

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

ROKAS SAULIUS VASILIAUSKAS

(mikrobiologijos studijų programa)

Magistrinis darbas

**Rekombinantinio amiloido-beta agregatų formuotų dirbtiniame smegenų
skystyje tyrimai**

Darbo vadovas Dr. Andrius Sakalauskas
Darbo konsultantė Justina Versockienė
Biotechnologijų institutas

(parašas)

Studentas Rokas Saulius Vasiliauskas

(parašas)

Vilnius 2025

Turinys

Išvadas	3
Santrumpos	4
1. Literatūros apžvalga	5
1.1 Alzheimerio liga, jos tipai ir diagnozė	5
1.2 Amiloidai, A β struktūra ir toksiškumas	7
1.3 APP, jo procesavimas ir amiloidas β	9
1.4 Amiloidų plitimo mechanizmai	11
1.5 A β fiziologinė aplinka ir agregacija	12
1.6 A β_{42} agregacijos slopikliai, agregatus ardantys junginiai ir vaistiniai preparatai.....	14
1.7 Atominės jėgos mikroskopija ir kriogeninė atominė mikroskopija	17
2. Medžiagos ir metodai	20
2.1 Naudotos medžiagos.....	20
2.2 Taikyti metodai.....	22
2.2.1 Cheminė ląstelių transformacija, kultūros auginimas ir baltymo sintezė	22
2.2.2 Baltymo gryninimas	22
2.2.3 NDS-PAGE ir Tricino NDS-PAGE.....	23
2.2.4 Baltymų kinetika.....	24
2.2.5 Atominės jėgos mikroskopija (AJM).....	26
2.2.6 Kriogeninė elektronų mikroskopija	27
3. Rezultatai ir jų aptarimas	28
3.1 Gryninimo rezultatai	28
3.2 A β_{42} agregacijos kinetinių tyrimų rezultatai.....	31
3.3 Atominės jėgos mikroskopijos rezultatai	33
3.4 Kriogeninės elektronų mikroskopijos rezultatai	41
Išvados	44
Autoriaus asmeninis indėlis	45
Padėkos	46
SANTRAUKA.....	47
Literatūros sąrašas	49

Įvadas

Senstantis organizmas dažnai susiduria su įvairių sveikatos problemų rizikos padidėjimu. Vienas su senyvu amžiumi asocijuojamų sutrikimų yra demencija. Demencija apibrėžia tokias sveikatos problemas kaip bendrą atminties praradimą, sutrikusius kalbėjimo, problemų sprendimo įgūdžius ir kitus mąstymo sutrikimus. Bene didžiausias demencijos sukėlėjas yra Alzheimerio liga. Remiantis amiloidų hipoteze, šios ligos sukėlėjais laikomi amiloidai, agreguojantys tarpusavyje, pakitusios konformacijos baltymai. Šiuo metu turimi ir naudojami vaistai leidžia ligą tik sulėtinti, dažnai sukelia nepageidautinus šalutinius poveikius, taigi efektyviai veikiančio vaisto, kuris nesukeltų daug šalutinių poveikių, paieškos yra aktuali šiuolaikinės medicinos problema. Amiloidų agregaciją stabdančių vaistų efektyvumas priklauso nuo tyrimuose naudojamų tirpalų sudėties. Tikslus fiziologinių sąlygų atkartojimas gali paveikti Alzheimerio ligos sukėlėjo $A\beta_{42}$ amiloido agregacijos savybes, tokias kaip fibrilių morfologiją ir agregacijos greitį, taip pat paveikiant tiriamojo vaisto sąveiką su jo taikiniaus, teigiamai arba neigiamai paveikiant efektyvumą. Kuo artimesnių fiziologinėms sąlygoms tirpalų naudojimas gali paskatinti efektyvesnį vaistų nuo Alzheimerio ligos vystymą, sudarant tikslesnį pagrindą potencialių vaistų identifikavimui arba atmetimui ankstyvosiose vaistų paieškos stadijose. Agregacijos tyrimai padeda nustatyti $A\beta_{42}$ morfologines ir struktūrines savybes skirtinguose tirpaluose, įvertinant tarp naudojamų tirpalų susidarančius skirtumus.

Tikslas:

Įvertinti $A\beta_{42}$ amiloidinio baltymo agregacijos kinetinius parametrus ir morfologines savybes dirbtiniame smegenų skystyje dSS ir fiziologiniame tirpale PBS.

Uždaviniai:

1. Įvertinti $A\beta_{42}$ agregacijos kinetinių parametrų skirtumus dirbtiniame smegenų skystyje dSS ir fosfatų buferiniame tirpale PBS.
2. Įvertinti $A\beta_{42}$ agregatų morfologinius skirtumus (fibrilių dydį, aukštį, pasiskirstymą) dirbtiniame smegenų skystyje dSS ir fiziologiniame tirpale PBS.
3. Įvertinti morfologinius ir struktūrinius $A\beta_{42}$ amiloidinių agregatų skirtumus dirbtiniame smegenų skystyje dSS su ir be agregacijos slopiklio benzensulfonamido (VR16-09).

Santrumpos

AL – Alzheimerio liga;
APP – amiloidų baltymas prekursorius;
SS – smegenų skystis;
dSS – dirbtinis smegenų skystis;
TSS – tarpląstelinis smegenų skystis;
PBS – fosfato buferinis tirpalas (fiziologinis tirpalas);
CNS – Centrinė nervinė sistema;
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;
ASPS – su amiloidais susiję pakitimai smegenyse (*angl.* ARIA);
ASPS-E – su amiloidais susiję pakitimai smegenyse su edema (*angl.* ARIA-E);
ASPS-H – su amiloidais susiję pakitimai su smegenų kraujavimu (*angl.* ARIA-H);
NSPUV – nesteroidiniai prieš uždegiminius vaistai (*angl.* NSAID);
GSM – γ -sekretazę moduluojantys preparatai;
AJM – atominės jėgos mikroskopija;
PL – Parkinsono liga;
HL – Huntingtono liga;
TTR – transteritinas;
DSA – su dializę susijusios amiloidozės;
OT – optinis tankis;
a.r. – amino rūgštys;
TEM – transmisinis elektronų mikroskopas;
KPI – Kunitz proteazių inhibicinis domenas.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Alzheimerio liga, jos tipai ir diagnozė

Baltymų tirpumui ir funkcijai organizme įprastai reikalinga jiems specifinė trijų dimensijų konformacija. Dėl įvairių priežasčių funkcionalūs ir tirpūs baltymai gali pakeisti savo konformaciją ir įgauti savybes, kurios sukelia jų agregavimą į sankaupas, vadinamas amiloidais. Šių fibrilinių agregatų susiformavimas organizme yra susijęs su patologiniais susirgimais, vadinamais amiloidozėmis. Amiloidozės gali būti dviejų tipų – lokalizuotos arba sisteminės. Lokalizuotose amiloidozėse amiloidai kaupiasi sintezės vietoje organizme, sisteminėse – jie gali pasklisti į kitas organizmo dalis. Alzheimerio liga (AL), Parkinsono liga (PL) ir Huntingtono liga (HL) yra dažniausiai pasitaikančių lokalizuotų neurodegeneratyvinių amiloidozių pavyzdžiai. Sisteminių amiloidozių pavyzdžiai yra imunoglobulino lengvosios grandinės, transteritino (TTR) ir su dialize susijusios (DSA) amiloidozės, kurios gali paveikti daugiau nei vieną organą, plisdamos iš sintezės vietos organizme (Giorgetti et al., 2018; Girnius, 2013).

