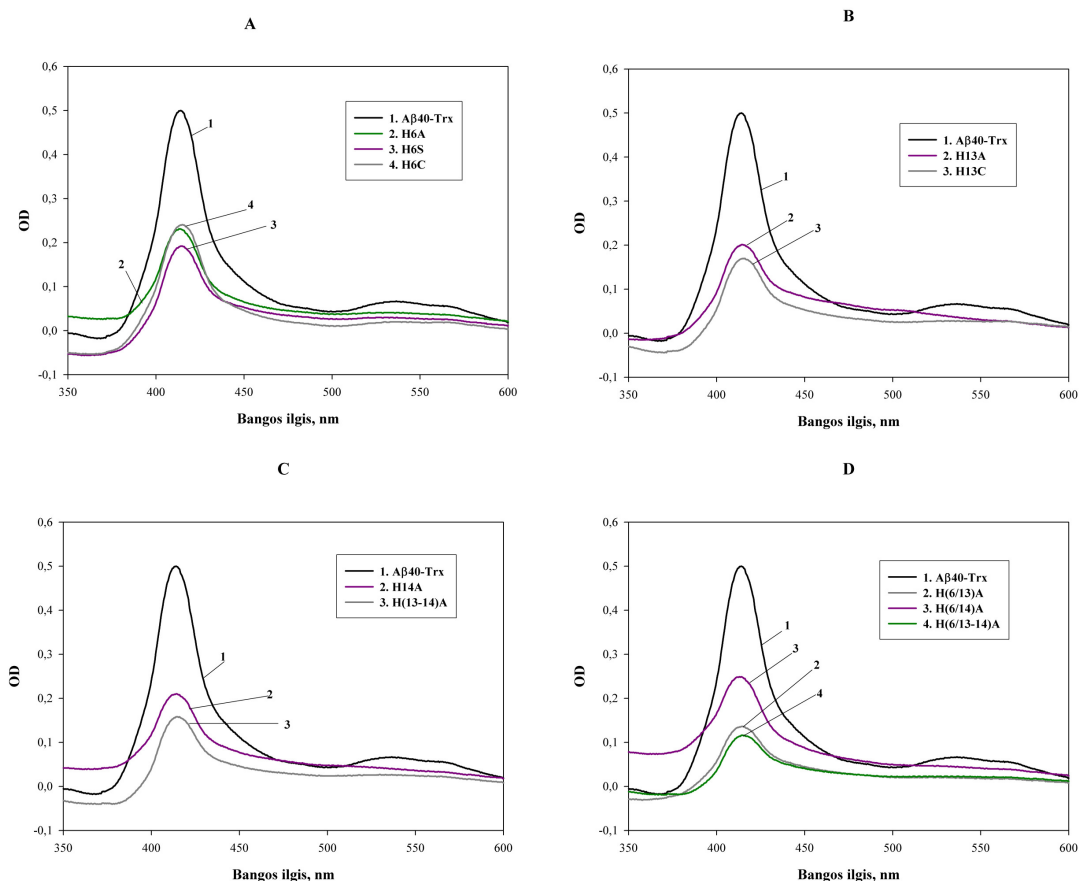
Lentelė 3.1 Kryptingos mutagenezės metodu pakeisti A β 40 sekoje esantys histidinai.

	His kodonas	Pakeistas kodonas	Mutanto pavadinimas
Mutantai			
Viengubas:	6 His	6 Ala	H6A
		6 Ser	H6S
		6 Cys	H6C
	13 His	13 Ala	H13A
		13 Cys	H13C
	14 His	14 Ala	H14A
Dvigubas:	13-14 His	13-14 Ala	H(13-14)A
	6/13 His	6/13 Ala	H(6/13)A
	6/14 His	6/14 Ala	H(6/14)A
Trigubas	6/13-14 His	6/13-14 Ala	H(6/13-14)A

Gauti sulieto Trx-A β 40 baltymo mutantai buvo ekspresuojami ir gryninami kaip ir sulietas Trx-A β 40 baltymas. NDS PAAG analizė parodė, kad visų mutantinių baltymų raiška skyrėsi. Mažiausia raiška buvo stebima trigubo mutanto atveju (duomenys neparodyti). Visi mutantiniai baltymai buvo sintetiniai tarpiniuose kūneliuose, todėl buvo gryninami denatūruojančiomis sąlygomis.

3.1.4.1. Hibridinio Trx-A β 40 baltymo mutantų sąveikos su hemu tyrimas

Sukonstruoti ir išgryninti hibridinio Trx-A β 40 baltymo mutantai buvo naudojami tolesniuose eksperimentuose sąveikai su hemu tirti. Trx-A β 40 (bei jo mutantų) ir hemo sąveika buvo matuojama kambario temperatūroje užrašant spektrą nuo 350–750 nm, esant koncentracijų santykiui 1:1 (galutinė baltymo ir hemo koncentracija buvo 6 μ M). Buvo gauti skirtuminiai spektrai (atimtas buferio su hemu poveikis), kurie rodė skirtingą sąveikos intensyvumą (3.12 pav.).

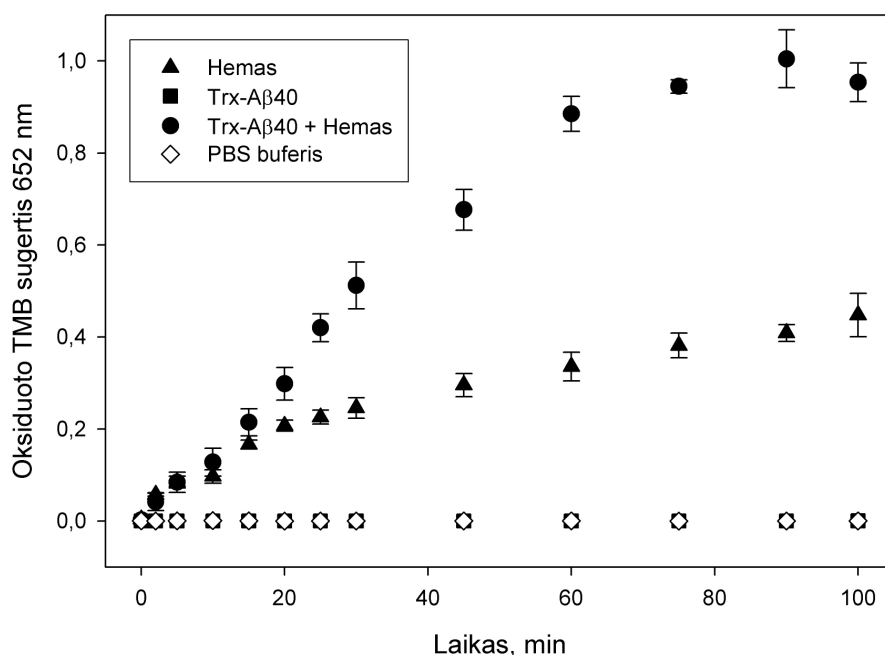


3.12 pav. Skirtuminiai baltymo ir hemo sąveikos spektrai. A. Skirtuminiai viengubų 6 His mutantų spektrai. B. Skirtuminiai viengubų 13 His mutantų spektrai. C. Skirtuminiai viengubų 14 His ir dvigubų 13-14 His mutantų spektrai. D. Skirtuminiai dvigubų 6/13 His ir 6/14 His bei trigubų 6/13-14 His mutantų spektrai.

Spektrai rodo, visi mutantai su hemu jungėsi skirtingu intensyvumu, tačiau bent kelis kartus silpniau negu nemutantinis Trx-A β 40 baltymas. Silpniausia sąveika buvo stebima tarp trigubo mutanto H(6/13-14)A, kuriame visi A β 40 sekoje esantys histidiniai yra pakeisti alaninu, ir hemo. Iš visų mutantų stipriausiai hemą rišo H6A ir H6C mutantai. Iš gautų duomenų, galima daryti išvadą, kad 13-oje ir 14-oje padėtyse esantys histidiniai yra svarbesni sąveikai su hemu, negu 6 His.

Iš literatūros žinoma, kad A β 42-hemo kompleksas pasižymėjo peroksidaziniu aktyvumu (Atamna ir Boyle, 2006). Tai, kad hibridas Trx-A β 40 ir jo mutantai rišo hemą, leido daryti prielaidą, kad galbūt šie baltymai susijungę su hemu irgi gali būti peroksidazėmis ir oksiduoti TMB –

peroksidazės substratą. Oksiduojamas tirpale TMB virsta mėlynos spalvos reakcijos produktu, kurio sugertis užrašoma 652 nm bangoje. Peroksidazinis aktyvumas buvo matuojamas tuoj pat sumaišius reakcijos mišinį ir po to stebima jo priklausomybė nuo laiko. Didžiausias Trx-A β 40 komplekso peroksidazinis aktyvumas buvo stebimas po 90 min. Hemo tirpalas taip pat turėjo nedidelį peroksidazinį aktyvumą (3.13 pav.), o atskirai Trx-A β 40 baltymas peroksidaziniu aktyvumu nepasižymėjo.



3.13 pav. Trx-A β 40+Hemo komplekso peroksidazinio aktyvumo priklausomybė nuo laiko. TMB oksidacija buvo stebima spektrofotometriškai, kaip sugerties padidėjimas 652 nm bangoje. Atliktos trys matavimų serijos. Visuose mėginiuose buvo H₂O₂.

Hemas jungėsi su Trx-A β 40 ir jo mutantais, nors sąveikos intensyvumas skyrėsi. Mutantinių baltymų peroksidazinis aktyvumas buvo žemas (duomenys neparodyti). Tai rodo, kad histidiniai yra svarbūs jungiantis prie hemo sudėtyje esančio geležies atomo. Nors Trx-A β 40 sekoje yra papildomų histidinių: tioredoksino sekoje yra 2 histidiniai, bei 6 histidinių uodega, esanti tarp Trx ir A β 40 (3.1 pav.), tačiau vieno tioredoksino su 6 histidinių uodega sąveika su hemu buvo silpna (rezultatai neparodyti).

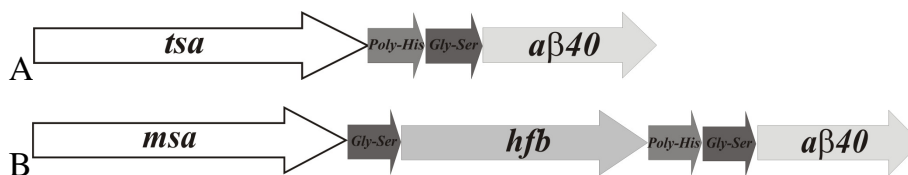
Skirtuminių spektrų rezultatai rodo, kad His aminorūgštys yra svarbios sąveikai su hemu.

3.1.5. Hibridiniai baltymai sudaryti iš A β 40 peptido ir kitų neamiloidinių baltymų

Funkciškumas yra labai svarbi ypatybė konstruojant nanodarinius biomolekulių pagrindu. Amiloidines fibriles formuojantys baltymai ir peptidai yra geri statybiniai subvienetai, sudarantys karkasą ar matricą, ant kurių gali būti imobilizuojamos funkcinės grupės ar baltymai. Kol kas nebuvo aprašyta, kad susiformavusios amiloidinių baltymų fibrilės būtų funkcionalizuojamos. Dažniausiai baltymai ir peptidai yra modifikuojami funkcinėmis grupėmis ar baltymais prieš agreguojant į fibriles. Šiame darbo etape buvo kuriami hibridiniai baltymai A β 40 peptido pagrindu, kur jis tarnautų kaip statybinis subvienetas, o prilietas baltymas būtų funkcinis elementas.

3.1.5.1. Hibridinių A β 40 peptido ir streptavidino bei hidrofobino baltymų konstravimas ir raiška

Sulietų genų konstruktai *tsa-a β 40* ir *msa-hfb-a β 40* buvo chemiškai susintetinti pagal žinomas monomerinio ir tetramerinio streptavidino, hidrofobino ir A β 40 baltymų sekas ir įklonuoti į plazmidinį pUC57 vektorių (3.14 pav.).

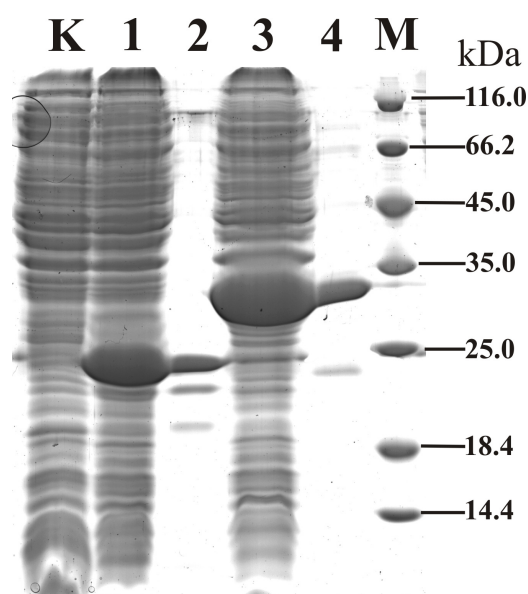


3.14 pav. A. *tsa-a β 40* genų konstruktas, kuris sudarytas iš tetramerinio streptavidino (*tsa*), polihistidininės uodegėlės (*poly-His*), glicino-serino (*Gly-Ser*) jungties ir A β 40 peptidą koduojančio geno, bendras fragmento ilgis 675 bp; B. *msa-hfb-a β 40* genų konstruktas, sudarytas iš monomerinio streptavidino geno (*msa*), dviejų Gly-Ser jungčių, polihistidino uodegėlės (*poly-His*), hidrofobiną (*hfb*) bei A β 40 peptidą koduojančių genų, o bendras ilgis yra 933 bp.

Genų konstruktai *tsa-a β 40* ir *msa-hfb-a β 40* buvo klonuoti atitinkamai į raiškos vektorius pET21d ir pET21b. *E. coli* DH5 α kamienas buvo transformuojamas naujomis plazmidėmis pET21d-*sa-a β 40* ir pET21b-*sa-hfb-*

$a\beta 40$ ir išsėta ant NA terpės su 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilino. Gauti klonai buvo tikrinami PGR reakcija naudojant T7Pro ir T7Ter pradmenis bei atliekant DNR hidrolizę su pasirinktu restrikcijos endonukleazių rinkiniu, be to, DNR sekos patikrinta sekoskaitos metodu.

Hibridinių baltymų indukcija buvo vykdoma kaip aprašyta metodinėje dalyje. Šių hibridinių baltymų raiška buvo tiriama įvairiomis sąlygomis. Auginant 30 °C ir 37 °C temperatūroje, indukuojama, kai OD_{600} buvo 0,6–1,0. Nepriklausomai nuo sąlygų buvo stebima panaši baltymų raiška. Geriausia baltymų raiška buvo stebima auginant ląsteles 30 °C temperatūroje, kol OD_{600} pasiekė 0,8 ir indukuojama su 0,5 mM IPTG 18–20 val. Po indukcijos gauti baltymų ekstraktai buvo analizuojami 15% NDS PAAG, kuriame matyti juostelės, atitinkančios hibridinių baltymų dydžius TSA- $A\beta 40$ 22,72 kDa ir MSA-HFB- $A\beta 40$ 31,86 kDa (3.15 pav.).

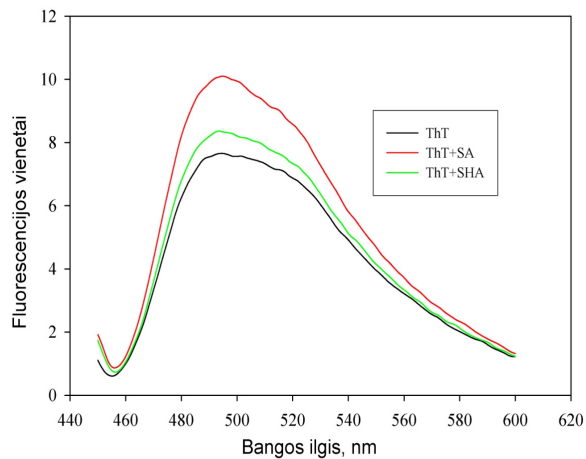


3.15 pav. Hibridinių baltymų raiškos analizė 15% NDS PAAG, TSA- $A\beta 40$ 22,72 kDa ir MSA-HFB- $A\beta 40$ 31,86 kDa. K raide pažymėta kontrolė- BL21 (DE3) kamieno ląstelių ekstraktas, 1-ame takelyje TSA- $A\beta 40$ ląstelių ekstraktas, 2-ame takelyje grynintas TSA- $A\beta 40$ baltymas, 3-ame takelyje MSA-HFB- $A\beta 40$ ląstelių ekstraktas ir 4-ame takelyje MSA-HFB- $A\beta 40$ valytas hibridinis baltymas. M raide pažymėti molekuliniai žymenys.

Kadangi didžioji abiejų hibridinių baltymų dalis yra nuosėdose (intarpiniuose kūneliuose), baltymai buvo gryninami denatūruojančiomis sąlygomis. Abiejų baltymų iš vieno litro buvo galima gauti 7–10 mg gryno baltymo. Po gryninimo baltymai buvo renatūruojami, tačiau laikant ilgesnį laiką tiek TSA- $A\beta 40$, tiek MSA-HFB- $A\beta 40$ krito į nuosėdas, todėl baltymai buvo liofilizuojami.

3.1.5.2. Hibridinių A β 40 peptido ir streptavidino (monomerinio ir tetramerinio) bei hidrofobino fibrilinimas ir susidariusių struktūrų tyrimas

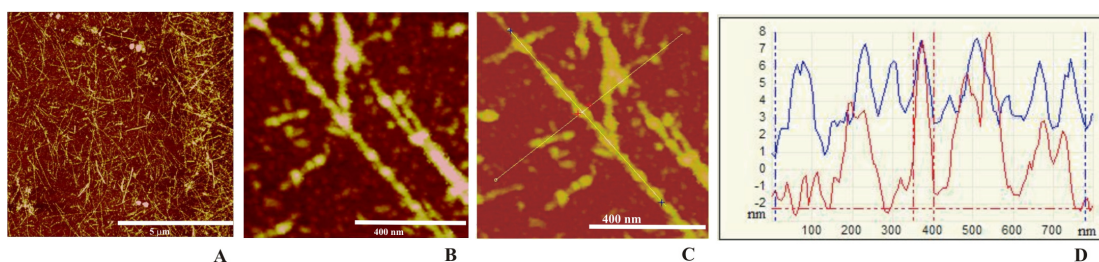
Po gryninimo ir dializės nustatyta baltymo TSA-A β 40 (SA) koncentracija 60 μ M, o MSA-HFB-A β 40 (SHA) – 65 μ M. Prieš fibrilinimą, terpė buvo parūgštinama su 1M HCl iki pH 3,0 ir fibrilinama 57°C, pastoviai kratant 550 apm, 5 dienas. ThT buvo naudojamas įvertinti šių hibridinių baltymų susidariusių fibrilinių struktūrų kiekį. Reakcijai buvo naudojamas 5 μ M ThT tirpalas ir 5 μ M TSA-A β 40 (SA) ir MSA-HFB-A β 40 (SHA) baltymų (3.16 pav.).



3.16 pav. ThT fluorescencijos spektrai su hibridinių TSA-A β 40 (SA) ir MSA-HFB-A β 40 (SHA) baltymų fibrilėmis, gautomis fibrilinant rūgštinėmis sąlygomis.

Fluorescencijos spektrai rodo, kad TSA-A β 40 (SA) hibridinis baltymas yra labiau linkęs formuoti fibriles nei MSA-HFB-A β 40 (SHA) tomis pačiomis sąlygomis. Susiformavusios fibrilinės struktūros buvo įvertinamos vizualiai, pritaikant virpančiojo zondo režimo AJM. Matomos struktūrinės ypatybės ir fibrilių aukštis, darant skersinį pjūvį, yra pagrindiniai parametrai vertinant AJM vaizdus.

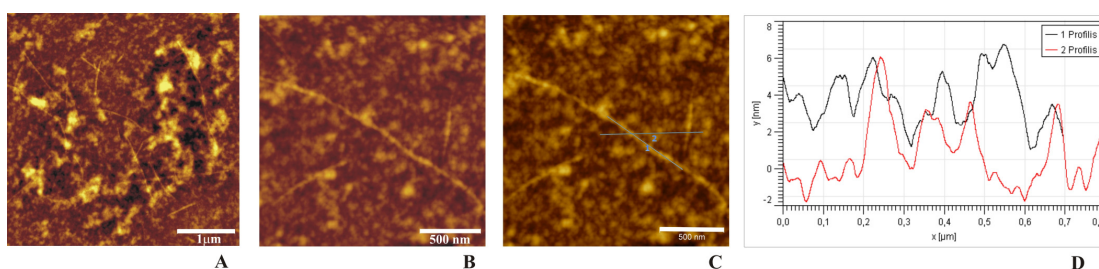
Nustatyta, kad esant pH 3,0 ir fibrilinant 57 °C temperatūroje SA formuoja heteromorfines susisukusios vijos fibriles, kurių aukštis vidutiniškai yra apie 5,5 nm (3.17 pav.).



3.17 pav. TSA-A β 40 (SA) baltymo fibrilių AJM vaizdai. Didesnio lauko topografinis vaizdas (A), fazinis vaizdas (B), topografinis vaizdas (C), ir skersinio ir išilginio fibrilės pjūviai (D). Mastelis ir profiliai pažymėti baltais brūkšneliais.

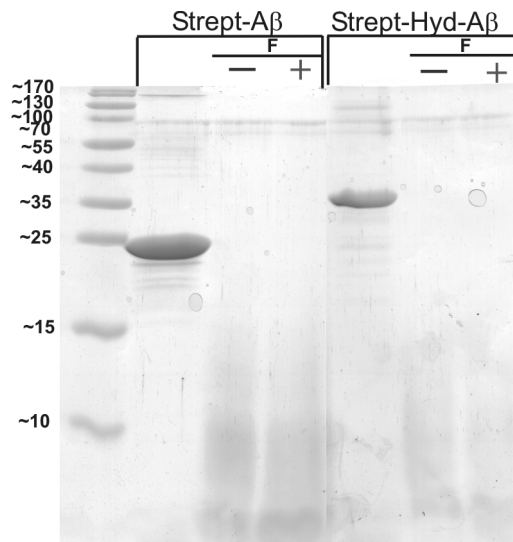
Literatūroje minima, kad A β 40 peptido formuojamų fibrilių aukštis siekia nuo 3,5 nm iki 13 nm priklausomai nuo fibrilinimo sąlygų. Fibrilinant A β 40 tokiomis pačiomis sąlygomis formuojasi įvairaus aukščio fibrilės (3,5–9 nm), tačiau hibridinio baltymo fibrilės yra labiau struktūrizuotos.

Gauti hibridinio SHA baltymo AJM vaizdai patvirtina rezultatus, gautus su ThT. SHA baltymas geba formuoti fibriles, bet jų yra nedaug palyginus su SA baltymu. Šis hibridas yra labiau linkęs formuoti amorfinius agregatus. Be to, šis baltymas tirpale labai greitai išsėda į nuosėdas. Jo sudėtyje esantis hidrofobinas daro įtaką baltymo tirpumui, tačiau fibrilių aukštis panašus kaip ir SA formuojamo baltymo (~5 nm) (3.18 pav.)



3.18 pav. MSA-HFB-A β 40 (SHA) baltymo fibrilių AJM vaizdai. Didesnio lauko topografinis vaizdas (A), fazinis vaizdas (B), topografinis vaizdas (C), ir skersinio ir išilginio fibrilės pjūviai (D). Mastelis ir profiliai pažymėti baltais brūkšneliais.

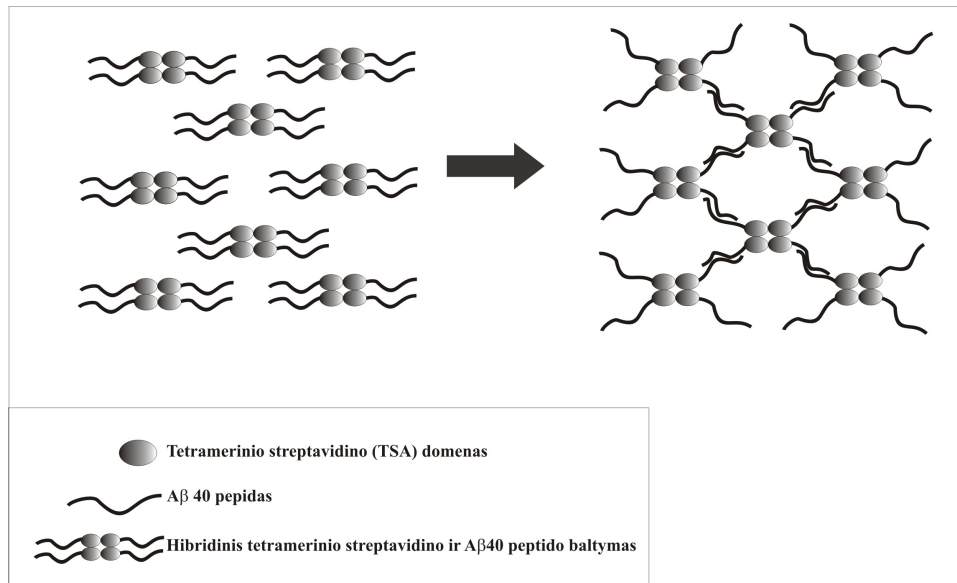
Fibrilių mėginiai buvo analizuojami ir 15 % NDS PAAG. Rezultatai rodo, kad esant tokioms rūgštinėms sąlygoms (pH 3,0), hibridiniai baltymai skyla į skirtingo dydžio fragmentus, kuriuos, galbūt, sudaro A β 40 peptidas ir įvairaus dydžio streptavidino fragmentai bei streptavidino ir hidrofobino fragmentai (3.19 pav.).



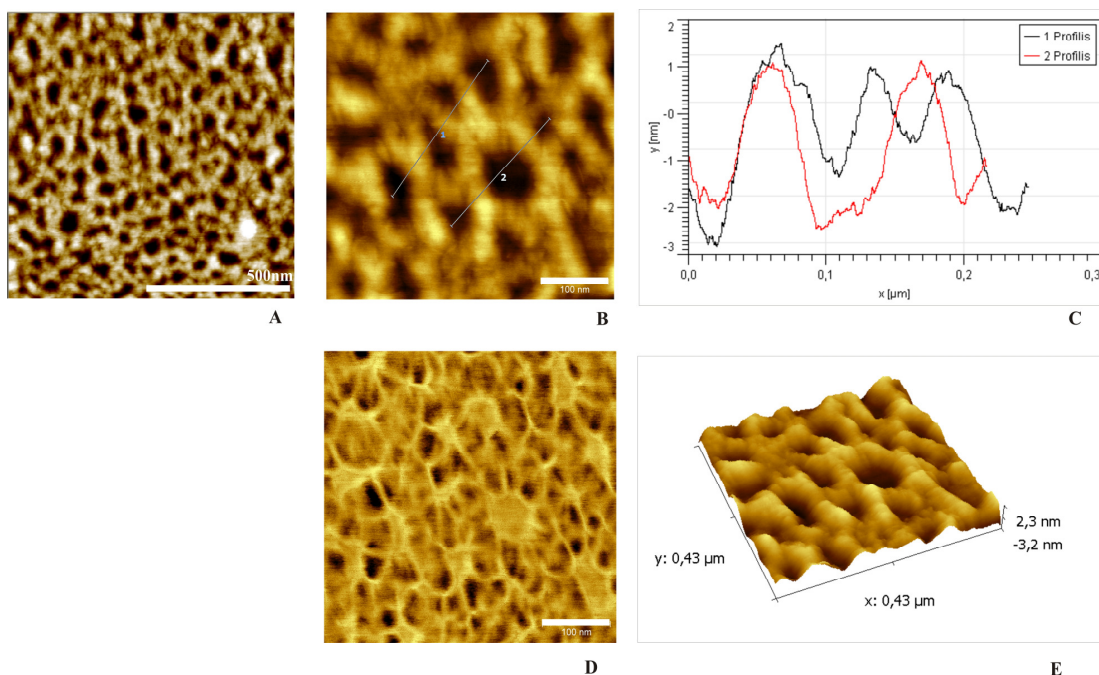
3.19 pav. Hibridinių SA (Strept-A β) ir MSA-HFB-A β 40 (Strept-Hyd-A β) baltymų formuojamų fibrilių vaizdas 17% NDS PAAG. „F” raide nurodomi fibrilinti mėginiai, „+” – kaitintas mėginys, „-” – nekaitintas mėginys.

Tokios iš hibridinių SA ir SHA baltymų fragmentų sudarytos fibrilės nėra tinkamos baltymų modifikavimui. Streptavidinas, kuris turi atlikti savo funkciją, turi būti aktyvus, t.y. būti pilnos sudėties.

Pakeitus fibrilinimo sąlygas – fibrilinant 10 mM Na-acetatiname buferyje pH 4,6, SA baltymas formavo fibriles ir išliko stabilus pilno ilgio baltymas. Be to, naudojant biotiną sujungtą su stilbazolio fluoroforu, buvo nustatyta, kad tetramerinis streptavidinas yra aktyvus, t.y. gali rišti biotiną. Fibrilės sudarė panašią į tinklą struktūrą (3.20 pav.). Fibrilinių gijų, sudarančių tinklą aukštis nuo 2,5–4,5 nm. Jei tetramerinis streptavidinas įgyja savo funkcinę konformaciją, tada po fibrilinimo galėtų susidaryti panaši į tinklą struktūra (3.21 pav.).



3.20 pav. Galimas hibridinio SA baltymo tinklo struktūros susidarymo modelis. Streptavidinas yra tetramerinis baltymas, kuris esant tinkamoms sąlygoms gali formuoti tetramerą, kuris turėtų po 4 Aβ40 peptido uodegas. Aβ40 peptidai agreguodami sudarytų fibrilines sąsajas tarp streptavidino baltymų.



3.21 pav. Hibridinio Streptavidino-Aβ40 (SA) baltymo AFM vaizdai. A – bendras topografinis vaizdas, B ir C – skersinio pjūvio profiliai, D – fazinis vaizdas, E – trimatis fibrilinių struktūrų vaizdas. Mastelis pažymėtas baltu brūkšneliu.

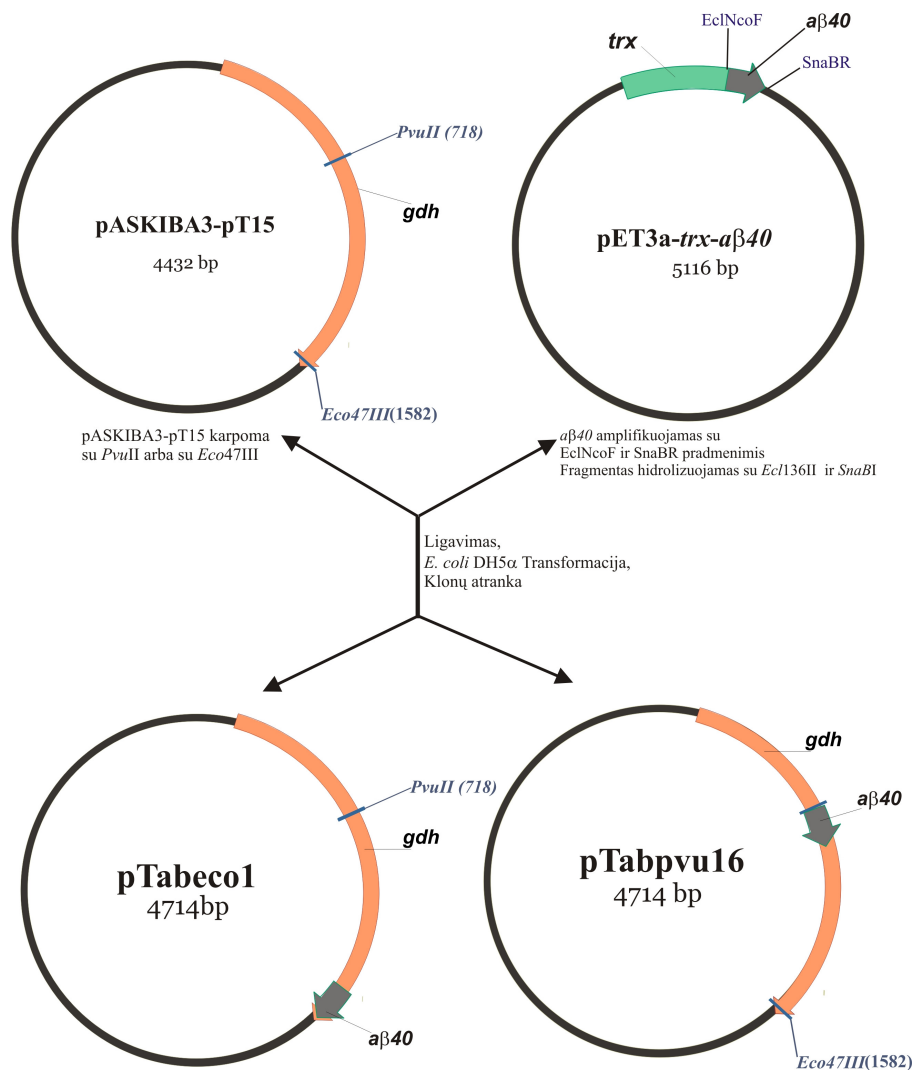
Galima fibrilių tinklo struktūra pasižymi ortogonaline simetrija, tačiau AJM vaizduose ši simetrija nėra stebima. Tai gali būti paaiškinama tuo, kad tinklas susidaro iš kelių sluoksnių fibrilių, kurios persidengia.

Literatūroje buvo minima, kad amiloidinės fibrilės gali būti puiki imobilizuojanti matrica įvairiems fermentams ar baltymams. Tokia susidariusi tinklinė struktūra būtų labai tinkama kaip imobilizuojanti medžiaga, tačiau reikalingi tolimesni tyrimai šios struktūros panaudojimo galimybių įvertinimui.

3.1.6.1. Hibridinio nuo PQQ priklausomos GDH iš *Acinetobacter sp.* ir A β 40 peptido baltymo konstravimas ir raiška

Gliukozės dehidrogenazė (GDH) iš *Acinetobacter calcoaceticus* yra klasikinis chinoproteinas, savo sudėtyje turintis pirolochinolino chinono kofaktorių (PQQ). Šiuo metu GDH yra naudojama kaip elektrocheminių gliukozės jutiklių komponentas (Tanaka ir kt., 2005, Hamamatsu ir kt., 2006).

GDH genas iš *Acinetobacter sp.* PT15 buvo klonuotas plazmidėje pASKIBA3-PT15. *Eco47III* restrikcijos endonukleazės atpažinimo vieta (GDH C galą koduojančioje sekoje) ir *PvuII* atpažinimo vieta (ši geno dalis koduoja baltymo kilpą, kuri susidaro šalia GDH aktyvaus centro) buvo pasirinktos A β 40 peptidą koduojančio geno įterpimui. Buvo gautos dvi plazmidės: pPTabpvu16, kurioje *a β 40* genas buvo klonuotas į *PvuII* atpažinimo vietą, ir pPTabeco1, kurioje *a β 40* genas buvo klonuotas į *Eco47III* atpažinimo vietą. Gauti konstruktai buvo patikrinti, nustatant jų nukleotidų seką. Klonavimo schema pateikta žemiau (3.22 pav.).

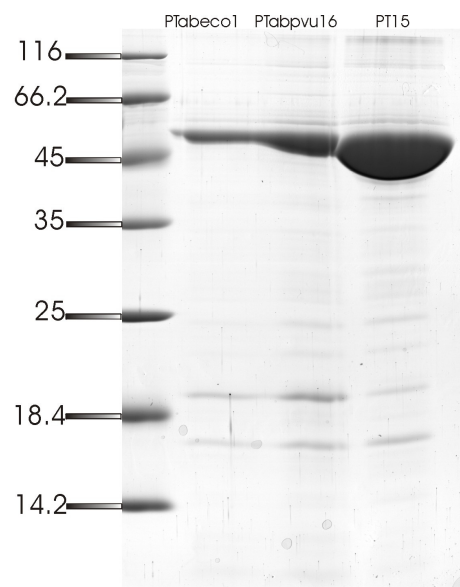


3.22 pav. *gdh* (gliukozės dehidrogenazės) geno suliejimo su *aβ40* (amiloido β peptido) genu schema. Rodyklėmis pažymėtos genų kryptys. *aβ40* skaitymo rėmelis pažymėtas pilka rodykle, gliukozės dehidrogenazės – oranžine.

Gautais konstruktais buvo transformojamas *E. coli* DH5a kamienas ir vykdoma baltymo ekspresija.

Geriausia baltymo ekspresija buvo stebima, kai ląstelės buvo auginamos skystoje NB terpėje 30 °C aeruojant. Indukcija buvo vykdoma po 6 val., kai OD₆₀₀ pasiekė 1,0, tada terpė buvo atvėsinama iki 25 °C ir buvo indukuojamas promotorius su anhidrotetraciklinu (AHT) 20 val. 25 °C. Ląstelių biomasė buvo surenkama centrifuguojant, ląstelės suspenduojamos 50 mM Tris-HCl buferyje, pH 8,0 ir suardoma ultragarsiniu dezintegratoriumi. Hibridiniai baltymai buvo gryninami naudojant jonų mainų

chromatografiją (CM FF kolonėlę), dializuojami 20 mM amonio karbonatiniame buferyje ir liofilizuojami (3.23 pav.).



3.23 pav. Hibridinių GDH-A β 40 (PTabeco1 ir PTabpvu16) baltymų raiškos elektroforetinis vaizdas 15% NDS PAAG. Baltymai išgryninti jonų mainų chromatografijos metodu.

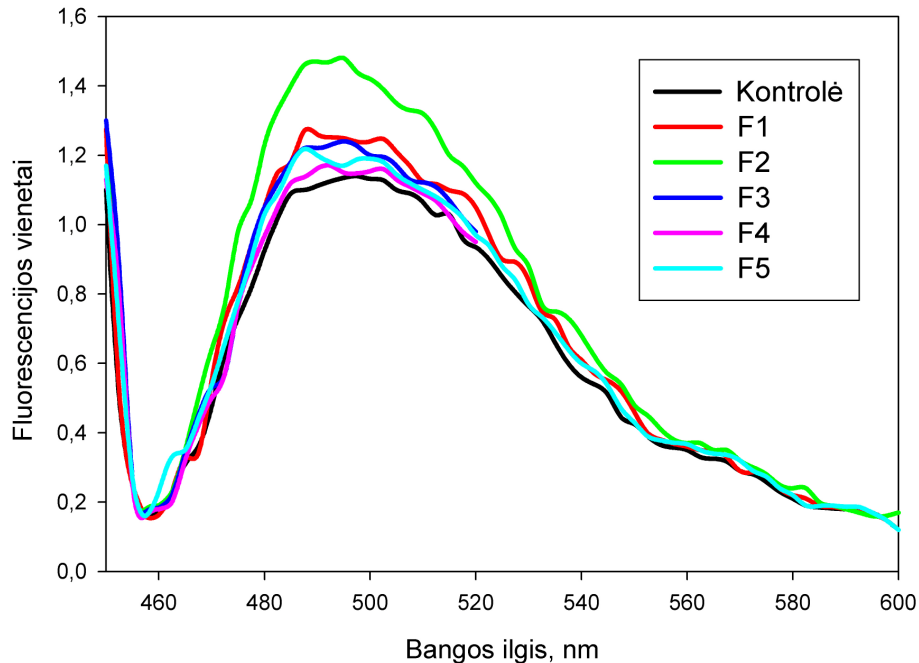
GDH-A β 40 (PTabeco1 ir PTabpvu16) baltymų raiška buvo mažesnė lyginant su laukinio tipo GDH baltymu. NDS PAAG matomos juostelės atitinka baltymų teorinius dydžius (GDH dydis yra 54,2 kDa, GDH-A β 40 dydis 58 kDa).