Alzheimerio liga (AL) yra neurodegeneracinis sutrikimas, kuris paveikia dalį vyresnio amžiaus žmonių. Ji pasižymi demencijos išsivystymu – progresyviu kognityvinių ir funkcinų sugebėjimų susilpnėjimu, įskaitant atminties praradimą, sutrikusią kalbą ir sprendimų priėmimą bei asmenybės pokyčius. Ligą pirmas aprašė Alois Alzheimer, bet pirmas ligos paminėjimas mums įprastu pavadinimu buvo 1910 metais, daktaro Emil Kraepelin knygoje „Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studirende und Aerzte“ (liet. „Psichiatrija: vadovėlis studentams ir gydytojams“)(Yang et al., 2016). Pasauliniu mastu, Alzheimerio liga sukelia 60-70% demencijos atvejų (World Health Organization, 2025). 2021 metų duomenimis JAV sergančiųjų Alzheimerio liga buvo 6,2 milijono žmonių (Alzheimer's Association, 2023). Naujausiais duomenimis JAV Alzheimerio liga diagnozuota daugiau nei 7 milijonams žmonių. Matoma kylanti tendencija, pagal kurią prognozuojama, kad 2050 metais AL atvejų (žmonėms virš 65 metų) JAV bus ~ 12,7 milijono. Alzheimerio liga JAV taip pat yra penkta dažiausia mirties priežastis žmonėms virš 65 metų (Alzheimer's Association, 2025). Lietuvoje 2022 metais žmonių, turinčių Alzheimerio ligos sukeltą demenciją, buvo 40474, naujausiais duomenimis šis skaičius jau siekia 43162 žmones (Higienos institutas, 2024; Higienos institutas, 2022).

Alzheimerio liga pasižymi dviem tipais: paveldima ir atsitiktine. Paveldima Alzheimerio liga yra sukeliamą genetinių mutacijų tokiuose genuose kaip *APP* (angl. amyloid precursor protein), *PSEN1* (angl. presenilin 1), *PSEN2* (angl. presenilin 2). Taip pat, paveldima forma, kuri sudaro ~ 5 % AL atvejų, yra retesnė nei sporadiška ir simptomai dažnai pasireiškia jaunesniems nei 65 metų žmonėms. Atsitiktinė arba sporadiška ligos forma yra dažnesnė nei paveldima ir jos atveju simptomai

pasireiškia vėliau, ji nėra paveldima ir, manoma, yra sukeliamą daugelio genetinių ir aplinkos faktorių kombinacijų (Piaceri et al., 2013).

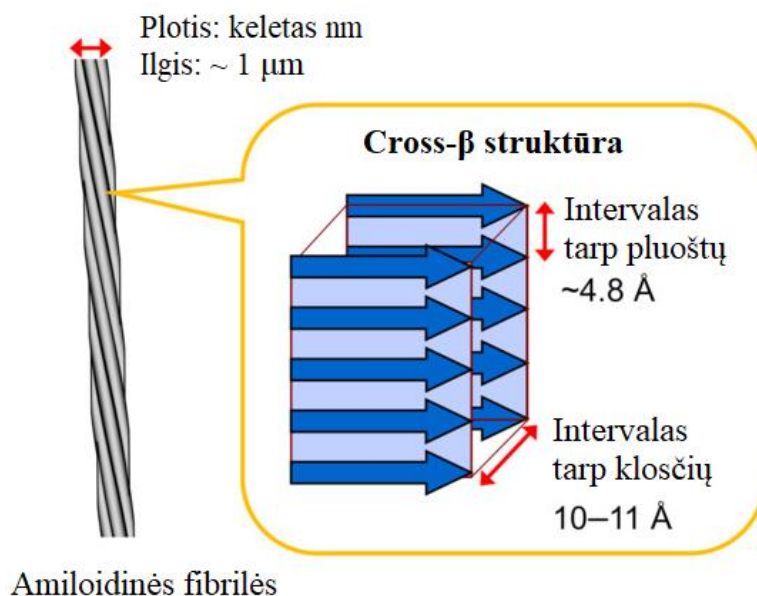
Šiaurinė APP geno mutacija A673V, esanti netoli β -sekretazės kirpimo srities, sudaro palankesnes APP kaip β -sekretazės substrato sąlygas, skatinant amiloidogenišką APP procesavimo kelią. Ši mutacija ne tik skatina amiloidogeniškų $A\beta$ formų gamybą, bet ir sustiprina gaunamų amiloidų agregacijos savybes ir citotoksiškumą. Ši mutacija buvo nustatyta tarp Šiaurės Italijoje gyvenančių brolio ir sesers, kurie turėjo homozigotinius recesyvinius genų alelius su A673V mutacija ir ankstyvame amžiuje pasireiškiančius Alzheimerio ligos simptomus. Pirmieji simptomai broliui, turinčiam šią mutaciją, pradėjo reikštis esant 36 metų ir per 10 metų liga išplito, sukeldama neįprastai didelius agregatų židinius smegenų žievėje, visų galūnių spazmus ir mirtį (Giaccone et al., 2010; Kimura et al., 2016). Visgi, yra genetinių mutacijų, kurios apsaugo nuo AL. „Islandiška“ APP geno mutacija A673T, aptikta skandinavų šalių ir Islandijos žmonių populiacijose, siejama su mažesniu amiloidogeniškų $A\beta$ formų kaupimusi ir apsaugine funkcija prieš Alzheimerio ligą (Jonsson et al., 2012).

Alzheimerio ligos diagnozavimas įprastai vykdomas apjungiant keletą skirtingų tyrimo metodų. Šie metodai susideda iš diagnostinių metodų ir kitų įvertinimų, tokių kaip medicininė asmens ir jo šeimos istorija, neurologiniai, kognityviniai ir funkciniai asmens įvertinimai. Diagnostinės priemonės įprastai naudojamos Alzheimerio ligos diagnozavimui susideda iš skirtingų smegenų vizualizavimo tyrimų, tokių kaip magnetinio rezonanso tyrimas (MRI), kompiuterinės tomografijos (CT) ir pozitronų emisijos tomografijos. Neuronų praradimas ar baltyminės sankaupos gali būti pastebimos naudojant smegenų vizualizavimo tyrimus, bet dažnai, norint atlikti tikslesnę diagnozę, šių metodų rezultatai vertinami kartu su smegenų skysčio (SS) ar kraujo plazmos tyrimų rezultatais (Frisoni et al., 2017; Alzheimer's Association, 2025). Pagrindiniai SS randami Alzheimerio ligos biomarkeriai yra bendras Tau baltymo skaičius (T-Tau), kuris sergančiuosiuose individuose gali būti pakilęs iki ~ 250 % palyginus su sveikais to paties amžiaus asmenimis. T-Tau padidėjimas gali būti aptinkamas laikotarpyje nuo pirmųjų ligos požymių iki visiško jos pasireiškimo – demencijos (prodrominis laikotarpis). Fosforilintas Tau baltymas (P-Tau) yra dar vienas AL biomarkeris, pasireiškiantis prodrominėje ligos stadijoje, kai matomi lengvi kognityviniai sutrikimai. Lyginant su to paties amžiaus kontrole, P-Tau kiekis SS gali būti pakilęs iki ~ 200 %. Taip pat, sumažėjęs smegenų skystyje randamas $A\beta_{42}$ kiekis, kurį sukelia $A\beta_{42}$ agregacija smegenyse, yra vienas iš AL biomarkerių. Šis pokytis taip pat aptinkamas prodrominėje ligos stadijoje (Blennow, 2017). Vienas iš potencialių AL biomarkerių yra padidėjęs baltymo neurogranino kiekis SS. Šis biomarkeris yra labiau specifiškas Alzheimerio ligai, nei T-Tau ir manoma, kad gali būti aptiktas ankstyvesnėse ligos stadijose. Taip pat, potencialus biomarkeris yra neurofilamentinė lengvoji grandinė (NFL). Padidėjęs NFL kiekis kraujo plazmoje siejamas su neurodegeneracija ir/ar aksonų pažaidomis. NFL gali būti aptinkamas

ankstyvosiose ligos stadijose ir pasižymi diagnostiniu patikimumu atitinkančiu prieš tai minėtus SS biomarkerius (Blennow, 2017). Vienas iš patikimiausių kraujyje (ir SS) randamų biomarkerių yra p-Tau217 peptido kiekis, kuris leidžia diagnozuoti A β ₄₂ sankaupas smegenyse 82 % tikslumu. Gebėjimas atlikti tokią tikslią diagnozę iš kraujo plazmos gali palengvinti ligos aptikimą nenaudojant invazinių metodų, tokių kaip liumbalinė punkcija. Taip pat, šio peptido koncentracija kraujyje priklauso nuo dienos laiko. Didžiausios koncentracijos randamos vakare, o mažiausios – ryte (Khalafi et al., 2025; Monica et al., 2024).

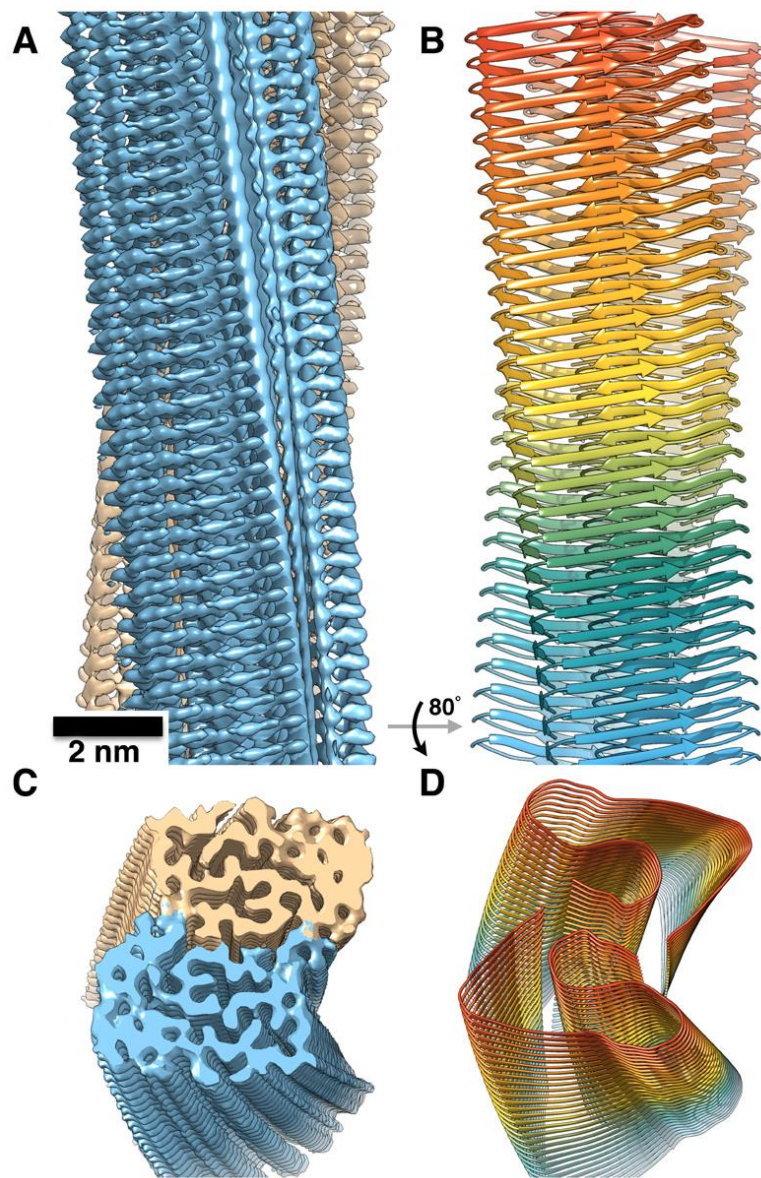
1.2 Amiloidai, A β struktūra ir toksiškumas

Amiloidai yra morfologiškai fibriliniai agregavę baltymai, turintys β -klosčių antrinę struktūrą, dar vadinamą kryžmine β (*angl.* Cross- β) (1. pav.). Žmogaus organizme amiloidai atsakingi už daugiau nei 50 neurodegeneracinių ligų. Amiloidų fibrilės formuojasi organizmo natyviems baltymams pakeičiant konformaciją. Tokių ligų pavyzdžiai yra Alzheimerio liga, Parkinsono liga ir kitos (Wille & Requena, 2018; Dobson, 2017).