3.1.6.2. Hibridinių baltymų, sudarytų iš A β 40 peptido ir nuo PQQ priklausomos dehidrogenazės iš *Acinetobacter sp.*, fibrilinimas ir susidariusių struktūrų tyrimas

Liofilizuotas PTabeco1 baltymas, kuriame A β 40 peptidas sulietas su nuo PQQ priklausoma GDH, buvo ištirpintas 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 buferyje, hibridinio baltymo koncentracija tirpale 1 ir 5 mg/ml. Šis baltymas yra taip sukonstruotas, kad A β 40 peptidas yra GDH baltymo C gale. Kaip kontrolė buvo fibrilinama ir A β 40 peptidas, kurio koncentracija tirpale 2 mg/ml. Fibrilių formavimui buvo naudojama:

1. A β 40 peptidas 2 mg/ml (F1)
2. A β 40 peptidas 2 mg/ml su PTabeco1 1 mg/ml (F2)
3. PTabeco1 1 mg/ml (F3)
4. PTabeco1 5 mg/ml (F4)
5. PTabeco1 5 mg/ml, pH 2 (F5)

Šie baltymų mėginiai buvo fibrilinami savaite. Susidariusių fibrilių įvertinimui, buvo matuojamas ThT fluorescencijos padidėjimas. Fibrilių mėginiai buvo inkubuojami su 5 μ M ThT 10 min kambario temperatūroje (3.24 pav.).



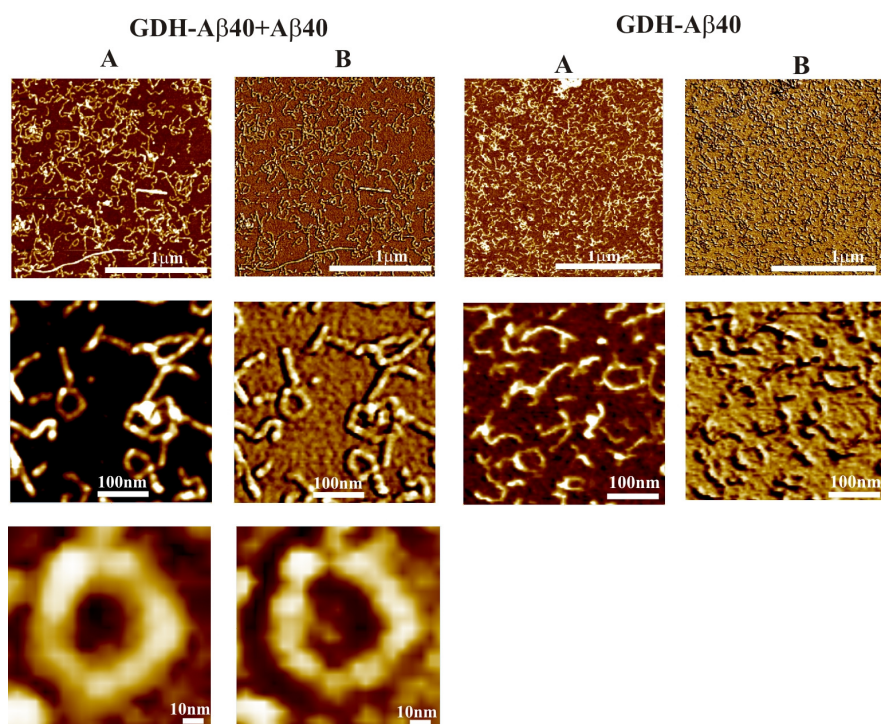
3.24 pav. ThT fluorescencijos spektrai su hibridinių baltymų, sudarytų iš A β 40 peptido ir nuo PQQ priklausomos dehidrogenazės iš *Acinetobacter* sp., reakcija su ThT. F1 – A β 40 peptidas 2 mg/ml (pH 7,0), F2 – A β 40 2 mg/ml su pTabeco1 1 mg/ml (pH 7,0), F3 – pTabeco1 1 mg/ml (pH 7,0), F4 – pTabeco1 5 mg/ml (pH 7,0), F5 – pTabeco1 5 mg/ml (pH 2,0), Kontrolė – ThT tirpalas be baltymų.

Intensyviausiai švytėjo F2 pavyzdys, kuriame buvo A β 40 peptidas ir hibridinis A β 40 ir GDH baltymas (pTabeco1). Kitų mėginių silpna sąveika su ThT parodė, kad yra susidarę nedaug β -klostinių struktūrų. Šie mėginiai buvo fibrilinami ilgesnį laiką. Literatūroje minima, kad fibrilinant baltymus ar peptidus dažnai naudojamos A β 40 fibrilės, kurios tarnauja kaip „sėklos“ greitesnei fibrilizacijai (Krebs ir kt., 2006).

A β 40 ir nuo PQQ priklausomos GDH iš *Acinetobacter* sp. fibrilių mėginiai buvo tiriami ir AJM *ex situ* virpančiojo zondo režimu po inkubavimo +4 $^{\circ}$ C temperatūroje 6 mėnesius. Gauti vaizdai rodo, kad GDH-A β 40

(pTabeco1) hibridinis baltymas, kuriame A β 40 yra įstatytas GDH baltymo C gale ir GDH-A β 40 (pTabpvu) hibridinis baltymas, kuriame A β 40 peptidas įstatytas GDH baltymo viduryje formuoja skirtingos morfologijos fibriles (3.25 pav. ir 3.26 pav.). Fibrilinant A β 40 peptidą ir hibridinius streptavidino ir A β 40 baltymus, fibrilės stebimos jau po kelių dienų. GDH ir A β 40 hibridinių baltymų fibrilių formavimas yra nuo laiko priklausantis procesas.

Kai hibridiniai baltymai GDH-A β 40 (pTabeco1) buvo fibrilinami kartu su A β 40 peptidu, buvo gaunamos struktūrizuotos fibrilės, skirtingai nuo paprastų lygių ir nešakotų A β 40 fibrilių. Be to, hibridinių baltymų fibrilės yra storesnės ir trumpesnės, gali būti šakotos, bei sudaro žiedines struktūras, kurių aukštis 3,5-5 nm (3.25 pav.). GDH-A β 40 (pTabeco1) fibrilinamas tomis pačiomis sąlygomis, tik nenaudojant A β 40 peptido kaip „sėklos“, buvo stebimos plonos laužytų žiedelių formos fibrilės (3.25 pav.). Fibrilių struktūrų aukštis ~ 5 nm. Patikrinus šiuos mėginius NDS PAAG, nustatyta, kad didesnę dalis baltymų degradavo į mažesnius fragmentus.

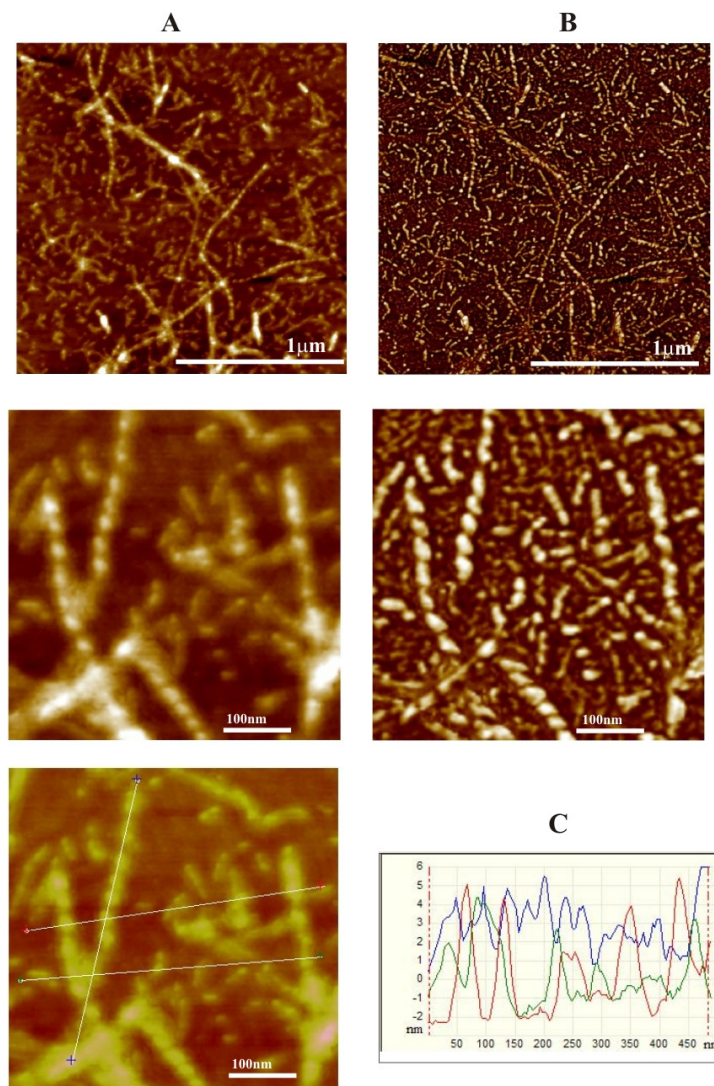


3.25 pav. Hibridinių GDH-A β 40 (pTabeco1), kur A β 40 peptidas yra įstatytas GDH baltymo C gale, fibrilinės struktūros. Topografinis vaizdas (A), fazinis vaizdas (B). GDH-A β 40+A β 40 – mėginiai, kuriuose hibridinis baltymas buvo

fibrilinamas su A β 40 peptidu („sėklomis“). Mastelis pažymėtas baltu brūkšneliu.

Gautos fibrilinės struktūros labai skiriasi nuo A β 40 formuojamų fibrilių. NDS PAAG analizė parodė, kad inkubuojant baltymų mėginius ilgą laiką, jie degradavo. Todėl susiformavusios fibrilės gali būti sudarytos iš GDH baltymo fragmentų ir A β 40 peptido.

GDH-A β 40 (pTabpvu16), kur A β 40 peptidas įstatytas GDH baltymo viduryje, formavo kitokios morfologijos fibriles, nei prieš tai minėti GDH-A β 40 (pTabeco1) hibridiniai baltymai. Šie mėginiai taip pat buvo inkubuojami 4 °C 6 mėn.

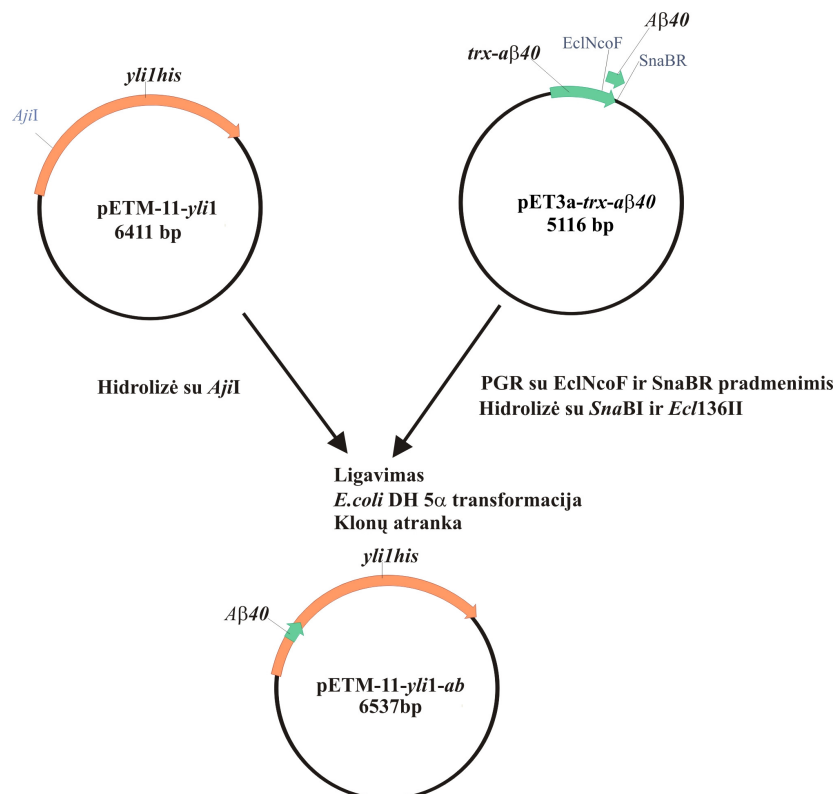


3.26 pav. Hibridinio GDH-A β 40 (pTabpvu), kur A β 40 peptidas įstatytas GDH baltymo viduryje, baltymo fibrilės po 6 mėn. Topografinis vaizdas (A), fazinis vaizdas (B), fibrilių skersiniai profiliai (C).

GDH-A β 40 (pTabpvu16) suformuotos struktūros buvo panašios į susuktos virvės pavidalo fibriles, kurių aukštis 5–7 nm. Analizuojant šiuos baltymus NDS PAAG, nustatyta, kad jie taip pat degradavo į mažesnius fragmentus.

3.1.7. Hibridinio PQQ-GDH iš *E. coli* ir A β 40 peptido baltymo konstravimas ir raiška

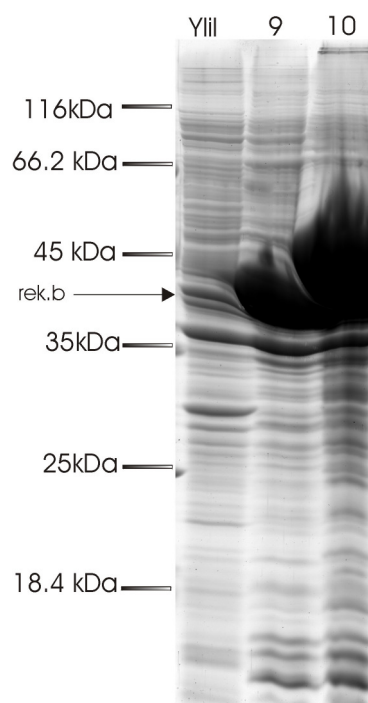
Plazmidėje pET-11M-yli1 klonuotas *E. coli* gliukozės dehidrogenazės genas. Analizuojant *gdh* geno seką, nustatyta tik viena restrikcijos endonukleazės *AjiI* hidrolizės vieta, kuri buvo tinkama *a β 40* geno įterpimui. *a β 40* genas buvo padaugintas nuo plazmidės pET3a-trx-ab40 su pradmenimis *EclNcoF* ir *SnaBR*. Gautas 120 bp fragmentas buvo hidrolizuotas *Ecl136II* ir *SnaBI* restrikcijos endonukleazėmis ir klonuotas į pETM-11-yli1 plazmidę per *AjiI* kirpimo vietą. Klonavimo schema pavaizduota žemiau (3.27 pav.).



3.27 pav. Hibridinio nuo PQQ priklausomos GDH iš *E.coli* ir A β 40 peptido baltymo konstravimas.

Po *E. coli* transformacijos ir atrankos buvo gautos 2 plazmidės pyliab9 ir pyliab10, kuriose yra sulieti GDH-A β 40 baltymų genai.

Baltymų raiškai tirti buvo parinktos tokios auginimo sąlygos: *E. coli* BL21 (DE3) kamienas buvo transformuojamas tiriamomis plazmidėmis. Geriausios baltymų raiškos sąlygos buvo auginant ląsteles 30 °C temperatūroje, iki OD₆₀₀ pasiekė 0,8 ir indukuojama su 0,5 mM IPTG 4 val. 30 °C temperatūroje. Suardžius ląsteles ir atskyrus ekstraktą nuo ląstelių nuolaužų bei išanalizavus juos NDS PAAG, nustatyta, kad rekombinantiniai hibridiniai baltymai buvo sintetinami intarpiniuose kūneliuose (3.28 pav.). Dėl to, hibridiniai baltymai buvo gryninami denatūruojančiomis sąlygomis.



3.28 pav. Hibridinių GDH-A β 40 (Yliab9 ir Yliab10) baltymų raiškos tyrimas 15 % NDS PAAG.

Nuo PQQ priklausoma GDH iš *E. coli* yra mažesnis baltymas nei GDH iš *A. calcoaceticus*. Priešingai nei GDH iš *A. calcoaceticus* ir A β 40 hibridas (PTabeco1 ir PTabpvu16), šio hibridinio baltymo YliI ir A β 40 (Yliab9 ar Yliab10) raiška buvo žymiai didesnė nei laukinio tipo YliI.

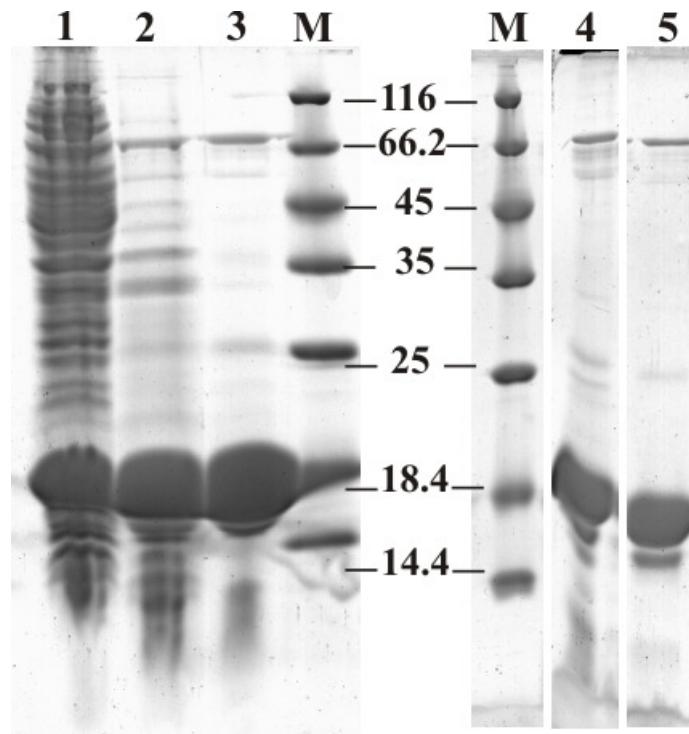
Tiriant A β 40 ir GDH iš *E. coli* (YliI) hibridinio baltymo fibrilių formavimąsi, nustatyta, kad minėtomis rūgštinėmis ir neutraliomis sąlygomis šis baltymas neformuoja fibrilinių struktūrų.

3.2.1. MUTANTINIO α -SYNCYS141 KONSTRAVIMAS, RAIŠKA IR GRYNINIMAS

α -Sinukleinas (α -Syn) yra nedidelis baltymas, kuris taip pat gali būti naudojamas konstruojant nanodarinius.

Šiame darbo etape pagrindinis tikslas buvo sukonstruoti α -Syncys141 mutantą ir jį modifikuoti. α -Syn C galas yra nestruktūrizuotas, todėl buvo įvesta papildoma aminorūgštis – cisteinas, per kurio tiolinę grupę galima prijungti funkcinės dalis. Mutantinio α -Syncys141 konstravimui buvo naudojama plazmidė pRK172 ir SynF ir SynCysR pradmenys. Su pastaruosiu įvedamas papildomas nukleotidų tripletas, koduojantis cisteiną. Gautas PCR produktas buvo hidrolizuojamas restrikcijos endonukleazėmis *Xba*I ir *Xho*I ir klonuojamas į pET21a ekspresijos vektorių per *Xba*I ir *Xho*I taikinius. Gauti klonai su plazmide pET21a-syncys buvo patikrinami PGR reakcija ir restrikcijos endonukleazių deriniu. Šio mutantinio baltymo ekspresijai buvo naudojamas *E. coli* BL21(DE3) kamienas. α -Syn ir α -Syncys baltymai buvo ekspresuojami ir gryninami vienodomis sąlygomis.

Geriausia abiejų baltymų raiška buvo gauta, auginant ląsteles 37 °C iki OD₆₀₀ pasiekia 0,8 ir indukuojama su 0,2 mM IPTG, tada auginama 4 val. 30 °C. Surinkta ir suardyta ląstelių biomasė buvo pakaitinama 100 °C. α -Syn yra labai termostabilus baltymas (Recchia ir kt., 2004), todėl ši savybė išnaudojama jo gryninimo procese. Skysta baltymų frakcija buvo atskiriama nuo įnuosėdas iškritusių baltymų centrifuguojant. α -Syncys kaip ir α -Syn yra termostabilus, todėl išliko skystoje frakcijoje, o didžioji dalis ląstelės baltymų denatūravo ir iškrito įnuosėdas. Baltymų ekstraktai buvo užnešami ant Q XL 1 ml kolonos. Pakartotinis gryninimas buvo vykdomas ANX kolonėlėje. Po gryninimo, 15 % NDS PAAG buvo stebimos apie 18 kDa dydžio juostelės (3.29 pav.). Teorinė α -Syn molekulinė masė yra 14,46 kDa, manoma, kad α -Syn/ α -Syncys141 rūgštinis C galas silpnai jungiasi su NDS (Giehm ir kt., 2011), todėl baltymai migruoja ties 18 kDa. Iš vieno litro kultūros buvo gaunama apie 15 mg α -Syn arba α -Syncys141 baltymo.