1. Pav. Kryžminė- β amiloidų struktūra, sudaranti pagrindą amiloidinėms fibrilėms (Chatani et al., 2021)

A β oligomerai taip pat gali formuoti skirtingo tipo beta plokštės – paralelines ir antiparalelines. Paralelinėse plokštėse visi A β peptidai yra orientuoti ta pačia kryptimi (peptido C ir N galo atžvilgiu), o antiparalelinėse plokštelėse peptidų krypties orientacija skiriasi tarp klosčių. Įprastai oligomerai su paralelinėmis β plokštėmis formuojasi anksčiau ir jų agregacijos greitis yra lėtesnis, o antiparalelinės β plokštės formuojantys oligomerai agreguoja greičiau. Taip pat, manoma, kad antiparalelinės β plokštės formuojantys agregatai pasižymi didesniu toksiškumu (Zhaliaska et al., 2022).



2. Pav. $A\beta_{42}$ fibrilės su dviem sujungtais protofilamentais, iliustracija gauta kriogenines elektronų mikroskopijos būdu. Protofilamentai pažymėti mėlyna ir smėline spalvomis (A). Atominis paralelinių β -klosčių modelis vaizduojamas B. C ir D pasuktas vaizdas, parodantis protofilamentų persipinimo tašką ir karkaso modelį. (Gremer et al., 2018)

Naudojant kriogeninę elektronų mikroskopiją, Gremer (2018) grupė gavo aukštos rezoliucijos (4,0 Å) $A\beta_{42}$ fibrilės modelį (2. pav.). Šiame modelyje buvo pastebima, kad fibrilė sudaryta iš dviejų tarpusavyje susijungusių protofilamentų, kurie sudaro L ir S formas. Šie protofilamentai susieti per savo C galus, turi hidrofobinius klasterius, stabilizuojančius struktūros centrą, ir druskos tiltus (teigiamai įkrautų a.r. grandinių sąveiką su neigiamai įkrautomis a.r. grandinėmis), kurie padeda stabilizuoti baltymo karkasą. Fibrilių galai asimetriški, formuojantys vadinamas „keteros“ arba „griovio“ struktūras, manoma, sudarančias pagrindą fibrilių augimui. Iš skirtingų agregatų formų oligomerinė $A\beta_{42}$ forma laikoma toksiškiausia. Manoma, kad oligomerai gali pereiti biomimetines membranas ir sukelti receptorių medijuojamą citotoksiškumą, lizosominių kelių sutrigdymą, ląstelių

homeostazės sutrigdymą per viduląstelinį oligomerų kaupimąsi ir oksidacinį stresą (Vadukul et al., 2020; Vadukul et al., 2017). Oligomerų toksiškumas, manoma, yra proporcingai susijęs su jų dydžiu, kur mažesni oligomerai pasižymi didžiausiu toksiškumu, kuris mažėja jiems augant. Manoma, kad A β oligomerai, sąveikaudami su geležies ar vario jonais smegenyse, prisideda prie reaktyvių deguonies rūšių susidarymo, sukeliant oksidacinį stresą.

Dar vienas A β medijuojamas toksiškumas yra susietas su Tau baltymu. Tau yra mikrotubulių baltymai, randami neuronuose (daugiausiai aksonuose), jie stabilizuoja mikrotubules, padeda tarpląstelinėje pernašoje ir prisideda prie neuronų stabilumo palaikymo. A β oligomerai gali aktyvuoti kinazes, tokias kaip GSK3 β , CDK5 ir MAPKs. Šios kinazės fosforilina Tau baltymus, sukeliant jų atsiskyrimą nuo mikrotubulių, kas paskatina Tau konformacijos pokyčius ir agregaciją į neurofibrilinius raizginius (NFTs), sutrigdančius mikrotubulių stabilumą ir aksonų transportą, sukeliant sinapsių disfunkcijas (Zhang et al., 2021; Roy et al., 2023; Guo et al., 2017; Smith et al., 2007).

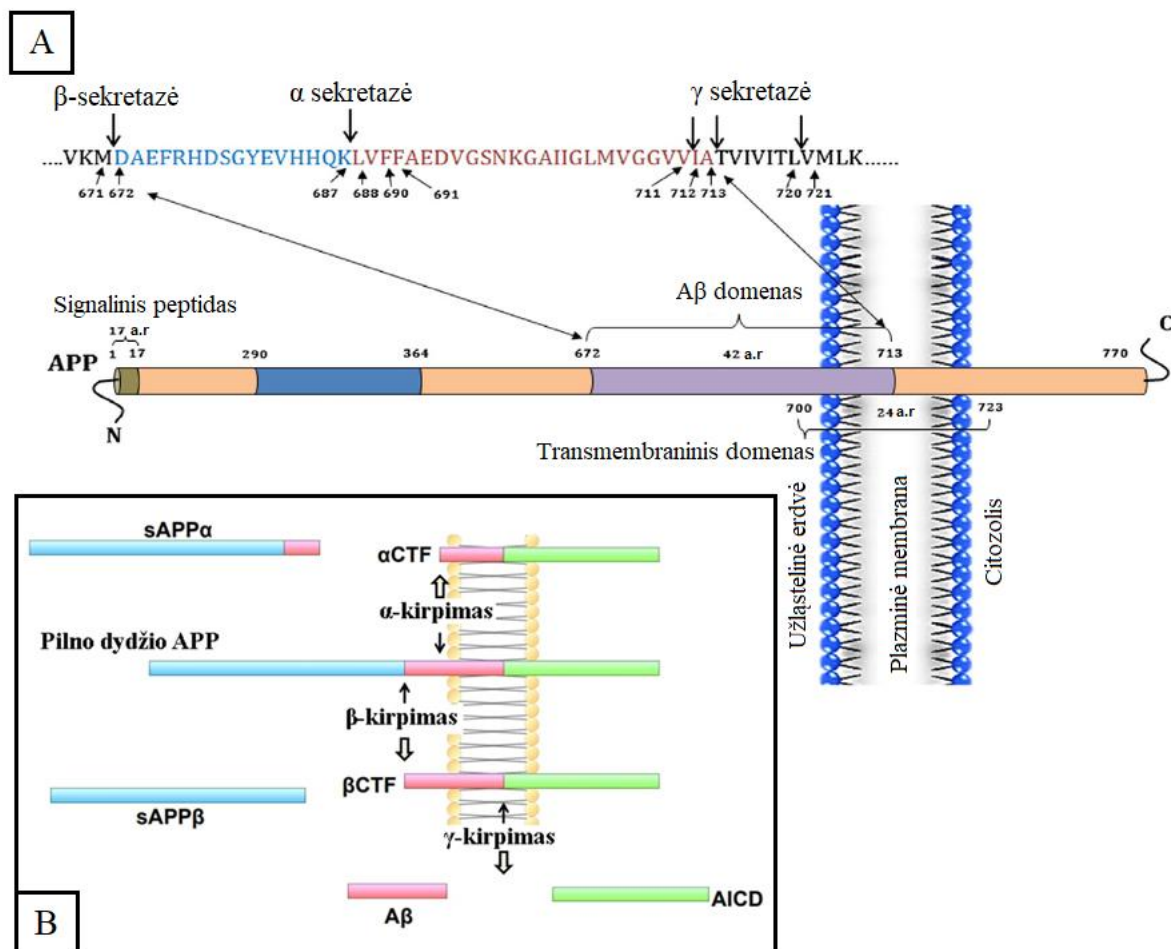
1.3 APP, jo procesavimas ir amiloidas β

Amiloidas β (A β) yra peptidas, gaunamas proteolitiškai karpant APP (*angl.* Amyloid precursor protein) baltymą. A β yra 36-43 aminorūgščių peptidas ir yra vienas iš dviejų pagrindinių mokslui šiuo metu žinomų baltymų, numanomi sukeliančių Alzheimerio ligą (Zhang et al., 2011; Hamley, 2012). A β gali būti skirtingų ilgio variacijų, bet *in vivo* daugiausiai aptinkamas A β ₄₀ kuris sudaro ~ 60 % viso A β peptido, randamo SS. A β ₃₈ sudaro ~ 15 %, A β ₄₂ ~ 10 % ir A β ₃₇ ~ 8 % . Kitos A β formos sudaro likusius ~ 7 %. Alzheimerio liga sergančiuose asmenyse šios procentinės vertės gali skirtis dėl sumažėjusio SS A β ₄₂ kiekio (Braun et al., 2022). APP baltymas, kuris karpomas sekretazėmis virsta A β amiloidu, žmonėse yra koduojamas 21 chromosomoje ir turi 3 pagrindines izoformas, atsirandančias per alternatyvų splaisingą:

- APP695 – sudarytas iš 695 aminorūgščių,
- APP751 – sudarytas iš 751 aminorūgšties,
- APP770 – sudarytas iš 770 aminorūgščių.

APP751 ir APP770 pasižymi 56 aminorūgščių Kunitz proteazių inhibiciniu domenu (KPI), esančiu ekstraląstelinėje baltymo dalyje. APP baltymams žinduoliuose priklauso du baltymai: APLP1 ir APLP2, kurie abu yra pirmo tipo transmembraniniai baltymai, pasižymintys A β ir E1 bei E2 konservatyviais domenais, esančiais ekstraląstelinėje baltymo dalyje (Zhang et al., 2011; Goate et al., 1991; Rohan de Silva et al., 1997). Manoma, kad APP baltymas gali dalyvauti sinaptogenezėje, baltymų pernešime per aksoną, transmembraninėje signalų transdukcijoje, ląstelių adhezijoje, kalcio metabolizme, bet visos šios numanomos funkcijos reikalauja daugiau *in vivo* tyrimų (Zhang et al., 2011; Zheng et al., 2006).

APP proteolitinis karpymas susideda iš trijų pagrindinių dalių (3. pav.): α -karpymo, β -karpymo, γ -karpymo. α -karpymo metu APP yra veikiamas α -sekretazės, veikiant šiai sekretazei nesusidaro A β , nes kirpimas vyksta ties A β domenu, ties Lys16-Lys17 jungtimi. Tai atskiria tirpų ektodomeną sAPP α , kuris yra svarbus neuronų plastiškumui ir išgyvenimui, reguliuoja nervinių kamieninių ląstelių proliferaciją, dėl to yra svarbus CNS formavimuisi, inhibuoja CDK5 aktyvaciją ir padeda apsaugoje nuo ekscitotoksiškumo (Zhang et al., 2011; Sisodia, 1992; Furukawa et al., 1996; Ohsawa et al., 1999).



3. Pav. APP transmembraninio baltymo proteolitinio karpymo schema, kurioje pateikiami sekretazių kirpimo taškai membranos atžvilgiu (A) ir atitinkamų sekretazių veikimo sukuriami produktai (B) (Sathya et al., 2012; Zhang et al., 2011).

Kita vertus, β -karpymas veikiant β -sekretaze yra pirmas žingsnis A β gavimo procese. BACE1 (*angl.* „Beta-site APP Cleaving Enzyme 1“) buvo identifikuota kaip proteazė, vykdanti šį kirpimą. BACE1 yra su membrana surišta aspartil proteazė, kerpanti APP ties Asp1 ir Glu11. Po kirpimo gaunamas sAPP β , kuris nuo sAPP α skiriasi A β 1-16 regiono trūkumu karboksiliniame gale. Visgi, minima, kad sAPP β funkcionuoja kaip mirties reporterio 6 ligandas, medijuojantis neuroninių ląstelių žūtį. Po α ir β proteolitinio karpymo susidaro α CTF ir β CTF peptidai (APP C-galo fragmentai). Šių

fragmentų funkcijos nėra tiksliai apibrėžtos, bet žinoma, kad padidinta β CTF ekspresija gali sukelti sinapsinio signalo perdavimo sutrikdymus ir neigiamą poveikį kognityvinėms funkcijoms, nepriklausomai nuo amiloidų sancaupų atsiradimo smegenyse. Atitinkami karboksilo galiniai fragmentai lieka prisijungę prie membranos ir toliau yra veikiami γ -sekretazių (Zhang et al., 2011; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

Svarbus etapas $A\beta$ formavimuisi yra γ -sekretazių vykdomas γ -karpymas. Kerpant α CTF lieka p83 fragmentas, kuris yra greitai suardomas, ir neturi jokių apibrėžtų funkcijų. Kerpant β CTF gaunamas $A\beta$. Šiuo atveju γ -sekretazių vykdomas kirpimas vyksta transmembraninėje aplinkoje ir tiksliai kirpimo vieta gali skirtis, kas lemia pagrindinių produktų $A\beta_{40}$ ir $A\beta_{42}$ susidarymą, iš kurių $A\beta_{42}$ yra labiau amiloidogeniškas. Bendrai, γ -karpymo metu gali susidaryti nuo 38 iki 43 amino rūgščių $A\beta$ variacijos, priklausomai nuo sekretazės kirpimo vietos (Florean et al., 2008; Braun et al., 2022). Pati γ -sekretazė numanoma yra kompleksas, sudarytas iš keturių komponentų:

- Presenilino (PS, PS₁ arba PS₂),
- Nikastrino,
- APH-1,
- PEN-2 (*angl.* preselin enhancer-2).

Iš šių komponentų, presenilinai buvo identifikuoti kaip svarbiausias katalitinis komponentas. Žinduoliuose yra du jo homologai – PS₁ ir PS₂. Mutacijos šiuose genuose, ypatingai PS₁ koduojančiame gene, yra viena pagrindinių paveldimos Alzheimerio ligos priežasčių (Zhang et al., 2011; Kim et al., 2014; Zhao et al., 2007).