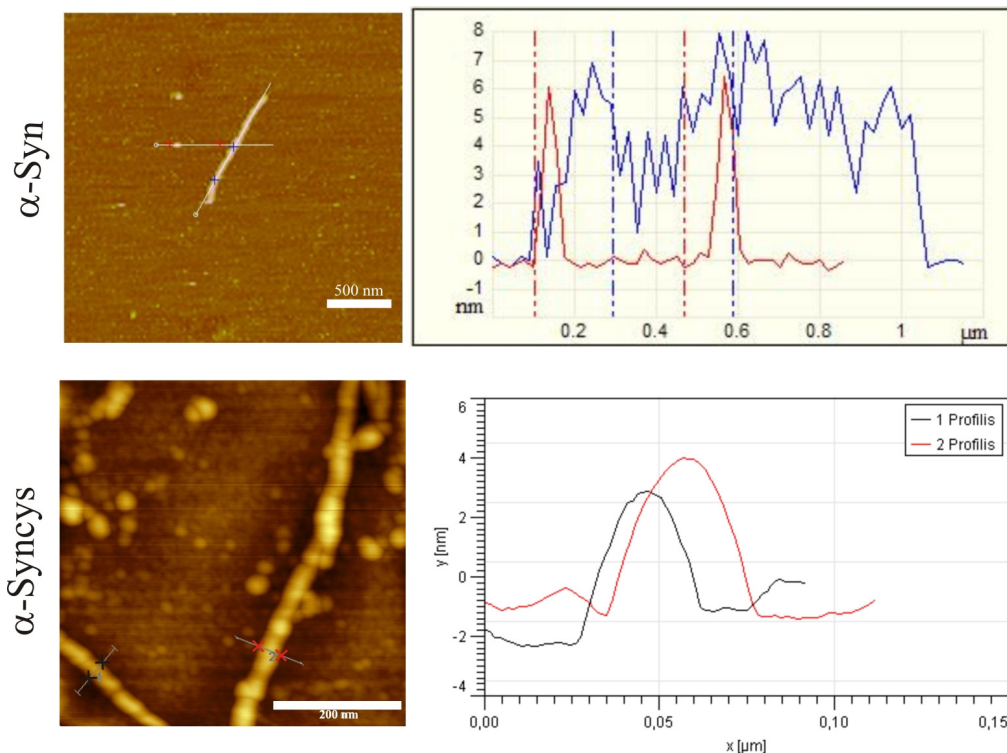
3.29 pav. α -Syncys141 baltymo gryninimo etapų elektroforetinis vaizdas. 1-ame takelyje baltymų ekstraktas, 2-ame takelyje α -Syncys baltymo ekstraktas po pakaitinimo 100 °C, 3-ame ir 4-ame takelyje baltymas po gryninimo Q XL kolonėlėje, 5-ame takelyje baltymas po papildomo gryninimo su ANX kolonėle. M raide pažymėtas molekulinis žymuo.

Po baltymų gryninimo paaiškėjo, kad įvedus papildomą aminorūgštį – cisteiną, α -Syncys141 baltymas buvo toks pat termostabilus kaip ir α -Syn baltymas ir sintetinosi panašus kiekis baltymo kaip ir α -Syn.

3.2.2. Mutantinio α -Syncys141 baltymo β -klostinių struktūrų formavimosi tyrimas

Tai, kad α -Syn gali formuoti fibrilines struktūras, jau yra žinoma. Buvo įdomu, ar α -Syncys141 gali formuoti fibriles ir kuo jos skiriasi nuo α -Syn baltymo formuojamų fibrilinių darinių, ir ar susidariusios α -Syncys141 mutantinio baltymo fibrilinės struktūros gali būti naudojamos modifikavimui.

Buvo pabandyta fibrilinti sinukleinus rūgštiniame pH (100 mM glicino-HCl pH 2,7). Nustatyta, kad esant šioms sąlygoms, α -Syn ir α -Syncys141 baltymai degraduoja į mažesnius fragmentus, tačiau fibrilės formuojasi (3.30 pav.).



3.30 pav. α -Syn ir α -Syncys141 fibrilių, gautų rūgštinėmis sąlygomis (pH 2,7), topografiniai vaizdai ir jų profiliai.

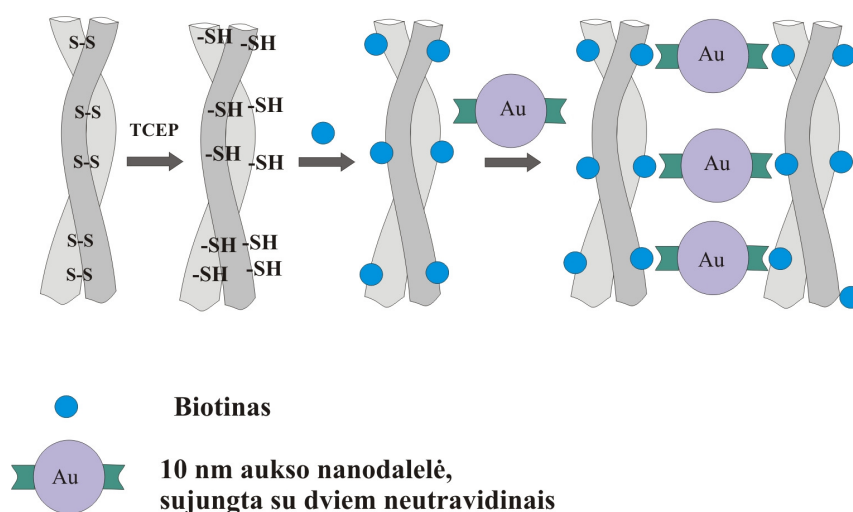
AJM gautuose vaizduose buvo stebimos skirtingos morfologijos fibrilės. α -Syn formuoja ilgas, nešakotas struktūras, kurių aukštis 5–8 nm. α -Syncys141 fibrilės struktūrizuotos, o jų aukštis 4,5–7 nm.

3.2.3. Mutantinio α -Syncys141 baltymo fibrilinių struktūrų modifikavimas

Esant neutralioms sąlygoms (baltymo koncentracija 360 μ M, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 100 mM NaCl, 37 °C, kratant 5 dienas 500 apm (pagal Luk ir kt., 2009) buvo gautos α -Syncys141 fibrilės, kurios sudarytos iš pilno ilgio baltymo, o ne iš jo fragmentų. Šiame darbo etape fibrilės, sudarytos iš baltymo su cisteino radikalu, buvo naudojamos tolimesnėms modifikacijoms. Pirmiausiai, susidariusios fibrilės buvo kiekybiškai įvertintos pagal ThT fluorescencijos padidėjimą.

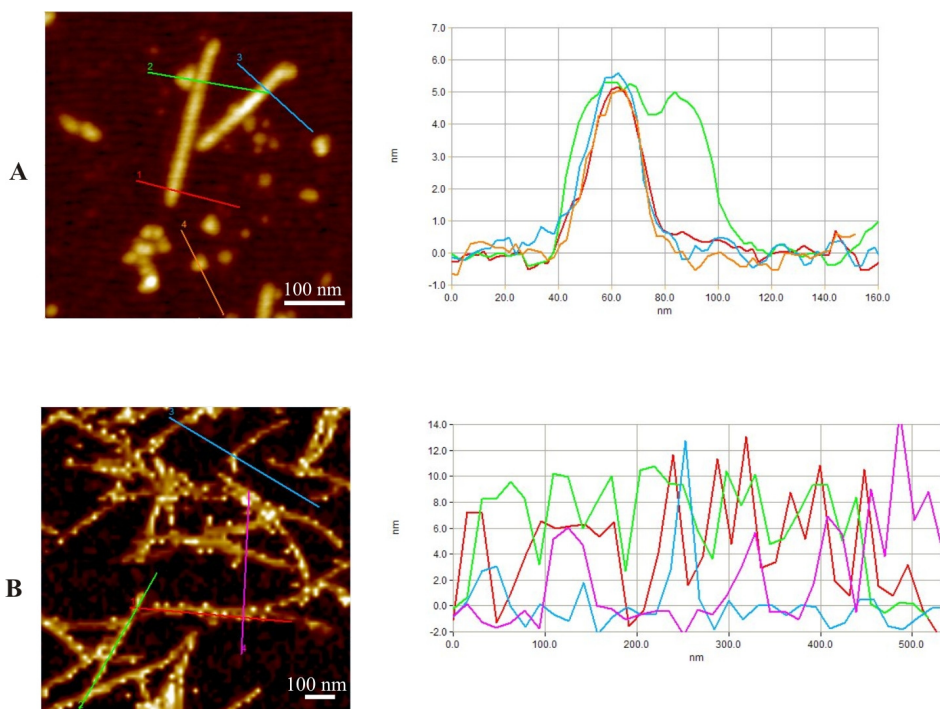
Agreguojant α -Syncys141 baltymui, gali susidaryti disulfidiniai tilteliai (S-S) tarp dviejų α -Syncys141 monomerų arba jau susiformavusių protofilamentų. Tam, kad –SH grupės būtų prieinamos modifikavimui, jau susiformavusios fibrilės buvo veikiamos tris(2-karboksi-etil) fosfinu (TCEP),

kurio buvo dedama 1 mM (50 molių daugiau nei baltymo S–S molių). Redukavimas TCEP-u nesuardo fibrilinių struktūrų, todėl prie tokių fibrilių gali būti prijungiamas biotinas. Jis prie –SH grupės jungiasi per maleimidą. Nors TCEP neturi -SH grupių, bet biotino maleimidas gali jungtis su TCEP -OH grupėmis. Norint išvengti nespecifinio jungimosi, po redukavimo su TCEP fibrilės buvo dializuojamos ir po to pridedama biotino 5 moliais daugiau nei baltymo. Tokios biotininintos fibrilės buvo laikomos 4 °C. Vėliau mėginiai buvo dializuojami taip atsikratant biotino pertekliaus. Po to fibrilės buvo veikiamos neutravidinu konjuguotomis aukso nanodalelėmis, t.y., 10 nm aukso dalelės su chemiškai „prisiūtomis“ neutravidino molekulėmis. Teoriškai turėtų susiformuoti fibrilinės struktūros, kurios būtų „aplipusios“ aukso nanodalelėmis per neutravidino molekules (3.31 pav.).



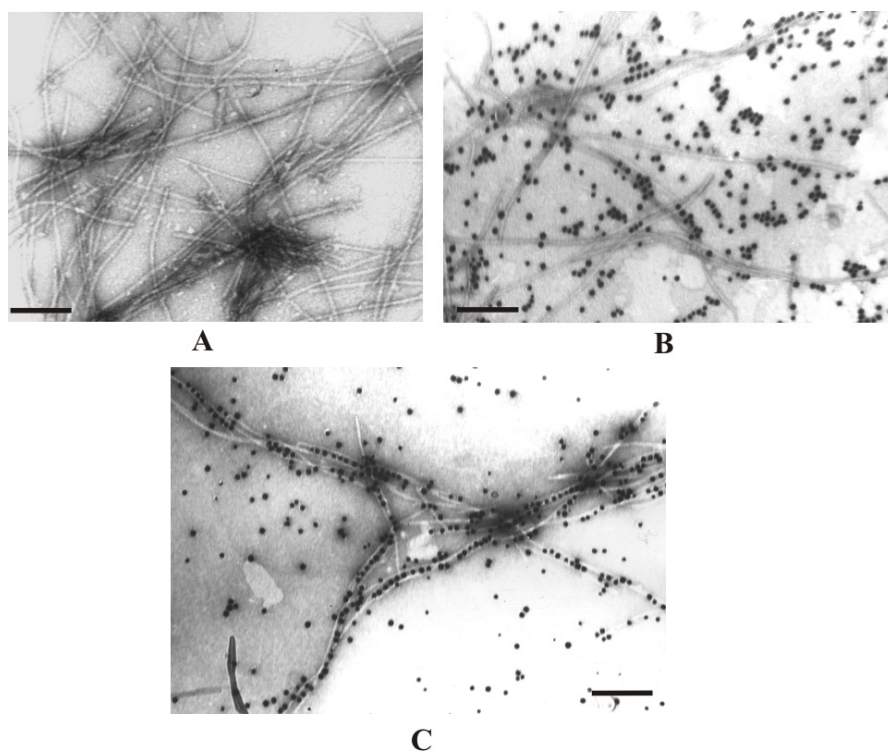
3.31 pav. Hipotetinė α -Syncys141 fibrilių modifikuotų aukso nanodalelėmis susidarymo schema. Dvi biotininintos fibrilės sujungtos su aukso nanodalele per neutravidino molekules.

Po modifikacijos α -Syncys141 fibrilės buvo įvertintos AJM (3.32 pav.) ir elektroniniu transmisiniu mikroskopu (TEM) (3.33 pav.).



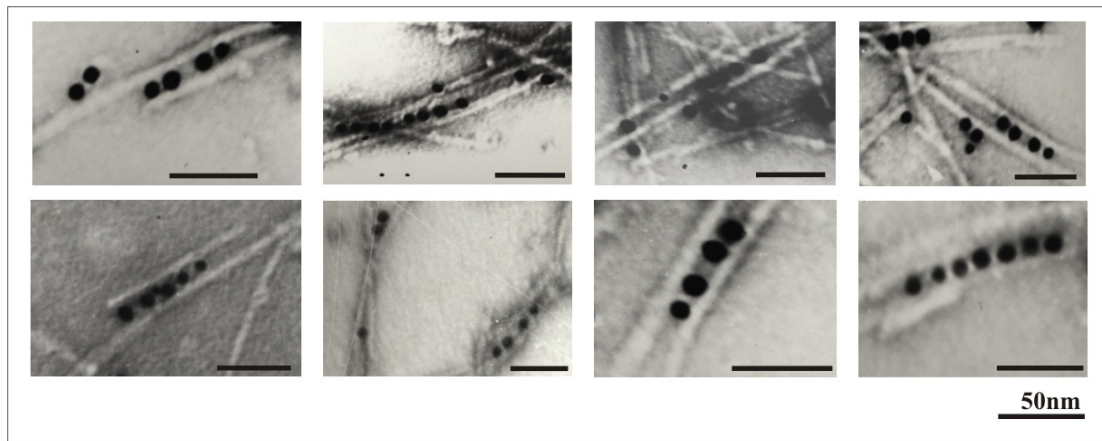
3.32 pav. Modifikuotų α -Syncys fibrilių su biotinu (A) ir su biotinu bei Au nanodalėmis, konjuguotomis su neutravidino molekulėmis (B) topografiniai vaizdai ir skersiniai fibrilių pjūviai.

Nustatyta, kad po modifikacijos biotinu fibrilių aukštis siekė apie 5 nm. Au nanodalelių aukštis yra apie 10 nm. AJM topografiniuose vaizduose matomos fibrilės, prie kurių stebimi prisijungę aukštesni vienodo dydžio dariniai. Skersiniai fibrilių pjūviai rodo, kad prie modifikuotų α -Syncys fibrilių prisijungę dariniai yra apie 10 nm dydžio. Apibendrinant, gauti dariniai yra vienodi ir prie fibrilių prisijungę tolygiai, o jų aukštis siekia 10 ir daugiau nm. Minėtos savybės leidžia manyti, kad α -Syncys fibrilės buvo modifikuotos su neutravidino molekulėmis sujungtomis Au nanodalelėmis. Norėdami nustatyti, ar fibrilės tikrai yra modifikuotos Au nanodalėmis, o ne papildomais baltyminių darinių fragmentais, tie patys mėginiai buvo analizuojami TEM metodu.



3.33 pav. Modifikuotų α -Synceys fibrilių TEM vaizdas. A. Nemodifikuotos α -Synceys fibrilės, B. α -Synceys fibrilės, modifikuotos biotinu ir Au nanodalelėmis. C. α -Synceys fibrilės, modifikuotos biotinu ir Au nanodalelėmis, po savaitės. Brūkšnelis žymi 100 nm mastelį. Didinimas 100000 kartų.

Sėkmingai modifikavus biotinais, kelios fibrilės gali būti sujungiamos per neutravidino molekules su aukso nanodalele (žr. į 3.31 pav.). Po modifikavimo Au nanodalelėmis, buvo stebimos Au „aplipusios“ fibrilės, tačiau po savaitės Au nanodalelių ir biotinilintų fibrilių susirinkimo į hibridinius nanodarinius lygis išauga. Susidariusios „kopėtelių“ struktūros (3.34 pav.) pagrindžia teorinį šių hibridinių nanodarinių susidarymo modelį (3.31 pav.)

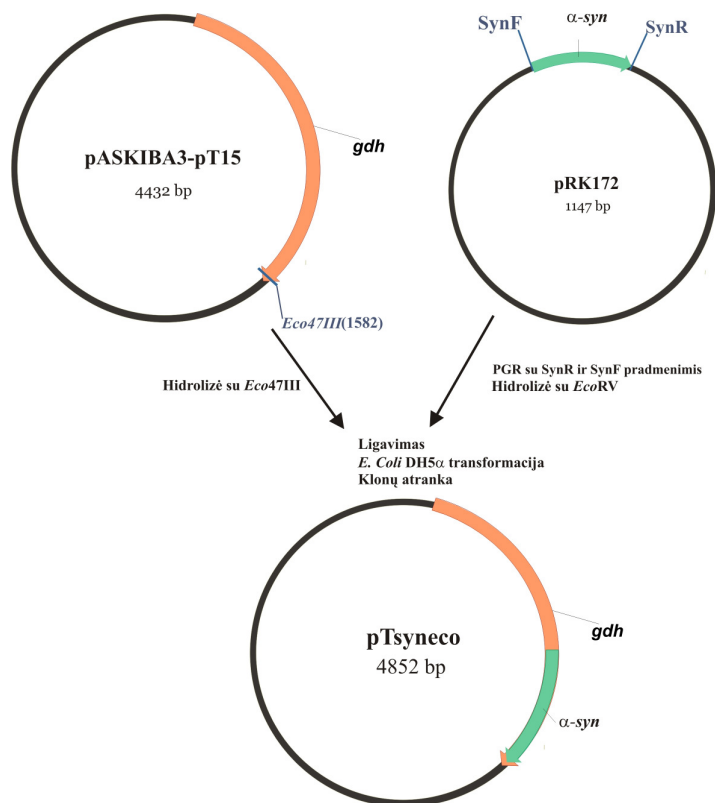


3.34 pav. Dviejų biotilintų α -Syn141 fibrilių, sujungtų Au nanodalelėmis per biotino ir neutravidino sąveikas, TEM vaizdas.

Gauti EM vaizdai patvirtina rezultatus gautus AJM. Stebimos susidariusios hibridinės nanostruktūros, kuriose Au nanodalelės yra prisijungusios prie α -Syn141 fibrilių.

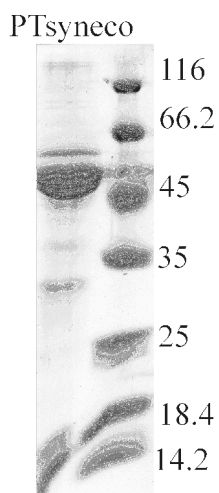
3.2.4. Hibridinio nuo PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės iš *Acinetobacter sp.* ir α -Syn baltymo konstravimas ir raiška

Hibridiniai baltymai buvo konstruojami naudojant α -Syn ir dimerinę gliukozės dehidrogenazę koduojančius genus. Kaip ir prieš tai aprašytame skyrelyje apie hibridinio GDH ir A β 40 baltymo konstravimą, buvo išnaudotos GDH gene esančios *Eco*47III ir *Pvu*II restrikcijos vietos. α -syn genas buvo padaugintas PGR metodu, pasitelkiant specifinius pradmenis, hidrolizuotas *Eco*RV restrikcijos endonukleaze ir klonuotas į pASKIBA3-PT15 plazmidę, kurioje yra GDH koduojantis genas. Klonavimo schema pateikta žemiau (3.35 pav.).