Pagrindiniai γ -sekretazės proteolitinio karpymo produktai yra $A\beta_{40}$ ir $A\beta_{42}$; kaip ir minėta anksčiau, $A\beta_{42}$ yra labiau amiloidogeniškas, taip pat labiau hidrofobiškas ir dažniausiai sudaro apie 10 % bendro sudaryto $A\beta$ produkto. $A\beta_{42}$ bendrai skatina sinapsių disfunkcijas, fibrilių kaupimąsi tarpneuroninėje erdvėje ir galų gale neuronų veiklos praradimą paveiktose smegenų dalyse (Zhang et al., 2011).

1.4 Amiloidų plitimo mechanizmai

Alzheimerio ligos atveju, ląstelių pažeidimai būdingi specifinėse smegenų vietose, kas gali leisti manyti, kad plitimas gali būti savotiškai selektyvus. Kai kurių amiloidų, kaip $A\beta$, patogeniškumas (infektyvių amiloidų susikūrimas, dauginimasis ir plitimas) gali būti apibrėžiamas proteopatinių „sėklų“ modeliu (Jucker et al., 2018). Pirminis užsimezgimas (generacija) vyksta gyvenimo eigoje, susidarant pakitusios konformacijos baltymams. Amiloido pašalinimas iš ląstelės gali būti sąlygojamas ląstelės mirties, kontroliuojamos arba nekontroliuojamos egzocitozės. Plitimas gali vykti per egzomas, mikropūsles (*angl.* microvesicles), tuneliniais nanovamzdeliais. Taip pat, pernešimas gali vykti nenervinėmis ląstelėmis ir kūno skysčiais (Jucker et al., 2018). Sveikos ląstelės

perima amiloidus pasyvios arba aktyvios endocitozės būdu. Amiloidų replikaciją sveikoje ląstelėje sąlygoja tinkamų endogeninių baltymų – substratų, kurių konformaciją infektyvus amiloidas gali keisti, prieinamumas. Taip pat, plitimą sąlygoja atsparumas suardymui, šaperonai ir fragmentacija (Jucker et al., 2018). Visi šie faktoriai nulemia selektyvų pažeidžiamumą priklausomai nuo paveiktų ląstelių tipo ir nervinės sistemos regionų. Ekspresijos lygis ir konformaciją pakeitusių baltymų izoformos gali būti skirtingos priklausomai nuo ląstelių, kas gali varžyti plitimą arba nulemti kokios konformacijos baltymas vyraus (Jucker et al., 2018).

1.5 Aβ fiziologinė aplinka ir agregacija

Fiziologine Aβ aplinka yra asocijuojama su smegenimis ir smegenų skysčiu, kur jis atsiranda per mainus tarp tarpląstelinio smegenų skysčio – TSS (*angl.* brains interstitial fluid) ir smegenų skysčio – SS. TSS Aβ atsiranda po membraninio APP baltymo proteolitinio karpymo audinių ląstelėse. (Chen et al., 2017). Mainai tarp TSS ir SS yra valdomi glimfinės sistemos, kur SS įteka į smegenis šalia arterijų, maišydamasis su TSS, iš kurio surenka šalutinius produktus ir atliekas (įskaitant Aβ), kurie yra perduodami į venas. Šiuose mainuose ypatingai svarbūs astrocitiniai vandens kanalai kaip akvaporinas-4, kurie skatina konvekcinį skysčio judėjimą. Taip pat, Aβ gali būti pašalinamas iš smegenų per hematoencefalinį barjerą, per receptorius kaip LPR1, esantį ant hematoencefalinio barjero endotelio ląstelių.

Smegenų skystis yra plazmos filtratas, randamas smegenų skilveliuose, kaukolės ir stuburo subarachnoidinėse erdvėse. Jis atlieka tokias funkcijas kaip medžiagų pernešimo terpė, atliekų šalinimas ir smegenų apsauga. Suaugę žmonės turi ~ 150 mL smegenų skysčio. Smegenyse jis yra sekretuojamas gyslaininiame rezginyje. Kiekvieną dieną jo sekretuojama po 400-600 mL, taigi suaugusio žmogaus smegenyse smegenų skystis atnaujinamas ~ 4-5 kartus per 24 valandas (Telano et al., 2025). Gyslainės rezginys yra plonas epitelio sluoksnis, supantis fenestruotus kapiliarus, kur susidaro kraujo ir smegenų skysčio barjeras. Šis barjeras užtikrina smegenų aplinkos reguliavimą praleisdamas jonus ir smulkias molekules kaip vitaminai ir maistinės medžiagos, bet nepraleisdamas baltymų ar ląstelių. Vanduo pernešamas gyslainės rezginio epitelio ląstelių AQP1 kanalais. Kitos smegenims reikalingos medžiagos yra pernešamos per epitelio ląsteles aktyvios pernašos būdu arba sintetinos smegenyse. Gyslainės rezginio epitelio ląstelių membranose yra 5 mV teigiamos įtampos potencialas, dėl potencialų skirtumo natrio, chloro ir bikarbonato jonai yra traukiami iš plazmos į smegenų skystį. Tai sudaro vandenį į smegenų skystį traukiantį osmosinį slėgį (Telano et al., 2025). Smegenų skystyje gausiausiai randami natrio (135-150 mmol/L) ir chloro (115-130 mmol/L) jonai. Kiti smegenų skystyje esantys jonai yra kalio (2,6-3 mmol/L), kalcio (1-1,4 mmol/L) ir magnio (1,2-1,5 mmol/L). Smegenų skystyje gliukozės randama 2,8-4,4 mmol/L. Bendras smegenų skysčio pH yra 7,3, o osmosinis slėgis – 290 mOsm/kg H₂O. Smegenų skystyje randama 0,15-0,45

mmol/L baltymų iš kraujo plazmos, kuriuos sudaro albuminas, imunoglobulinai, leptinas ir prolaktinas. Taip pat smegenų skystyje yra transferino, IGF-2 ir BDNF baltymų, kurie yra sintetinami smegenyse. Smegenų skystyje randami vitaminai yra askorbo rūgštis, foliatai, tiaminas, monofosfatas, piridoksalis ir riboflavinai (Czarniak et al., 2023).