3.35 pav. Dimerinės GDH geno suliejimas su α -Syn koduojančia seka.

Gautomis plazmidėmis buvo transformuojamos *E. coli* DH5a ląstelės ir vykdoma rekombinantinių baltymų indukcija tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip ir GDH-A β 40 atveju. Hibridiniai baltymai buvo gryninami panaudojant jonų mainų chromatografiją (CM FF kolonėlę). Hibridinis baltymas buvo dializuojamas prieš 20 mM amonio karbonatinį buferį, užšaldomas ir liofilizuojamas (3.36 pav.).

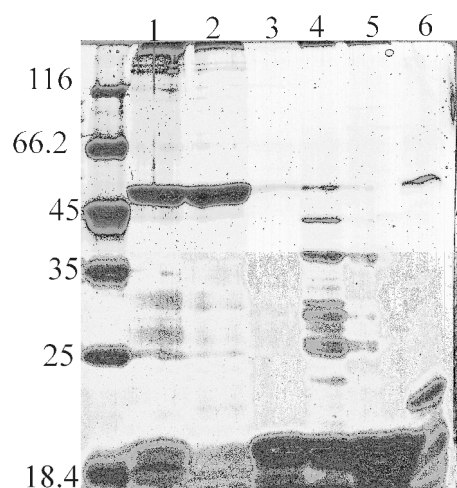


3.36 pav. Elektroforetinis hibridinio GDH ir α -Syn baltymo po chromatografijos vaizdas.

Analizuojant NDS PAAG, nustatyta, kad hibridinis α -Syn ir GDH baltymas (PTSyneco) degraduoja į GDH ir α -Syn baltymus. Buvo stebimos juostelės ties 52 kDa (GDH) ir 18 kDa (α -Syn) (3.36 pav.). Ankstesniame skyriuje buvo minėta, kad α -Syn/ α -Syn₁₄₁ baltymai NDS PAAG migruoja ties 18 kDa, nors teorinė baltymo masė yra apie 14 kDa. Manoma, kad taip yra dėl α -Syn baltymo C gale esančio didelio krūvio. Lieka neaišku, kodėl šie baltymai gryninimo metu suskyla. Kai buvo konstruojami GDH ir A β 40 hibridiniai baltymai, tai nebuvo stebimas šių baltymų degradavimas po gryninimo. Baltymai degraduodavo po ilgesnės nei 5 dienos inkubacijos. Gali būti, kad α -Syn baltymas GDH C gale yra per didelis ir dėl to jis arba jo dalis yra pašalinama.

3.2.4.1 Hibridinio nuo PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės iš *Acinetobacter sp.* ir α -Syn baltymo fibrilių tyrimas

Fibrilinant baltymus buvo pasirinktos kelios skirtingos pH reikšmės (nuo 2,5 iki 9,5) ir 37 °C temperatūra. Į hibridinių baltymų pavyzdžius buvo papildomai pridėdama α -Syn baltymo (3.37 pav.).

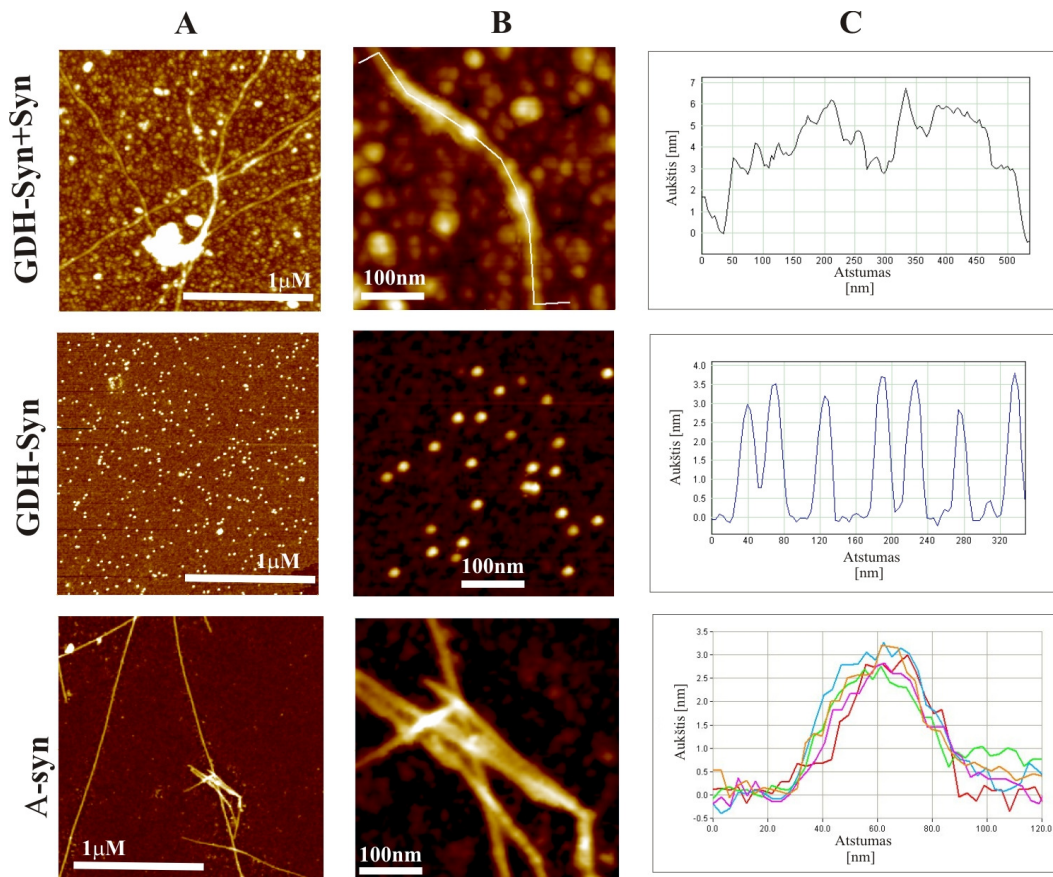


3.37 pav. Elektroforetinis vaizdas po dviejų savaitių fibrilino 37 °C temperatūroje. 1-ame takelyje – α -Syn + P_TSyneco (pH 9,5), 2-ame takelyje – α -Syn + P_TSyneco (pH 7,5), 3-ame – α -Syn + P_TSyneco (pH 4,6), 4-ame – α -Syn + P_TSyneco (pH 2,7), 5-ame takelyje – α -Syn (pH 7,5), 6-ame – P_TSyneco (pH 7,5).

Po fibrilino baltymai buvo analizuojami elektroforetiškai. Pastebėta, kad, esant rūgštinėms sąlygoms, išnyksta išgrynintus baltymus atitinkančios juostelės. Kadangi atsiranda naujos juostelės, galima daryti išvadą, kad iš šių baltymų formuojasi didesnės molekulinės masės struktūros:

oligomerai arba fibrilės. Fibrilių formavimąsi patvirtino ir sąveika su tioflavinu.

Daugiausia fibrilių po 2 savaitių formavo PTsyneco baltymas fibrilintas kartu su α -Syn, kai pH 2,7 (4 mg/ml α -Syn: 0,8 mg/ml GDH-Syn). α -Syn baltymas paprastai formuoja ~ 3 nm aukščio fibriles, hibridinio GDH-Syn baltymas formavo oligomerus, kurių aukštis buvo ~3 nm. Kai GDH-Syn ir α -Syn baltymai buvo fibrilinami kartu, buvo stebimos netolygios fibrilės, kurių aukštis vietomis siekė 6,5 nm. Galima daryti išvadą, kad hibridinį GDH-Syn baltymą fibrilinant kartu su α -Syn, formuojasi iš abiejų baltymų sudarytos fibrilės (3.38 pav.).



3.38 pav. GDH-Syn hibridinio baltymo ir α -Syn fibrilės. A ir B – topografiniai hibridinių baltymų fibrilių vaizdai, C – fibrilių skersinio pjūvio profiliai.

Nors hibridinis GDH ir α -Syn baltymas buvo degradavęs, tačiau buvo stebimi fibriliniai dariniai, kurie skyrėsi nuo α -Syn formuojamų fibrilių.

Kai buvo fibrilinamas α -Syn buvo stebimos 3–3,5 nm aukščio fibrilės. Fibrilinant GDH-Syn baltymą buvo stebimi homogeniški ne siūlinės struktūros dariniai, kurių aukštis siekė iki 3,5 nm aukščio. Fibrilinant GDH-Syn kartu pridedant papildomai α -Syn, buvo stebimos heteromorfinės fibrilės, kurių aukštis vietomis siekė 3,5 nm (kaip ir α -Syn fibrilių) ir 6,5 nm aukščio. Šie rezultatai rodo, kad formavosi iš GDH-Syn ir α -Syn baltymų sudarytos fibrilės.

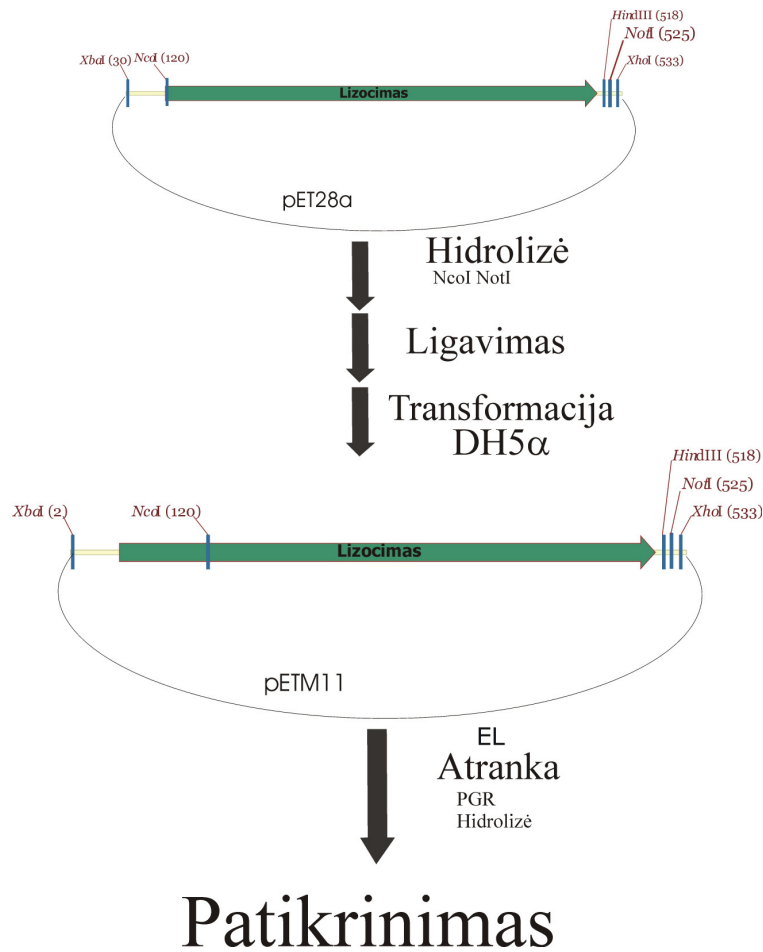
3.3. KUMELĖS PIENO LIZOCIMAS (EL)

E. coli gali produkuoti didelius heterologinių baltymų kiekius, tai daro šias ląsteles labai patrauklias įvairių baltymų ekspresijai, todėl mūsų tikslas buvo sukurti kumelės pieno lizocimo ekspresijos sistemą *E. coli* ląstelėse.

3.3.1. EL geno klonavimas ir gryninimas

Lizocimo raiškai *E. coli* ląstelėse pagal žinomą baltymo seką, buvo sukurtas sintetinis genas, kuris buvo įterptas į pET28a plazmidę. Šioje plazmidėje esantis lizocimo genas nėra transliuojamas *E. coli* ląstelėse, todėl jis buvo perkeltas į kitus vektorius, prie lizocimo atviro skaitymo rėmelio N galo prijungiant genus ar sekas, žinomas kaip skatinančias genų raišką. Tokiu būdu buvo sukonstruotos lizocimo ekspresijos plazmidės, kuriose tiriamas genas sulietas su *dsbA* (pETM50, pETM52), *dsbC* (pETM80, pETM82), *trx* (pET2a/*trx*) genais ir 6 His-kilpele (pETM11). Tik dvi iš šių plazmidžių lėmė rekombinantinio baltymo sintezę *E. coli* ląstelėse. Lizocimas buvo sintetinamas tik nuo pETM50 ir pETM11 plazmidžių. Pirmojoje plazmidėje esantis su *dsbA* sulietas lizocimo genas buvo labai aktyvus, be to šis baltymas buvo pernešamas į *E. coli* periplazminę ertmę. Lizocimo fermentinis aktyvumas yra nukreiptas prieš bakterinę ląstelės sienelę – jis katalizuoja 1,4- β jungties tarp N-acetilmuramo rūgšties ir N-acetil-D-gliukozamino hidrolizę. Dėl tokio fermentinio aktyvumo rekombinantinio arklio lizocimo sintezės metu buvo suardoma *E. coli* ląstelės sienelė, ir tai baigdavosi ląstelių žūtimi. M50-EL buvo sunkiai kontroliuojamas dėl savo per didelio aktyvumo. pETM11

vektoriuje klonuotas genas (3.39 pav.) taip pat lėmė rekombinantinio baltymo sintezę.

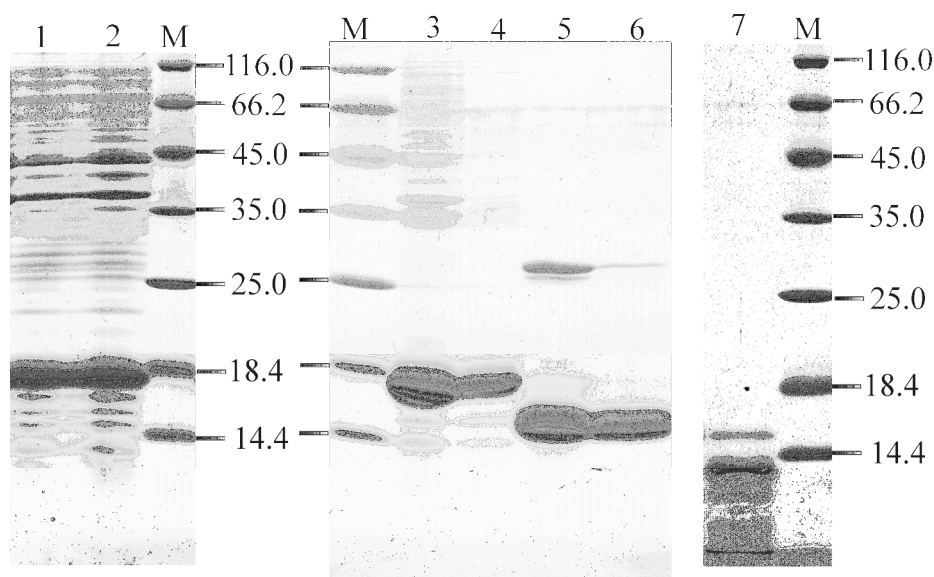


3.39 pav. Lizocimo geno klonavimo į pETM11 vektorių schema.

M11-EL13 baltymas, kitaip nei M50-EL, buvo sintetinamas kaip intarpiniai kūneliai ir buvo neaktyvus. Ši savybė ir lėmė tai, kad M11-EL13 buvo pasirinktas gryninimui ir tolimesniems tyrimams. Yra žinoma, kad lizocimą stabilizuoja kalcio jonai. Buvo ieškoma optimalių lizocimo ekspresijos sąlygų. Ekspresija buvo vykdoma pridėjus į terpę kalcio. Tačiau šis pakeitimas baltymo produkcijos nepagerino (3.40 pav. A).

Baltymo gryninimui pirmiausia nuosėdos buvo ištirpintos 6 M šlapalo tirpale ir gryninamos Ni-chelatinėje kolonėlėje. Po šios chromatografijos baltymas buvo renatūruojamas buferyje su β ME ir argininu. Po šios stadijos apie 80% renatūruoto baltymo liko tirpus. Jis buvo veikiamas TEV protease, kuri pašalina 6-histidinių kilpelę. Lyginant su natyviu baltymu, po šios

gryninimo stadijos rekombinantinis baltymas turėjo tris papildomas aminorūgštis N gale (GAM). TEV proteazė nuo lizocimo buvo atskiriama atliekant SP chromatografiją. Po gryninimo iš 1 L kultūros buvo gauta apie 50 mg lizocimo (3.40 pav. B). Skiriasi ir kitų literatūroje minimų rekombinantinių išgrynintų lizocimų išeiga: 50 mg/L buvo gauta rekombinantinio šuns lizocimo (Koshiba ir kt. 1999), vištos – 25 mg/L (Schlorb ir kt. 2005), 10 mg/L *Tapes japonica* (Takeshita ir kt. 2004), 0,6 mg/L – *Manduca sexta* (Garcia-Orozco ir kt. 2005).



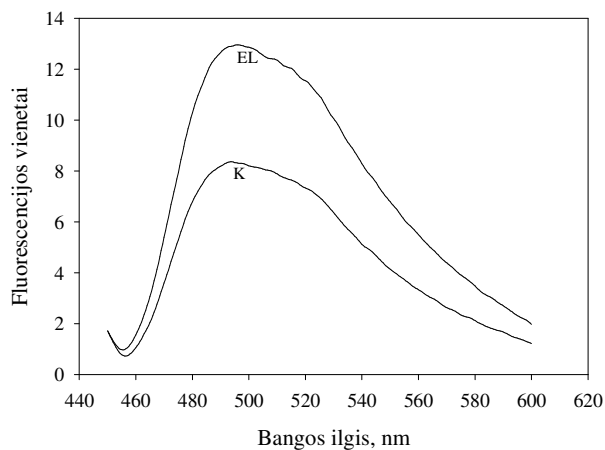
3.40 pav. Rekombinantinio lizocimo gryninimas 15% NDS PAAG. (A) beląsteliniai ekstraktai iš NB terpės be CaCl_2 (1 takas), su 10 mM CaCl_2 . (2 takas); (B) Rekombinantinio lizocimo gryninimas: ištirpinti intarpiniai kūneliai (3 takas); baltymas su His-kilpele po Ni-chelatinės kolonos (4 takas); lizocimas po TEV proteolizės (5 takas); EL13 po SP FF kolonos (6 takas). (C) EL13 pavyzdžiai inkubuoti pH 4,5 esant 55 °C 7 dienas (7 takas). M – molekulinės masės žymuo.

Po gryninimo buvo nustatytas lizocimo aktyvumas. Paaiškėjo, kad jis yra šiek tiek mažesnis nei iš kumelės pieno išskirto lizocimo. Rekombinantinio lizocimo specifinis aktyvumas buvo 25000 U/mg, o laukinio tipo – 38000U/mg. Panašus buvo rekombinantinio iš *A. niger* išskirto kumelės pieno lizocimo aktyvumas – 37500 U/mg (Spencer ir kt. 1999). Iš *E. coli* išskirto baltymo aktyvumui įtakos galėjo turėti baltymo N gale esančios papildomos aminorūgštys. Juo labiau, kad tame pačiame gale prieš TEV hidrolizę buvusi

His-kilpelė taip pat turėjo įtakos fermento aktyvumui – jo specifinis aktyvumas buvo tik 5 U/mg.