Aβ gali būti randamas ir sveikų žmonių smegenyse, kas paskatino fiziologiškai naudingų Aβ funkcijų paieškas (Robinson et al., 2002). Amiloidų kaskados hipotezė apibrėžia, kad Aβ atsiradimas smegenų parenchimoje yra Alzheimerio ligą inicijuojantis įvykis. Ši hipotezė vystėsi remiantis atliktais moksliniais tyrimais ir šiuo metu skirsto Aβ toksiškumą priklausomai nuo skirtingų Aβ formų (Aβ₄₀ ir Aβ₄₂) paplitimo smegenyse (Karran et al., 2011). Vienas iš Alzheimerio ligos biologinių žymenų yra sumažėjęs Aβ₄₂ kiekis smegenų skystyje. Visgi, tyrimų metu nustatyta, kad efektyvesnis Alzheimerio ligos nustatymo žymuo yra Aβ₄₀ ir Aβ₄₂ santykis (Constantinides et al., 2023). Dviejų skirtingų Aβ izoformų santykio vertinimas, bandant aptikti Alzheimerio ligą, yra paremtas šių dviejų formų skirtumais. Pastebėta, kad Aβ₄₀ gali turėti inhibicinį efektą amiloidų sankaupų formavimui *in vivo*. Tai įvertinta nustatant, kad sinapsių suardymas buvo mažesnis pelėse, kurios turėjo padidintą Aβ₄₀ ekspresiją (Qiu et al., 2015).

Aβ patologija prasideda, kai organizme dėl β ir γ sekretazės veiklos pagaminama daugiau amiloidogeniškų peptidų (Aβ₄₀ ir Aβ₄₂). Jie linkę sparčiai agreguoti, kas apsunkina jų pašalinimą iš SS. Aβ peptidų agregacija skaidoma į tris pagrindinius etapus. Pirminė nukleacija, kurios metu monomerai agreguoja tarpusavyje tirpale arba ant objekto paviršiaus, suformuodami stabilias struktūras, vadinamas „branduoliais“. Ilgėjimo etapas, kurio metu monomerai jungiasi prie suformuotų stabilių oligomerinių struktūrų suformuodami fibriles. Paskutinis iš trijų etapų yra antrinė nukleacija, kurios metu monomerai jungiasi tarpusavyje ant jau suformuotos fibrilės, naudodami ją kaip matricą naujų fibrilių formavimui. Smulkūs oligomerai turi didelį kiekį laisvosios energijos, kas leidžia jiems lengvai disocijuoti į monomerinę formą, taigi „branduoliais“ laikomi mažiausi galimi stabilūs oligomerai, kurie auga greičiau prisijungdami monomeras nei spėja disocijuoti į monomeras (Linse, 2019). Visi šie etapai gali vykti vienu metu, taip pat fibrilėms būdinga fragmentacija – procesas, kurio metu fibrilės skyla pasiekusios kritinį ilgį. Atskilusios fibrilių dalys gali paskatinti greitesnę agregatų formavimąsi (Linse, 2019; Xue et al., 2010).

Nors skiriasi tik dvejomis aminorūgštimis C galo regione, Aβ₄₂ ir Aβ₄₀ agreguoja skirtingai. Aβ₄₂ dimerų konformacinė įvairovė didesnė nei Aβ₄₀, taip pat pH 7 Aβ₄₂ linkęs formuoti dimerus per C galo domeną, o Aβ₄₀ labiau linkęs formuoti dimerus per N galo domeną. Ankstyvose agregacijos etapuose Aβ₄₀ gali būti randamas monomero, dimero ar tetramero formose. Tetramero formos Aβ₄₀ nėra linkusi prisijungti papildomų monomerų ar dimerų, kas sulėtina didesnių oligomerų formavimą ir agregaciją. Kita vertus, Aβ₄₂ ankstyvose agregacijos stadijose gali būti randamas ir stabiliose pentamero ar heksamero formose, šie vadinami „para-branduoliais“ gali lengvai jungtis į

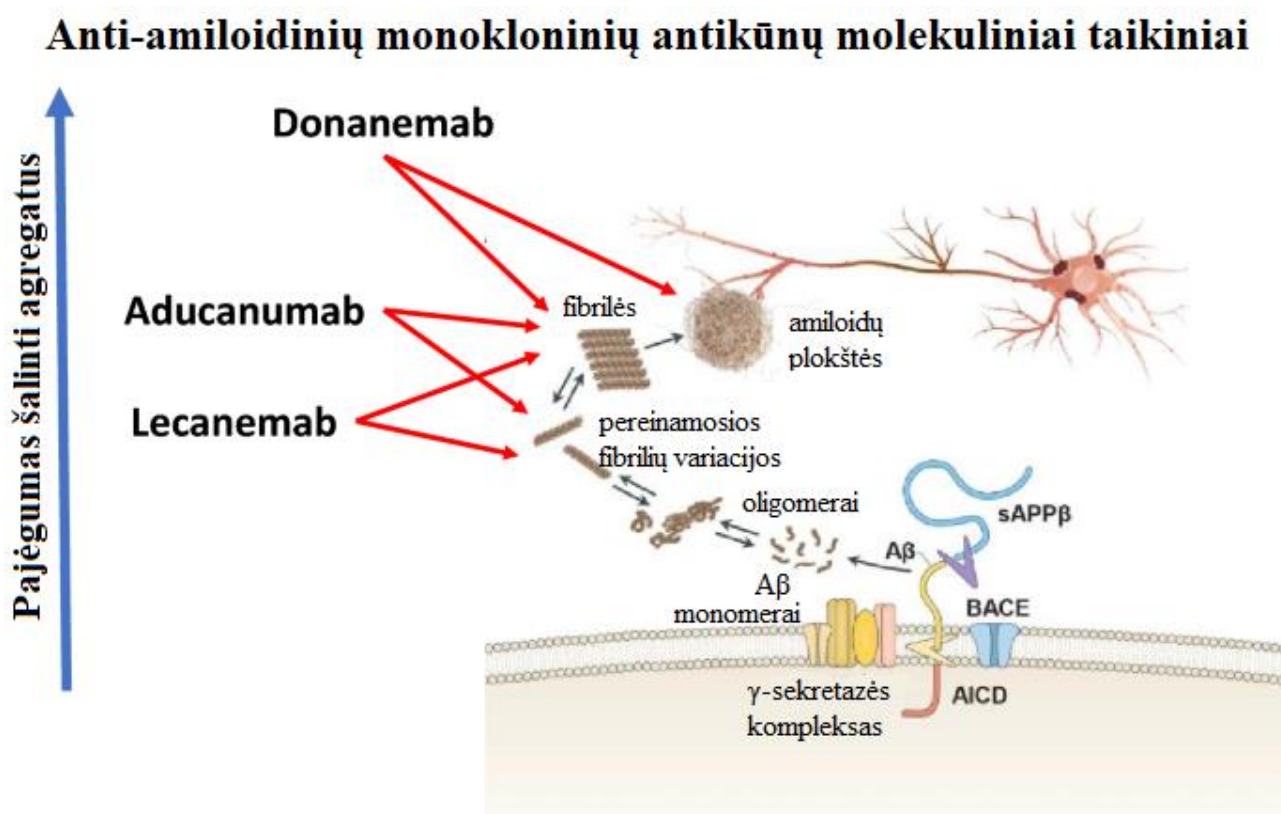
dodekamerines struktūras, greičiau formuodami didesnės masės oligomerus ir protofibriles (Barz et al., 2012; Cote et al., 2012; Kim et al., 2011; Kim et al., 2014; Bitan et al., 2002; Bernstein et al., 2009; Viet et al., 2012). C galo regionas yra svarbi Aβ agregacijos mechanizmo dalis. Tyrimais parodyta, kad Aβ₄₂ C galo regionas yra labiau struktūriškai stabilus, nei Aβ₄₀. S-oksiduotas katijono radikalas iš 35 pozicijos metionino, gali būti gaunamas sąveikaujant su 10 pozicijos tirozino tirozilio radikalų. Tokia sąveika parodė, kad Aβ₄₂ struktūroje yra pasisukimas ties 22 ir 23 aminorūgštimis. S-oksiduotas katijono radikalas yra stabilizuojamas C galo karboksilo grupių formuojant β plokštės struktūrą. Minėtas katijono radikalas siejamas su neurotoksiškumo efektais, kas parodyta β posūkį pašalinančia mutacija 22 aminorūgšties pozicijoje. Taip pat, nuo C galo yra priklausomas tetramero struktūros stabilumas (Irie et al., 2005; Socher et al., 2014; Bitan et al., 2002; Viet et al., 2012).