3.3.2. Kumelės pieno lizocimo fibrilinimo tyrimas

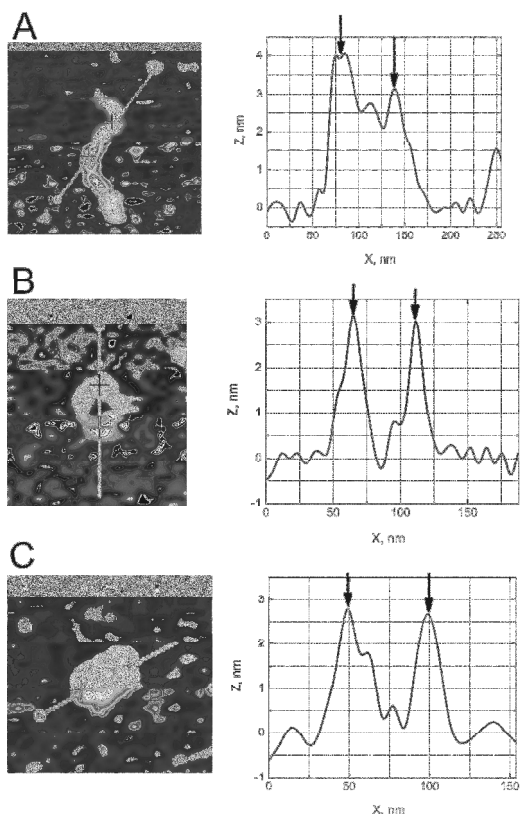
Iš ankstesnių darbų buvo žinoma, kad arklio lizocimas formuoja siūlines ir žiedines fibriles esant pH 4,5 ir 55–57 °C (Mališauskas ir kt. 2003). Panašios sąlygos buvo pritaikytos ir rekombinantiniam fermentui. Po kelių parų pamatavus ThT sąveikaujančio su fibrilinėmis struktūromis fluorescenciją, paaiškėjo, kad rekombinantinis arklio lizocimas sąveikauja su ThT ir sustiprina jo fluorescenciją (3.41 pav.).



3.41. pav. ThT fluorescencijos spektro pokytis esant arklio lizocimo. ThT (10 μM galutinė koncentracija) buvo inkubuotas su 10 μM baltymo 3 min prieš matavimą. Emisijos spektras buvo užrašomas esant baltymui (EL) arba be jo (K).

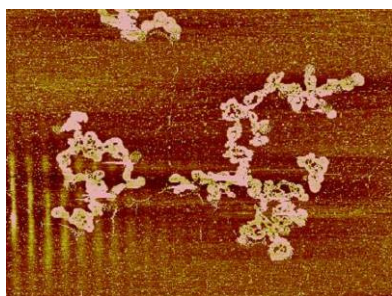
Natyvaus EL atveju fibrilių forma priklauso nuo fibrilinimo sąlygų: esant Ca²⁺ formuojasi siūlinės fibrilės, o nesant – žiedinės (Mališauskas ir kt. 2003). Po AJM, paaiškėjo, kad rekombinantinis lizocimas po 2–5 parų taip pat formavo abiejų formų fibriles, tačiau tiek ir esant tiek ir be Ca²⁺ jonų, dominavo žiedinės fibrilės (3.42 pav.).

Įdomu pažymėti, kad lizocimas su his-kilpele neformavo fibrilių tokiomis pačiomis sąlygomis, inkubuojant baltymų tirpalą 57 °C temperatūroje, susiformuodavo tik amorfinės nuosėdos (3.43 pav.).



3.42 pav. AFM vaizdas rekombinantinio EL esant pH 4,5 ir 57 °C.

Rekombinantinio arklio lizocimo suformuotų žiedinių fibrilių diametras buvo 80 nm, o aukštis 3 nm. Linijinės struktūros buvo 100–300 nm ilgio ir 3 nm aukščio. Filamentinės struktūros per visą fibrilės ilgį buvo segmentuotos. Fibrilės storis skyrėsi nuo 1,5 iki 3 nm. Labai panašios fibrilės buvo stebimos ir natyvaus baltymo atveju (Mališauskas ir kt., 2003).



3.43 pav. Amorfinės struktūros stebimos lizocimo su his-kilpele atveju.

Rekombinantinio baltymo stabilumas taip pat buvo labai panašus į natyvaus. Po 7 parų laikant baltymo tirpalą pH 4,5 ir 55–57°C temperatūroje lizocimas suskildavo į peptidus (3.40 pav. C).

3.4 APTARIMAS

Biomolekulės yra labai patrauklūs tyrimo objektai tiriant molekulinę savitvarką. A β 40 peptidas buvo naudojamas, kuriant mutantinius ir hibridinius (su kitais baltymais) variantus. A β 40 pagrindu sukonstruoti baltymai buvo fibrilinami įvairiomis sąlygomis ir tiriamos susidariusių struktūrų savybės. Rekombinantiniams A β peptidams gauti buvo naudojama sistema, kurioje A β 40 peptidas buvo gryninimas kaip su tioredoksinu sulietas baltymas. Kadangi A β peptidai yra labai maži ir toksiški sunku juos auginti bakterinėse ląstelėse. Jų gryninimui sukurta įvairių sistemų (Wiesehan ir kt., 2007; Walsh ir kt., 2009), kuriose panaudojamas didesnis, tirpumą didinantis sulietas baltymas, tirpiai A β formai gauti. Toks sulietas baltymas palengvina ir gryninimo procedūrą. Tioredoksino baltymas dažnai naudojamas kaip sulietas baltymas norint išlaikyti baltymą tirpioje frakcijoje (Thapa ir kt., 2008). Tačiau šiame darbe nustatėme, kad hibridiniai baltymai, sudaryti iš A β peptido ir kitų baltymų (taip pat ir Trx) dažniausiai buvo netirpūs.

Hibridinis Trx-A β 40 baltymas buvo naudojamas nustatant sąveiką su hemu. Šiam tikslui buvo sukonstruota 10 mutantų, kuriuose histidiniai buvo pakeisti kitomis aminorūgštimis. Iš literatūros žinoma, kad trys A β 42 sekoje esantys histidiniai gali jungtis su hemu. Be to, buvo parodyta, kad hemas gali slopinti A β 42 peptido agregaciją *in vitro* ir taip apsaugoti neuronines ląsteles nuo A β 42 toksiškumo (Howlett ir kt., 1997), o susidaręs A β 42 ir hemo kompleksas pasižymi peroksidazės aktyvumu (Atamna ir Boyle, 2006). Hemas greitai jungėsi su Trx-A β 40 ir jo mutantais, nors sąveikos intensyvumas skyrėsi. Tai rodo, kad histidinas yra svarbus jungiantis prie hemo sudėtyje esančio geležies atomo. Yra žinoma, kad kai kuriuose hemo baltymuose histidinas jungiasi su hemu, be to, A β sekoje yra hidrofobinės aminorūgštys (du leucino ir trys izoleucino liekanos) bei asparagino ir glutamo aminorūgštys, kurios dažniausiai randamos baltymų hemo surišimo vietose (Atamna ir Boyle, 2006). Skirtuminių spektrų rezultatai rodo, kad His aminorūgštys yra svarbios sąveikai su hemu. Be to, Trx-A β 40 baltymo atveju buvo stebimas sugerties

padidėjimas ties 530–550 nm banga. Šis padidėjimas gali būti paaiškinamas redokso reakcijomis tarp geležies atomo heme ir A β peptido (Smith ir kt., 2007). Be to, buvo nustatyta, kad susidaręs Trx-A β 40+hemas kompleksas pasižymėjo peroksidaziniu aktyvumu. Tačiau norint išaiškinti hemo prisijungimo mechanizmą reikalingi detalesni tyrimai.

A β 40 pagrindu sukonstruoti hibridiniai baltymai su streptavidinu ir GDH iš *E. coli* bei *Acinetobacter sp.*, kurie buvo tikimasi, formuos hibridines fibriles, kuriose A β 40 formuos fibrilinį karkasą, ant kurio bus išsidėstę funkciniai baltymai (streptavidinas ir GDH). Streptavidinas yra baltymas, kuris jungiasi su biotinu dideliu afiniškumu. dėl tokios sąveikos šis baltymas yra labai populiarus biotechnologijoje (Howarth ir kt., 2006). Hidrofobiniai yra maži grybų sekretuojami baltymai, kurie atlieka daug svarbių funkcijų grybų fiziologijoje, tačiau viena iš svarbesnių yra jų gebėjimas formuoti savitvarkos struktūras hidrofiliinio ir hidrofobinio paviršių sąveikoje (Wösten ir kt., 2000). Iki šiol literatūroje minimi bandymai kurti tokias fibrilines matricas, kuriose suformuojamos fibrilės, vėliau naudojamos fermentų mobilizacijai. Pavyzdžiui, gliukozės oksidazės (GOD) imobilizavimas ant amiloidinių iš jaučio insulino baltymo gautų fibrilių nanokarkaso, naudojant glutaraldehidą. Šis amiloidinių fibrilių funkcionalizavimas buvo sėkmingas, nes GOD išlaikė savo aktyvumą. Be to, toks imobilizuotas fermentas buvo įvestas į PVOH plėvelę, ko pasekoje gavosi nauja bionanomedžiaga (Pilkington ir kt., 2009). Nors GOD yra labiau naudojama gliukozės matavimams pramonėje (Yoshida ir kt., 2003), tačiau vis dažniau biosensoriuose yra naudojama nuo PQQ priklausoma GDH, kuri yra nejautri deguoniui kaip GOD (Hamamatsu ir kt., 2006). Literatūroje minima ir daugiau A β peptidus turinčių hibridinių baltymų. Vienas iš tokių hibridinių baltymų yra GFP-A β 42. Šio baltymo veikimas buvo dvejopas. Jei formuojasi fibrilės, tada slopinamas GFP (angl. green fluorescent protein) baltymo aktyvumas. Tuo atveju, kai fibrilės nesusidaro, GFP yra aktyvus (Caine ir kt., 2007).

Šiame darbe buvo sukonstruoti GDH ir A β 40 baltymai, gebėjo formuoti fibrilines struktūras, tik šis procesas buvo nuo laiko priklausomas.

Sudarius palankias sąlygas fibrilinimui, fermentinis GDH aktyvumas smarkiai sumažėdavo. Tam, kad GDH baltymas po fibrilinimo išlaikytų aktyvumą, reikalingi tolimesni metodo optimizavimo tyrimai.

AJM gauti vaizdai rodo, kad A β 40 peptido pagrindu gautos fibrilės yra polimorfinės prigimties. A β 40 ir jo mutantiniai variantai A β 40cys2 ir A β 40cys39 formuoja panašias fibriles, atsižvelgiant į tai, jog fibrilių morfologija labai priklauso nuo paruošimo sąlygų. A β 40 peptidas formuoja daugiausia fibrilinių darinių lyginant su A β 40cys2 ir A β 40cys39. Tačiau fibrilių morfologija labai panaši į A β 40cys2 peptido formuojamas fibriles. Be to, šiame darbe buvo nustatyta, kad Au nanodalelės lemia didesnę peptidų agregaciją, kai fibrilinama kartu su jomis.

Hibridiniai A β 40 ir streptavidino baltymai, priklausomai nuo sąlygų, taip pat formavo skirtingas fibriles. Nustatyta, kad esant pH 4,6, hibridinis A β 40 ir streptavidino baltymas formuoja tinklo struktūrą. Artimiausiu metu bus tiriamos galimybės jį naudoti kaip imobilizuojančią matricą. Be to, streptavidino baltymas fibrilinant nedegraduoja į mažesnius fragmentus. Tuo tarpu hibridiniai baltymai, sudaryti iš A β 40 ir GDH, nepriklausomai, kurioje vietoje buvo įstatytas A β 40 peptidas, dalinai degraduodavo į mažesnius fragmentus. Buvo stebimos įvairios fibrilinės struktūros, kurios gali būti sudarytos iš A β 40 ir GDH baltymo fragmentų.

Šiame darbe parodyta, kad α -Syn baltymas tinka nanodarinių konstravimui, šio baltymo fibrilių pagrindu. Kol kas literatūrinuose šaltiniuose galima rasti hibridinių fibrilių, kurios sudarytos iš baltymų ir peptidų, kurie prieš fibrilinimą buvo modifikuojami įvairiomis funkcinėmis grupėmis. Pavyzdžiui, viena mokslininkų grupė pakeitė 140-oje padėtyje α -Syn esantį alaniną į cisteiną ir per maleimidinę grupę prijungė žymenį MFC, kurio pagrindą sudaro 2-(2-furil)-3-hidroksichromonas FC. Pažymėtas α -Syn baltymas (AS140-MFC) formavo fibriles, o skirtingame agregacijos etape buvo stebimas skirtingas fluorescencijos lygis (Yuschenko ir kt., 2010). Be to yra darbų, kuriuose α -Syn (E46K) fibrilės buvo naudojamos kaip matrica,

paladžio, vario ir aukso nanodalelių gamybai (Colby ir kt., 2008). Tačiau kol kas nėra žinoma, kad modifikacijos būtų vykdomos po fibrilinimo ant jau susiformavusių fibrilių. Šiame darbe mes pirmą kartą pademonstravome, kad α -Syn fibrilės gali būti modifikuojamos įvairiomis funkcinėmis grupėmis, papildomą aminorūgštį įvedus genų inžinerijos metodu – cisteiną baltymo C gale. Toks α -Syncys141 baltymas formuoja labai panašios morfologijos į α -Syn baltymo formuojamas fibriles. Be to, α -Syncys141 formuojamos fibrilės buvo sėkmingai modifikuojamos biotinu ir Au nanodalelėmis, konjuguotomis su neutravidino molekulėmis. Rezultatai rodo, kad α -Syncys141 baltymas yra puikus statybinis elementas nanokonstruktų kūrimui. Tai, kad šias fibriles buvo galima modifikuoti biotinu, o vėliau ir Au nanodalėmis, leidžia daryti prielaidą, kad šios fibrilės gali būti panaudojamos modifikuojant ir kitomis funkcinėmis grupėmis. Be to, šio baltymo gryninimo procedūra yra labai paprasta, o baltymo išeiga nemaža ir gerokai didesnė nei A β peptidų.

Šio darbo tikslas buvo sukurti EL ekspresijos sistemą *E. coli* ląstelėse. Ankščiau rekombinantinis EL buvo ekspresuojamas tik filamentiniuose grybuose (Spencer ir kt., 1999). Ši ekspresijos sistema nebuvo tobula dėl posttransliacinių modifikacijų, *A. niger* rūgštinių augimo sąlygų, kuriose EL yra destabilizuojamas ir dėl to yra apsunkinama gryninimo procedūra (Spencer ir kt., 1999). EL gryninimas iš kumelės pieno nėra sudėtingas procesas (Noppe ir kt., 1996), tačiau kai kuriems eksperimentams yra reikalingas rekombinantinis EL baltymas. Buvo sukonstruota keletas rekombinantinių plazmidžių su EL koduojančiu genu, tačiau EL baltymas buvo sintetinamas tik keliose iš jų. *E. coli* sintetino hibridinius baltymus, jei buvo transformuotas plazmide pM50-EL4, kurioje EL yra sulietas su DsbA baltymu, arba pM11EL13 plazmide, kurioje EL sulietas su N gale esančia histidinių uodega. EL sulietas su DsbA buvo tirpus ir aktyvus baltymas, tačiau labai nestabilus ir nekontroliuojamas, be to, DsbA-EL suardydamas *E. coli* ląsteles augimo metu. Dėl to tolimesniems eksperimentams buvo pasirinktas His-EL. Tarp visų rekombinantinių lizocimų juos ekspresuojant *E. coli* ląstelėse tik keletas buvo tirpūs: žmogaus lizocimas

esant GroEL-GroES šaperonams (Nishihara ir kt., 2000) vištos kiaušinio lizocimas buvo ekspresuojamas kaip tirpus baltymas kai buvo sulietas su OmpA (Fischer ir kt., 1993) ir lizocimas iš *Hirudo medicinalis* (Zavalova ir kt., 2004). Visais kitais atvejais, kai lizocimas buvo tirpus, bakterinės ląstelės buvo suardomos (Fischer ir kt., 1993; Zavalova ir kt., 2004) arba buvo stebimas žymiai mažesnis specifinis aktyvumas (Nishihara ir kt., 2000). His-EL buvo ekspresuojamas intarpinių kūnelių pavidalu, tai buvo stebima ir kitų lizocimų gryninimo procese: šuns (Koshiba ir kt., 1999), vištos kiaušinio (Schlorb ir kt., 2005) ir *Tapes japonica* (Takeshita ir kt., 2004) lizocimuose, ekspresijos lygis skyrėsi: 50 mg/l šuns lizocimo, 25 mg/l vištos lizocimo, 10 mg/l *T. japonica* ir 0,6 mg/l iš *Manduca sexta* (Garcia-Orozco ir kt., 2005). Šiame darbe EL buvo gauta 50 mg iš vieno litro kultūros. Renatūracijos etapas šiame gryninimo procese buvo kritinis. Gliutationas dažnai naudojamas rekombinantinių lizocimų renatūracijai (Garcia-Orozco ir kt., 2005; Schlorb ir kt., 2005; Takeshita ir kt., 2004). Tioredoksino sistema buvo naudojama šuns lizocimui gauti (Koshiba ir kt., 1999). Mes nustatėme, kad argininas padeda renatūruotis EL, tačiau dalis EL (~20%) iškrito į nuosėdas dėl neteisingo susisukimo. Po renatūravimo ir proteolizės (His uodegai pašalinti) rekombinantinis EL buvo aktyvus. Specifinis aktyvumas (25000 U/ mg) buvo mažesnis nei natyvaus (38000 U/mg) arba iš *A. niger* išskirto rekombinantinio lizocimo (37500 U/mg) (Spencer ir kt., 1999). Tai galima būtų paaiškinti tuo, kad EL ekspresuojamas *E. coli* ląstelėse turi papildomas tris aminorūgštis (gliciną, alaniną ir metioniną), kurios liko po rekombinantinės plazmidės konstravimo ir proteolizės. Gali būti, kad šios papildomos aminorūgštys įtakojo baltymo savybes ir susisukimą. Yra žinoma, kad papildomas metioninas N gale lemia alaktalbuminų ir lizocimų stabilumą ir tirpumą, kai šie baltymai yra ekspresuojami *E. coli* ląstelėse (Takano ir kt., 1999; Mine ir kt., 1997; Ishikawa ir kt., 1998). His-EL prieš hidrolizę su TEV buvo beveik neaktyvus (aktyvumas buvo apie 5000 kartų mažesnis nei EL po proteolizės). Be to, rekombinantinis EL formuoja amiloidines struktūras, analogiškas natyvaus EL formuojamoms fibrilėms esant destabilizuojančioms sąlygoms. Kalcis daro

įtaką rekombinantinio EL fibrilių susidarymui. Buvo stebimos žiedinės ir tiesios fibrilės, nors dominuojanti yra žiedinė fibrilių forma. Natyvus EL daugiausia taip pat formuoja žiedinės struktūros fibriles kai terpėje yra kalcio jonų (Malisauskas ir kt., 2003). Įdomu tai, kad panašiomis sąlygomis fibrilinant His-EL, fibrilės nesusidarė. Buvo stebimi tik amorfiniai agregatai. Taigi, His uodega lemia ne tik aktyvaus baltymo susidarymą, bet ir fibrilinių struktūrų formavimąsi.

Ši sukurta ekspresijos sistema bus tinkama gaminant rekombinantinį EL *E. coli* ląstelėse. Rekombinantinis EL bus toliau naudojamas mutantų ir izotopų žymėtiems mėginiams gaminti, o šie bus naudojami detalesniuose amiloidinių baltymų tyrimuose.

Šiame darbe atlikti eksperimentai ir gauti rezultatai rodo, kad sukonstruoti nauji hibridiniai ir mutantiniai baltymai, gebantys formuoti amiloidines fibriles yra svarbus pagrindas tolimesniems darbams, kuriant funkcionalizuotus nanodarinius, kurie bus panaudojami nanoprietaisų kūrimui.

IŠVADOS

- Sukonstruoti amiloidines fibriles formuojančio baltymo A β 40 mutantai A β 40cys2 ir A β 40cys39 formuoja β -klostines struktūras, morfologiškai panašias į A β 40, o baltymo α -Syn_{cys141} mutantas formuoja β -klostines struktūras, morfologiškai nepanašias į α -Syn.
- Modifikavus α -Syn_{cys141} fibriles biotinu, prie jų specifiškai jungėsi aukso nanodalelės.
- Sukurti hibridiniai streptavidino-A β 40 ir streptavidino-hidrofobino-A β 40 baltymai formuoja fibrilines struktūras, kurių morfologija skiriasi nuo A β 40 formuojamų fibrilių. Streptavidino-A β 40 baltymas labiau linkęs formuoti β -klostines struktūras nei streptavidinas-hidrofobinas-A β 40. Sukonstruoti nuo PQQ priklausomos gliukozės dehidrogenazės (GDH) iš *Acinetobacter* sp. ar *E. coli* ir A β 40 bei α -syn hibridiniai baltymai geba formuoti fibrilines struktūras, kurios yra labai heteromorfinės.
- Hibridinis Trx-A β 40 baltymas jungiasi su hemu, o susidaręs kompleksas pasižymėjo peroksidaziniu aktyvumu. A β 40 sekoje esantys histidiniai yra esminiai sąveikoje su hemu.
- Klonuotas kumelės pieno lizocimo genas ekspresuojasi *E. coli* ląstelėse, o po fibrilinimo formuoja žiedo pavidalo struktūras.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

Publikacijos:

- Bukauskas V., Strazdienė V., Šetkus A., Bružytė S., Časaitė V., Meškys R. (2009) beta-Sheeted amyloid fibril based structures for hybrid nanoobject on solid surfaces. *Interface controlled organic thin films*. Book series: Springer Proceedings in Physics. 129: 61-65.
- Časaitė V., Bružytė S., Bukauskas V., Šetkus A., Morozova-Roche L.A., Meškys R. (2009) Expression and purification of active recombinant equine lysozyme in *Escherichia coli*. PEDS 22, 649–654.
- Čepononytė S., Bružytė S., Melvydas V., Servienė E. (2008) Production of heterologous proteins using *S. cerevisiae* expression system. *Biologija* 54, 178–182.
- Bružytė S., Časaitė V., Gasparavičiūtė R., Meškys R. (2008) Investigation of the fusion A β 40-Trx proteins interaction with heme. *Biologija* 54, 233–237.
- Šetkus A., Bukauskas V., Pavliuk S., Bružytė S., Časaitė V., Meškys R. (2008) Self assemblage of beta sheeted structures on solid state film for biosensors. *Journal of Surface Science and Nanotechnology*, 7, 491–496.

Tezės:

- Šetkus A., V. Bukauskas, S. Pavliuk, S. Bružytė, V. Časaite, R. Meškys. Self assemblage of beta sheeted structures on solid state film for biosensors. 14 th International Conference on Solid Films and Surfaces, Dublin, Ireland, June 30 - July 4, 2008.
- Šetkus A., V. Bukauskas, R. Meškys, S. Bružytė, V. Laurinavičius, J. Razumienė. Combined biomolecular and solid state surface structures for chemical detection. Seeing at the Nanoscale VI, 9-11 July 2008 Berlin, Germany.
- Bukauskas V., Šetkus A., R. Meškys, S. Bružytė. Beta-sheeted amyloid fibril based scaffold structures for development of

hybrid nanoobjects with modifyable electronic properties. European Material Research Society 2008 Spring Meeting. Strasbourg, France, May 26-30, 2008.

Padėka

Dėkoju darbo vadovei dr. Vidai Časaitei už nuoseklų vadovavimą, nuoširdžius patarimus ir pasiūlymus bei pirmuosius darbo įgūdžius. Laboratorijos vadovui prof. dr. Rolandui Meškiui už atsakingas bei vertingas mokslines konsultacijas bei nuolatinį skatinimą tobulėti. Visiems Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus darbuotojams bei studentams esu dėkinga už pagalbą ir gerą kompaniją.

Norėčiau padėkoti dr. Virginijai Bukauskui bei dr. Arūnui Šetkui už pagalbą vizualizuojant amiloidines fibriles ir puikų bendradarbiavimą. Dr. Juozui Staniuliui už pagalbą atliekant eksperimentus su TEM. Dr. Anders Olofsson, dr. Mantui Mališauskui, dr. Ludmilai Morozova-Roche bei dr. Gunter Stier už plazmides. Recenzentams dr. Justui Barauskui bei dr. Gintarui Valinčiui, pateikusiems vertingų pastabų ir patarimų. Taip pat esu dėkinga doktorantėms Rimai Budvytytei už aukso nanodaleles ir Marijai Jankunec, padėjusiai susipažinti su atominės jėgos mikroskopu.

Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui už suteiktą finansinę paramą disertacijos rengimo metu.

Dėkoju savo draugams už rūpestį ir palaikymą.

Ypač esu dėkinga savo šeimai už begalinę paramą ir supratimą.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Antzutkin O.N., Balbach J.J., Leapman R.D., Rizzo N.W., Reed J., Tycko R. (2000). Multiple quantum solid-state NMR indicates a parallel, not antiparallel, organization of beta-sheets in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13045-13050.
2. Antzutkin O.N., Leapman R.D., Balbach J.J., Tycko R. (2002). Supramolecular structural constraints on Alzheimer's beta-amyloid fibrils from electron microscopy and solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 41, 15436-15450.
3. Arimon M., Diez-Perez I., Kogan M.J., Durany N., Giralt E., Sanz F., Fernandez-Busquets X. (2005). Fine structure study of Abeta1-42 fibrillogenesis with atomic force microscopy. *Faseb J* 19, 1344-1346.
4. Atamna H., Boyle K. (2006). Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 3381-3386.
5. Atamna H., Frey W.H. 2nd (2004). A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid beta and has altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11153-11158.
6. Aubin-Tam M.E., Hwang W., Hamad-Schifferli K. (2009). Site-directed nanoparticle labeling of cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(11):4095-100.
7. Balbach J.J., Ishii Y., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Rizzo N.W., Dyda F., Reed J., Tycko R. (2000). Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry* 39, 13748-13759.
8. Balbach J.J., Petkova A.T., Oyster N.A., Antzutkin O.N., Gordon D.J., Meredith S.C., Tycko R. (2002). Supramolecular structure in full-length Alzheimer's beta-amyloid fibrils: evidence for a parallel beta-sheet organization from solid-state nuclear magnetic resonance. *Biophys J* 83, 1205-1216.

9. Ban T., Hoshino M., Takahashi S., Hamada D., Hasegawa K., Naiki H., Goto Y. (2004). Direct observation of Abeta amyloid fibril growth and inhibition. *J Mol Biol* 344, 757-767.
10. Beyer K. (2006). Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol* 112, 237-251.
11. Benseny-Cases N., Cocera M., Cladera J. (2007). Conversion of non-fibrillar beta-sheet oligomers into amyloid fibrils in Alzheimer's disease amyloid peptide aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 916-921.
12. Bentahir M., Nyabi O., Verhamme J., Tolia A., Horre K., Wiltfang J., Esselmann H., De Strooper B. (2006). Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96, 732-742.
13. Bitan G., Kirkitadze M.D., Lomakin A., Vollers S.S., Benedek G.B., Teplow D.B. (2003). Amyloid beta-protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 330-335.
14. Bitan G., Lomakin A., Teplow D.B. (2001). Amyloid beta-protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *J Biol Chem* 276, 35176-35184.
15. Blackley H.K., Sanders G.H., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J., Wilkinson M.J. (2000). In-situ atomic force microscopy study of beta-amyloid fibrillization. *J Mol Biol* 298, 833-840.
16. Braga P.C., Ricci D. (2004). Atomic Force microscopy: Biomedical methods and applications. *Methods in molecular biology*, Volume 242.
17. Buckingham S.D., Jones A.K., Brown L.A., Sattelle D.B. (2009). Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev* 61(1):39-61.
18. Burger C., Hsiao B.S., Chu B. (2006). Nanofibrous materials and their applications. *Annu.Rev.Mater.Res.* 36: 333-368.
19. Bush A.I. (2003). Copper, zinc, and the metallobiology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 17, 147-150.
20. Caccamo A., Oddo S., Sugarman M.C., Akbari Y., LaFerla F.M. (2005). Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol Aging* 26, 645-654.

21. Caine J., Sankovich S., Antony H., Waddington L., Macreadie P., Varghese J., Macreadie I. (2007). Alzheimer's A β fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res* 7, 1230-1236.
22. Calamai M., Chiti F., Dobson, C.M. (2005). Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophys J* 89, 4201-4210.
23. Chamberlain A.K., MacPhee C.E., Zurdo J., Morozova-Roche L.A., Hill H.A., Dobson C.M., Davis J.J. (2000). Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Biophys J* 79, 3282-3293.
24. Chandra S., Chen X., Rizo J., Jahn R., Sudhof T.C. (2003). A broken α -helix in folded α -Synuclein. *J Biol Chem* 278, 15313-15318.
25. Chapman M.R., Robinson L.S., Pinkner J.S., Roth R., Heuser J., Hammar M., Normark S., Hultgren S.J. (2002). Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851-855.
26. Chien P., Weissman J.S., DePace A.H. (2004). Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem* 73:617-56.
27. Chiti F., Dobson C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 75, 333-366.
28. Chiti F., Webster P., Taddei N., Clark A., Stefani M., Ramponi G., Dobson, C.M. (1999). Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3590-3594.
29. Clippingdale A.B., Wade J.D., Barrow C.J. (2001). The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer's disease. *J Pept Sci* 7, 227-249.
30. Colby R., Hulleman J., Padalkar S., Rochet J.C., Stanciu L.A. (2008). Biotemplated synthesis of metallic nanoparticle chains on an α -synuclein fiber scaffold. *J Nanosci Nanotechnol* 8(2):973-8.
31. Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med* 4, 1318-1320.
32. Cottingham M.G., Hollinshead M.S., Vaux D.J. (2002). Amyloid fibril formation by a synthetic peptide from a region of human acetylcholinesterase that is homologous to the Alzheimer's amyloid-beta peptide. *Biochemistry* 41, 13539-13547.

33. Cross G.L.W. (2006). The production of nanostructures by mechanical forming. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 39: R363-R386.
34. Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 273, 9443-9449.
35. Der-Sarkissian A., Jao C.C., Chen J., Langer R. (2003) Structural organization of alpha-synuclein fibrils studied by site-directed spin labelling. *J Biol Chem* 278(39):37530-5.
36. Dinca V., Ranella A., Farsari M., Kafetzopoulos D., Dinescu M., Popescu A., Fotakis C. (2008). Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer. *Biomed Microdevices* 10(5):719-25.
37. Dodel R.C., Hampel H., Du Y. (2003). Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2, 215-220.
38. Dong J., Canfield J.M., Mehta A.K., Shokes J.E., Tian B., Childers W.S., Simmons J.A., Mao Z., Scott R.A., Warncke K., Lynn D.G. (2007). Engineering metal ion coordination to regulate amyloid fibril assembly and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 13313-13318.
39. Dore S. (2002). Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 32, 1276-1282.
40. Du H.N., Tang L., Luo X.Y., Li H.T., Hu J., Zhou J.W., Hu H.Y. (2003). A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein. *Biochemistry* 42(29):8870-8.
41. El-Agnaf O.M., Irvine G.B. (2002). Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. *Biochem Soc Trans* 30, 559-565.
42. Eliezer D., Kutluay E., Bussell R.Jr., Browne G. (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol* 307, 1061-1073.
43. Fändrich M. (2007). On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell Mol Life Sci* 64, 2066-2078.

44. Farrell H.M.Jr., Cooke P.H., Wickham E.D., Piotrowski E.G., Hoagland P.D. (2003). Environmental influences on bovine kappa-casein: reduction and conversion to fibrillar (amyloid) structures. *J Protein Chem* 22, 259-273.
45. Ferguson N., Becker J., Tidow H., Tremmel S., Sharpe T.D., Krause G., Flinders J., Petrovich M., Berriman J., Oschkinat H., Fersht A.R. (2006). General structural motifs of amyloid protofilaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 16248-16253.
46. Fezoui Y., Teplow D.B. (2002). Kinetic studies of amyloid beta-protein fibril assembly. Differential effects of alpha-helix stabilization. *J Biol Chem* 277, 36948-36954.
47. Freddolino P.L., Liu F., Gruebele M., Schulten K. (2008). Ten-microsecond molecular dynamics simulation of a fast-folding WW domain. *Biophys J* 94(10):L75-7.
48. Garcia-Orozco K.D., Lopez-Zavala A.A., Puentes-Camacho D., Calderon-de-la-Barca A.M., Sotelo-Mundo R.R. (2005). Recombinant bacterial expression of the lysozyme from the tobacco-hornworm *Manduca sexta* with activity at low temperatures. *Biotechnol Lett* 27, 1075-1080.
49. Gazit E. (2007). Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires. *FEBS J* 274, 317-322.
50. George J.M. (2002). The synucleins. *Genome Biol* 3.
51. Giasson B.I., Murray I.V., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276, 2380-2386.
52. Giehm L., Lorenzen N., Otzen D.E. (2011). Assays for α -synuclein aggregation. *Methods* 53(3):295-305.
53. Gilead S., Gazit E. (2005). Self-organisation of short peptide fragments: from amyloid fibrils to nanoscale supramolecular assemblies. *Supramolecular Chemistry* 17: 87.
54. Goldsbury C., Frey P., Olivieri V., Aebi U., Muller S.A. (2005). Multiple assembly pathways underlie amyloid-beta fibril polymorphisms. *J Mol Biol* 352, 282-298.

55. Goldsbury C., Kistler J., Aebi U., Arvinte T., Cooper G.J. (1999). Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol* 285, 33-39.
56. Gregersen N., Bolund L., Bross P. (2005). Protein misfolding, aggregation, and degradation in disease. *Mol Biotechnol* 31, 141-150.
57. Hamada D., Dobson C.M. (2002). A kinetic study of beta-lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea. *Protein Sci* 11, 2417-2426.
58. Hamamatsu N., Suzumura A., Nomiya Y., Sato M., Aita T., Nakajima M., Husimi Y., Shibana Y. (2006). Modified substrate specificity of pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by biased mutation assembling with optimized amino acid substitution. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 607-617.
59. Harrison R.S., Sharpe P.C., Singh Y., Fairlie D.P. (2007). Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159, 1-77.
60. Hernandez J.A., Peleato M.L., Fillat M.F., Bes M.T. (2004). Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett* 577, 35-41.
61. Hoyer W., Cherny D., Subramaniam V., Jovin T.M. (2004). Rapid self-assembly of alpha-synuclein observed by *in situ* atomic force microscopy. *J Mol Biol* 340, 127-139.
62. Hong D.P., Fink A.L., Uversky V.N. (2009). Smoking and Parkinson's disease: does nicotine affect alpha-synuclein fibrillation? *Biochim Biophys Acta* 1794(2):282-90.
63. Honig B. (1999). Protein folding: from the Levinthal paradox to structure prediction. *J Mol Biol* 293(2):283-93.
64. Hoshi M., Sato M., Matsumoto S., Noguchi A., Yasutake K., Yoshida N., Sato K. (2003). Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6370-6375.
65. Howarth M., Chinnapen D.J., Gerrow K., Dorrestein P.C., Grandy M.R., Kelleher N.L., El-Husseini A., Ting A.Y. (2006). A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat Methods* 3, 267-273.

66. Howlett D., Cutler P., Heales S., Camilleri P. (1997). Hemin and related porphyrins inhibit beta-amyloid aggregation. *FEBS Lett* 417, 249-251.
67. Huang X., Atwood C.S., Moir R.D., Hartshorn M.A., Vonsattel J.P., Tanzi R.E., Bush A.I. (1997). Zinc-induced Alzheimer's Abeta 1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J Biol Chem* 272, 26464-26470.
68. Huang X., Cuajungco M.P., Atwood C.S., Moir R.D., Tanzi R.E., Bush A.I. (2000). Alzheimer's disease, beta-amyloid protein and zinc. *J Nutr* 130, 1488S-1492S.
69. Huber C., Liu J., Egelseer E.M., Moll D., Knoll W., Sleytr U.B., Sára M. (2006). Heterotetramers formed by an S-layer-streptavidin fusion protein and core-streptavidin as a nanoarrayed template for biochip development. *Small* 1, 142-50.
70. Ishikawa N., Chiba T., Chen L.T., Shimizu A., Ikeguchi M., Sugai S. (1998). Remarkable destabilization of recombinant alpha-lactalbumin by an extraneous N-terminal methionyl residue. *Protein Eng* 11(5):333-5.
71. Iwahori K., Yamashita I. (2005). The synthesis of nanoparticles and nanowires by bio-template platform, cage-shaped protein supramolecules. *Recent. Res. Devel. Biotech. Bioeng.* 7: 41-68.
72. Iwatsubo T. (2003). Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 250 Suppl 3, III11-14.
73. Yagi H., Kusaka E., Hongo K., Mizobata T., Kawata Y. (2005). Amyloid fibril formation of alpha-synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases. *J Biol Chem* 280(46):38609-16.
74. Yan H., Saiani A., Gough J.E., Miller A.F. (2006) Thermoreversible protein hydrogel as cell scaffold. *Biomacromolecules* 7(10):2776-82.
75. Yap F.L., Zhang Y. (2007). Protein and cell micropatterning and its integration with micro/nanoparticles assembly. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 775-788.
76. Yemini M., Reches M., Gazit E., Rishpon J. (2005) Peptide nanotube-modified electrodes for enzyme-biosensor applications. *Anal Chem* 77(16):5155-9.
77. Yong W., Lomakin A., Kirkitadze M.D., Teplow D.B., Chen S.H., Benedek G.B. (2002). Structure determination of micelle-like intermediates in amyloid

- beta -protein fibril assembly by using small angle neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 150-154.
78. Yoshida H., Yagi Y., Ikebukuro K., Sode K. (2003). Improved substrate specificity of water-soluble pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by a peptide ligand. *Biotechnol Lett* 25, 301-305.
79. Yushchenko D.A., Fauerbach J.A., Thirunavukkuarasu S., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. (2010). Fluorescent ratiometric MFC probe sensitive to early stages of alpha-synuclein aggregation. *J Am Chem Soc* 132 (23):7860-1.
80. Jahn T.R., Radford S.E. (2005). The Yin and Yang of protein folding *FEBS J* 272(23):5962-70.
81. Jaroniec C.P., MacPhee C.E., Bajaj V.S., McMahon M.T., Dobson C.M., Griffin R.G. (2004). High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 711-716.
82. Jimenez J.L., Nettleton E.J., Bouchard M., Robinson C.V., Dobson C.M., Saibil H.R. (2002). The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9196-9201.
83. Kallhoff V., Peethumnongsin E., Zheng H. (2007). Lack of alpha-synuclein increases amyloid plaque accumulation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2, 6.
84. Kamal A., Stokin G.B., Yang Z., Xia C.H., Goldstein L.S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28, 449-459.
85. Khan A., Ashcroft A.E., Higenell V., Korchazhkina O.V., Exley C. (2005). Metals accelerate the formation and direct the structure of amyloid fibrils of NAC. *J Inorg Biochem* 99, 1920-1927.
86. Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., Roy R., Singh S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol* 151, 229-238.
87. Khurana R., Ionescu-Zanetti C., Pope M., Li J., Nielson L., Ramirez-Alvarado M., Regan L., Fink A.L., Carter S.A. (2003). A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophys J* 85, 1135-1144.

88. Khurana R., Uversky V.N., Nielsen L., Fink A.L. (2001). Is Congo red an amyloid-specific dye? *J Biol Chem* 276, 22715-22721.
89. Kikuchi M., Yamamoto Y., Taniyama Y., Ishimaru K., Yoshikawa W., Kaisho Y., Ikehara M. (1988). Secretion in yeast of human lysozymes with different specific activities created by replacing valine-110 with proline by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(24):9411-5.
90. Kim T.D., Paik S.R., Yang C.H. (2002). Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein. *Biochemistry* 41, 13782-13790.
91. Kim W., Hecht M.H. (2008). Mutations enhance the aggregation propensity of the Alzheimer's Abeta peptide. *J Mol Biol* 377, 565-574.
92. Kim, W., Kim, Y., Min, J., Kim, D. J., Chang, Y.T., Hecht, M.H.A. (2006). High-Throughput Screen for Compounds That Inhibit Aggregation of the Alzheimer's Peptide. *ACS Chem. Biol* 1, 461-469.
93. Klement K., Wieligmann K., Meinhardt J., Hortschansky P., Richter W., Fändrich M. (2007). Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's abeta(1-40) amyloid fibrils. *J Mol Biol* 373, 1321-1333.
94. Kodama H., Matsumura S., Yamashita T., Mihara H. (2004). Construction of a protein array on amyloid like fibrils using co-assembly of designed peptides. *Chem Commun (Camb)* 24, 2876-7.
95. Konno T. (2001). Amyloid-induced aggregation and precipitation of soluble proteins: an electrostatic contribution of the Alzheimer's beta(25-35) amyloid fibril. *Biochemistry* 40, 2148-2154.
96. Koshiha T., Hayashi T., Miwako I., Kumagai I., Ikura T., Kawano K., Nitta K., Kuwajima K. (1999). Expression of a synthetic gene encoding canine milk lysozyme in *Escherichia coli* and characterization of the expressed protein. *Protein Eng* 12, 429-435.
97. Krebs M.R., Devlin G.L., Donald A.M. (2007). Protein particulates: another generic form of protein aggregation? *Biophys J* 92, 1336-1342.
98. Kumar-Singh S., Theuns J., Van Broeck B., Pirici D., Vennekens K., Corsmit E., Cruts M., Dermaut B., Wang R., Van Broeckhoven C. (2006). Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Hum Mutat* 27, 686-695.

99. Ladiwala A.R., Lin J.C., Bale S.S., Marcelino-Cruz A.M., Bhattacharya M., Dordick J.S., Tessier P.M. (2010). Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid Abeta into off-pathway conformers. *J Biol Chem* 285(31):24228-37.
100. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
101. Lambert M.P., Barlow A.K., Chromy B.A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T.E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K.L., Wals P., Zhang C., Finch C.E., Krafft G.A., Klein W.L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6448-6453.
102. Lashuel H.A., Petre B.M., Wall J., Simon M., Nowak R.J., Walz T., Lansbury P.T.Jr. (2002). Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol* 322, 1089-1102.
103. Lavedan C. (1998). The synuclein family. *Genome Res* 8, 871-880.
104. Lee H.J., Choi C., Lee S.J. (2002). Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem* 277, 671-678.
105. LeVine H., 3rd (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2, 404-410.
106. Lin H., Bhatia R., Lal R. (2001). Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *Faseb J* 15, 2433-2444.
107. Lin M.S., Chen L.Y., Tsai H.T., Wang S.S., Chang Y., Higuchi A., Chen W.Y. (2008). Investigation of the mechanism of beta-amyloid fibril formation by kinetic and thermodynamic analyses. *Langmuir* 24, 5802-5808.
108. Loferer H., Hammar M., Normark S. (1997). Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Mol Microbiol* 26, 11-23.
109. Lomakin A., Chung D.S., Benedek G.B., Kirschner D.A., Teplow D.B. (1996). On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection

- of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1125-1129.
110. Lovell M.A., Robertson J.D., Teesdale W.J., Campbell J.L., Markesbery W.R. (1998). Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 158, 47-52.
111. Luk K.C., Song C., O'Brien P., Stieber A., Branch J.R., Brunden K.R., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(47):20051-6.
112. Maji S.K., Wang L., Greenwald J., Riek R. (2009). Structure-activity relationship of amyloid fibrils. *FEBS Lett* 583(16):2610-7.
113. Makštienė J. (2005) Skydliaukės karcinomų morfologinis charakteristikos savitumų ir jų diagnostikos kriterijų įvertinimas. Daktaro disertacija. Kauno medicinos universitetas, Kaunas.
114. Malinchik S.B., Inouye H., Szumowski K.E., Kirschner D.A. (1998). Structural analysis of Alzheimer's beta(1-40) amyloid: protofilament assembly of tubular fibrils. *Biophys J* 74, 537-545.
115. Malisauskas M., Meskys R., Morozova-Roche L.A. (2008). Ultrathin silver nanowires produced by amyloid biotemplating. *Biotechnol Prog* 24 (5): 1166-70.
116. Malisauskas M., Zamotin V., Jass J., Noppe W., Dobson C.M., Morozova-Roche L.A. (2003). Amyloid protofilaments from the calcium-binding protein equine lysozyme: formation of ring and linear structures depends on pH and metal ion concentration. *J Mol Biol* 330, 879-890.
117. Mandal P.K., Pettegrew J.W., Masliah E., Hamilton R.L., Mandal R. (2006). Interaction between Abeta peptide and alpha synuclein: molecular mechanisms in overlapping pathology of Alzheimer's and Parkinson's in dementia with Lewy body disease. *Neurochem Res* 31, 1153-1162.
118. McKee–McKee: Biochemistry: The Molecular Basis Of Life, Third Edition, 2003.
119. McParland V.J., Kad N.M., Kalverda A.P., Brown A., Kirwin-Jones P., Hunter M.G., Sunde M., Radford S.E. (2000). Partially unfolded states of

- beta(2)-microglobulin and amyloid formation *in vitro*. *Biochemistry* 39(30):8735-46.
120. Meehan S., Berry Y., Luisi B., Dobson C.M., Carver J.A., MacPhee C.E. (2004). Amyloid fibril formation by lens crystallin proteins and its implications for cataract formation. *J Biol Chem* 279, 3413-3419.
121. Meersman F. and Dobson C.M. (2006) Probing the pressure-temperature stability of amyloid fibrils provides new insights into their molecular properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 452–60.
122. Meissner R., Weichel W., Koch R., Bachmatova I., Marcinkeviciene L., Meskiene R., Semenaite R., Casaite V., Meskys R. Glucose dehydrogenase and production thereof. Patent numeris WO2004099399, publikacijos data: 2004-11-18.
123. Mine S., Ueda T., Hashimoto Y., Imoto T. (1997). Improvement of the refolding yield and solubility of hen egg-white lysozyme by altering the Met residue attached to its N-terminus to Ser. *Protein Eng* 10(11):1333-8.
124. Morozova-Roche L.A. (2007). Equine lysozyme: the molecular basis of folding, self-assembly and innate amyloid toxicity. *FEBS Lett* 581(14):2587-92.
125. Nakamura M., Shishido N., Nunomura A., Smith M.A., Perry G., Hayashi Y., Nakayama K., Hayashi T. (2007). Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron. *Biochemistry* 46, 12737-12743.
126. Nichols M.R., Moss M.A., Reed D.K., Cratic-McDaniel S., Hoh J.H., Rosenberry T.L. (2005). Amyloid-beta protofibrils differ from amyloid-beta aggregates induced in dilute hexafluoroisopropanol in stability and morphology. *J Biol Chem* 280, 2471-2480.
127. Nichols, M. R., Moss, M. A., Reed, D. K., Hoh, J. H., and Rosenberry, T. L. (2005) Rapid assembly of amyloid-beta peptide at a liquid/liquid interface produces unstable beta-sheet fibers. *Biochemistry* 44, 165-173.
128. Nishida H., Kushida M., Nakajima Y., Ogawa Y., Tatewaki N., Sato S., Konishi T. (2007). Amyloid-beta-induced cytotoxicity of PC-12 cell was attenuated by Shengmai-san through redox regulation and outgrowth induction. *J Pharmacol Sci* 104, 73-81.

129. Nishihara K., Kanemori M., Yanagi H., Yura T. (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66(3):884-9.
130. Noppe W., Hanssens I., De Cuyper M. (1996). Simple two-step procedure for the preparation of highly active pure equine milk lysozyme. *J Chromatogr A* 719(2):327-31.
131. Ohnishi S., Takano K. (2004). Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell Mol Life Sci* 61, 511-524.
132. Olofsson A., Lindhagen-Persson M., Sauer-Eriksson A.E., Ohman A. (2007). Amide solvent protection analysis demonstrates that amyloid-beta(1-40) and amyloid-beta(1-42) form different fibrillar structures under identical conditions. *Biochem J* 404, 63-70.
133. Ono K., Noguchi M., Matsumoto Y., Yanase D., Iwasa K., Naiki H., Yamada M. (2005). Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes beta-amyloid fibril formation *in vitro*. *Neurobiol Dis* 20, 233-240.
134. O'Nuallain B., Shivaprasad S., Kheterpal I., Wetzel R. (2005). Thermodynamics of A beta(1-40) amyloid fibril elongation. *Biochemistry* 44, 12709-12718.
135. Paravastu A.K., Leapman R.D., Yau W.M., Tycko R. (2008). Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18349-18354.
136. Park S.M., Jung H.Y., Kim T.D., Park J.H., Yang C.H., Kim J. (2002). Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem* 277, 28512-28520.
137. Petkova A.T., Ishii Y., Balbach J.J., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Delaglio F., Tycko R. (2002). A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16742-16747.
138. Petkova A.T., Yau W.M., Tycko R. (2006). Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry* 45, 498-512.

139. Piccini A., Russo C., Gliozzi A., Relini A., Vitali A., Borghi R., Giliberto L., Armirotti A., D'Arrigo C., Bachi A., Cattaneo A., Canale C., Torrassa S., Saido T. C., Markesbery W., Gambetti P., Tabaton M. (2005). beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280, 34186-34192.
140. Pilkington S.M., Roberts S.J., Meade S.J., Gerrard J.A. (2010). Amyloid fibrils as a nanoscaffold for enzyme immobilization. *Biotechnol Prog* 26(1), 93-100.
141. Raffa D.F., Gomez-Balderas R., Brunelle P., Rickard G.A., Rauk A. (2005). *Ab initio* model studies of copper binding to peptides containing a His-His sequence: relevance to the beta-amyloid peptide of Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem* 10, 887-902.
142. Raman E.P., Takeda T., Barsegov V., Klimov D.K. (2007). Mechanical unbinding of abeta peptides from amyloid fibrils. *J Mol Biol* 373, 785-800.
143. Rasia R.M., Bertoncini C.W., Marsh D., Hoyer W., Cherny D., Zweckstetter M., Griesinger C., Jovin T.M., Fernandez C.O. (2005). Structural characterization of copper(II) binding to alpha-synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4294-4299.
144. Recchia A., Debetto P., Negro A., Guidolin D., Skaper S.D., Giusti P. (2004). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Faseb J* 18, 617-626.
145. Recchia A., Rota D., Debetto P., Peroni D., Guidolin D., Negro A., Skaper S.D., Giusti P. (2008). Generation of a alpha-synuclein-based rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 30, 8-18.
146. Reches M., Gazit E. (2003). Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science* 300(5619):625-7.
147. Rochet J.C., Lansbury P.T., Jr. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol* 10, 60-68.
148. Roy S., Dasgupta A.K. (2007). Controllable self-assembly from fibrinogen-gold (fibrinogen-Au) and thrombin-silver (thrombin-Ag) nanoparticle interaction. *FEBS Lett* 581(28), 5533-42.
149. Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G., Le Meur N., Laquerriere A., Vital A., Dumanchin C., Feuillette S., Brice A., Vercelletto M., Dubas F.,

- Frebourg T., Campion D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset in Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38, 24-26.
150. Rubin N., Perugia E., Goldschmidt M., Fridkin M., Addadi L. (2008). Chirality of amyloid suprastructures. *J Am Chem Soc* 130(14):4602-3.
151. Samanta D., Sawoo S., Sarkar A. (2006). In situ generation of gold nanoparticles on a protein surface: Fischer carbene complex as reducing agent. *Chem Commun (Camb)* 32, 3438-40.
152. Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E.F. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, second edition, published by Cold Spring Harbour Laboratory Press.
153. Schlorb C., Ackermann K., Richter C., Wirmer J., Schwalbe H. (2005). Heterologous expression of hen egg white lysozyme and resonance assignment of tryptophan side chains in its non-native states. *J Biomol NMR* 33, 95-104.
154. Schmidt M., Sachse C., Richter W., Xu C., Fändrich M., Grigorieff N. (2009). Comparison of Alzheimer Abeta(1-40) and Abeta(1-42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 19813-19818.
155. Schmittschmitt J.P., Scholtz J.M. (2003). The role of protein stability, solubility, and net charge in amyloid fibril formation. *Protein Sci* 12(10):2374-8.
156. Serpell L.C. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta* 1502, 16-30.
157. Sgourakis N.G., Yan Y., McCallum S.A., Wang C., Garcia A.E. (2007). The Alzheimer's peptides Abeta40 and 42 adopt distinct conformations in water: a combined MD / NMR study. *J Mol Biol* 368, 1448-1457.
158. Sharma R.C., Schimke R.T. (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20, 42-44.
159. Sharon R., Goldberg M., Bar-Josef I., Betensky R.A., Shen J., Selkoe D.J. (2001). alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(16):9110-5.
160. Shimohama S. (2009). Nicotinic receptor-mediated neuroprotection in neurodegenerative disease models. *Biol Pharm Bull* 32(3):332-6.

161. Shivaprasad S., Wetzel R. (2006). Scanning cysteine mutagenesis analysis of A β (1-40) amyloid fibrils. *J Biol Chem* 281, 993-1000.
162. Silvestri L., Camaschella C. (2008). A potential pathogenetic role of iron in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 12, 1548-1550.
163. Sipe J.D. Cohen A.S. (2000). Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* 130(2-3):88-98.
164. Smith D.G., Cappai R., Barnham K.J. (2007) The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta* 1768(8):1976-90
165. Southall S.M., Doel J.J., Richardson D.J., Oubrie A. (2006). Soluble aldose sugar dehydrogenase from *Escherichia coli*: a highly exposed active site conferring broad substrate specificity. *J Biol Chem*, 281:30650-30659.
166. Spencer A., Morozova-Roche L.A., Noppe W., MacKenzie D.A., Jeenes D.J., Joniau M., Dobson C.M., Archer D.B. (1999). Expression, purification, and characterization of the recombinant calcium-binding equine lysozyme secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niger*: comparisons with the production of hen and human lysozymes. *Protein Expr Purif* 16(1):171-80.
167. Steiner H., Capell A., Leimer U., Haass C. (1999). Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249, 266-270.
168. Stine W.B.Jr., Dahlgren K.N., Krafft G.A., LaDu M.J. (2003). *In vitro* characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 28; 278(13):11612-22.
169. Stromer T., Serpell L.C. (2005). Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril. *Microsc Res Tech* 67, 210-217.
170. Sunde M., Blake C. (1997). The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem* 50, 123-159.
171. Sunde M., Kwan A.H., Templeton M.D., Beever R.E., Mackay J.P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron* 39, 773-784.
172. Takano K., Tsuchimori K., Yamagata Y., Yutani K. (1999). Effect of foreign N-terminal residues on the conformational stability of human lysozyme. *Eur J Biochem* 266(2):675-82.

173. Takeshita K., Hashimoto Y., Thujihata Y., So T., Ueda T., Iomoto T. (2004). Determination of the complete cDNA sequence, construction of expression systems, and elucidation of fibrinolytic activity for *Tapes japonica* lysozyme. *Protein Expr Purif* 36, 254-262.
174. Talbot N.J. (2003). Aerial morphogenesis: enter the chaplins. *Curr Biol* 13, R696-698.
175. Tanaka S., Igarashi S., Ferri S., Sode K. (2005). Increasing stability of water-soluble PQQ glucose dehydrogenase by increasing hydrophobic interaction at dimeric interface. *BMC Biochem* 6, 1.
176. Tang Q., Shi S.Q., Zhou L. (2004). Nanofabrication with atomic force microscopy. *J Nanosci Nanotechnol* 4, 948-963.
177. Thapa A., Shahnawaz M., Karki P., Raj Dahal G., Golam Sharoar M., Yub Shin S., Sup Lee J., Cho B., Park I.S. (2008). Purification of inclusion body-forming peptides and proteins in soluble form by fusion to *Escherichia coli* thermostable proteins. *Biotechniques* 44, 787-796.
178. Thompson L.D., Derringer G.A., Wenig B.M. (2000). Amyloidosis of the larynx: a clinicopathologic study of 11 cases. *Mod Pathol* 13, 528-535.
179. Tjernberg L.O., Callaway D.J., Tjernberg A., Hahne S., Lilliehook C., Terenius L., Thyberg J., Nordstedt C. (1999). A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation. *J Biol Chem* 274, 12619-12625.
180. Tjernberg L.O., Tjernberg A., Bark N., Shi Y., Ruzsicska B.P., Bu Z., Thyberg J., Callaway D.J. (2002). Assembling amyloid fibrils from designed structures containing a significant amyloid beta-peptide fragment. *Biochem J* 366, 343-351.
181. True H.L., Lindquist S.L. (2000). A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* 407, 477-483.
182. Tsai C.J., Zheng J., Aleman C., Nussinov R. (2006). Structure by design: from single proteins and their building blocks to nanostructures. *Trends in Biotechnology* 24: 449-454.
183. Tsigelny I.F., Sharikov Y., Miller M.A., Masliah E. (2008). Mechanism of alpha-synuclein oligomerization and membrane interaction: theoretical approach to unstructured proteins studies. *Nanomedicine* 4, 350-357.

184. Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P., Abraham W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70, 1-32.
185. Urbanc B., Cruz L., Yun S., Buldyrev S.V., Bitan G., Teplow D.B., Stanley H.E. (2004). *In silico* study of amyloid beta-protein folding and oligomerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17345-17350.
186. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. (2001). Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* 276, 44284-44296.
187. van Gestel J., de Leeuw S.W. (2007). The formation of fibrils by intertwining of filaments: model and application to amyloid Abeta protein. *Biophys J* 92, 1157-1163.
188. van Raaij M.E., van Gestel J., Segers-Nolten I.M., de Leeuw S.W., Subramaniam V. (2008). Concentration dependence of alpha-synuclein fibril length assessed by quantitative atomic force microscopy and statistical-mechanical theory. *Biophys J* 95(10):4871-8.
189. Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Condron M.M., Teplow D.B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* 272, 22364-22372.
190. Walsh D.M., Selkoe D.J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101, 1172-1184.
191. Walsh D.M., Thulin E., Minogue A.M., Gustavsson N., Pang E., Teplow D.B., Linse S. (2009). A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta-peptide. *FEBS J* 276(5):1266-81.
192. Walsh D.M., Tseng B.P., Rydel R.E., Podlisny M.B., Selkoe D.J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39, 10831-10839.
193. Wang X., Liu L.H., Ramstrom O., Yan M. (2009). Engineering nanomaterial surfaces for biomedical applications. *Exp Biol Med* (Maywood) 234, 1128-1139.

194. Westlind-Danielsson A., Arnerup G. (2001). Spontaneous *in vitro* formation of supramolecular beta-amyloid structures, "beta-amy balls", by beta-amyloid 1-40 peptide. *Biochemistry* 40, 14736-14743.
195. Wiesehan K., Funke S.A., Fries M., Willbold D. (2007). Purification of recombinantly expressed and cytotoxic human amyloid-beta peptide 1-42. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 856(1-2):229-33.
196. Wood S.J., Maleeff B., Hart T., Wetzel R. (1996). Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide Aβ. *J Mol Biol* 256(5):870-7.
197. Wood S.J., Wypych J., Steavenson S., Louis J.C., Citron M., Biere A.L. (1999). alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem* 274, 19509-19512.
198. Woolfson D.N., Ryadnov M.G. (2006). Peptide-based fibrous biomaterials: Some things old, new and borrowed. *Curr Opin Chem Biol* 10(6):559-67.
199. Wösten H.A. (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* 55, 625-646.
200. Zavalova L.L., Baskova I.P., Barsova E.V., Snezhkov E.V., Akopov S.B., Lopatin S.A. (2004). Recombinant destabilase-lysozyme: synthesis de novo in *E. coli* and action mechanism of the enzyme expressed in *Spodoptera frugiperda*. *Biochemistry (Mosc)* 69(7):776-81.
201. Zhang F., Lin X.J., Ji L.N., Du H.N., Tang L., He J.H., Hu J., Hu H.Y. (2008). Assembly of alpha-synuclein fibrils in nanoscale studied by peptide truncation and AFM. *Biochem Biophys Res Commun* 368(2):388-94.
202. Zhang H.M., Yao S.J., Peng L.F., Shimizu K. (2004). Preliminary proteome analysis for *Saccharomyces cerevisiae* under different culturing conditions. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 20, 398-402
203. Zhang S., Marini D.M., Hwang W., Santoso S. (2002). Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins. *Curr Opin Chem Biol* 6, 865-871.
204. Zhao X., Zhang S. (2004). Fabrication of molecular materials using peptide construction motifs. *Trends Biotechnol* 22, 470-476.
205. Zhao X., Zhang S. (2007). Designer self-assembling peptide materials. *Macromol Biosci* 7, 13-22.

206. Zurdo J., Guijarro J.I., Dobson C.M. (2001). Preparation and characterization of purified amyloid fibrils. *J Am Chem Soc* 123(33):8141-2.