1.6 Aβ₄₂ agregacijos slopikliai, agregatus ardantys junginiai ir vaistiniai preparatai

Tarpusavyje agreguodami Aβ₄₂ oligomerai formuoja fibriles ir vėliau plokštes. Žmonėse šių didesnių struktūrų suformavimas gali pasirodyti kaip beveik negrįžtamas procesas dėl fibrilių ir β klosčių suardymo sudėtingumo. Visgi, fibrilių tirpdyimas ir ardymas nėra visiškai neįmanomas ir keletas junginių pasižymėjo savybėmis, galinčiomis jas ardyti, taip pat vykdomi tyrimai su junginiais, galinčiais sulėtinti arba sustabdyti agregaciją. Tam tikslui pritaikyti ir tiriami kai kurie šaperoniniai baltymai arba antikūnai, kurie parodė efektyvumą.

Vieninteliai šiuo metu patvirtinti vaistiniai preparatai Alzheimerio ligos gydymui yra monokloniniai antikūnai. Vienas iš jų yra Aducanumab, rekombinantinis antikūnas, gautas iš sveikų vyresnio amžiaus žmonių kraujo limfocitų bibliotekos. Aducanumab epitopas atpažįsta Aβ₄₂ 3-7 amino rūgščių liekanas, sudarydamas kompleksą, kuris leidžia suardyti didesnės struktūros agregatus, kaip fibriles ir plokštes (4. pav.). Tikslus suardymo procesas nėra aiškus, bet manoma, kad jis susijęs su mikroglijos medijuojama fagocitoze (Arndt et al., 2018). Aducanumab buvo pirmas JAV patvirtintas vaistinis preparatas, skirtas Alzheimerio ligos gydymui, tačiau, šiuo metu jo gamyba yra nutraukta. Šis vaistinis preparatas buvo patvirtintas pagreitinta tvarka, bet dėl galimų šalutinių poveikių vaistas buvo kontroversiškas. Aducanumab asocijuojamas su tokiais šalutiniais poveikiais kaip smegenų edema ir kraujavimas (Alzheimer's Association, 2025; Tampi et al., 2021). Šiuo metu yra patvirtinti dar du monokloniniai antikūnai Donanemab ir Lecanemab, skirti sergantiems nepažengusia ar ankstyva Alzheimerio ligos forma (Alzheimer's Association, 2025). Donanemab yra monokloninis antikūnas, kuris jungiasi prie 3 Aβ₄₂ pyroglutamato aminorūgšties liekanos, suformuodamas kompleksą su fibrilėmis ar amiloidų plokštelėmis, kuris inhibuoja agregaciją ir skatina agregatų šalinimą (4. pav.). Po 72 savaičių gydymo 26,7 % pacientų patyrė su amiloidais susijusių pakitimų (ASPS), o 6,1 % patyrė su amiloidais susijusių pakitimų su edema (ASPS-E).

Tyrimo grupėje, gaunančioje Donanemab, 90 % pacientų išvystė antikūnus prieš vaistinį preparatą. Daugumos pacientų kognityvinės funkcijos ir gyvenimo kokybė po 72 savaičių gydymo buvo geresnė nei placebo grupės. Lecanemab yra žmogui pritaikyta IgG1, pelės mAb158 antikūno iteracija. Pagrindinis šio antikūno taikiny yra A β protofibrilės (4. pav.), kurios yra tirpios ir veikia neurotoksiškai, trikdydamos atminties funkcijai svarbias elektrofiziologines smegenų sistemas. Lecanemab pasižymėjo mažiausia (21,5 %) iš naudojamų antikūnų ASPS tikimybe. Ši statistika apima ir ASPS-E ir ASPS-H (su amiloidais susiję pakitimai su smegenų kraujavimu) (Ameen et al., 2024; Hampel et al., 2023).



4. Pav. Anti-amiloidinių monokloninių antikūnų Aducanumab, Lecanemab ir Donanemab molekuliniai taikiniai ir agregatų šalinimo efektyvumą vaizduojanti iliustracija (Leisher et al., 2023).

Kita strategija, naudojama kuriant agregaciją slopinančius potencialius vaistinius preparatus, yra pagrįsta peptidais. Viena iš tokių peptidų vystė John R Horsley grupė (Horsley et al., 2020). Šis heksapeptidas, kurio pavadinimas straipsnyje nebuvo nurodytas, turi A β ₄₂ atpažinimo elementą – KLVFFA ir yra paremtas hidrofobine A β ₄₂ peptido dalimi. Sukonstruotame peptide buvo naudojamos D-aminorūgštys, padidinant komplementarumą su A β ₄₂, taip pat inhibiciniame peptide yra C galo elementas, trikdamas tolimesnį monomerinių A β ₄₂ prisijungimą. Tyrimų metu parodytas specifiskas

inhibicinio peptido prisijungimas prie $A\beta_{42}$ ir agregaciją inhibuojantis efektas. Nustatyta, kad sukonstruotas peptidas nepasižymi citotoksiškumu (Horsley et al., 2020). Kiti peptidai, naudojami $A\beta_{42}$ agregacijos stabdymui, yra homotaurinas ir scilo-inozitolis. Homotaurinas ir scilo-inozitolis yra praėję antrą klinikinių tyrimų fazę. Abu šie preparatai inhibuoja $A\beta_{42}$ agregaciją, bet klinikinių tyrimų progresą stabdo nepastovūs efektyvumo rezultatai ir šių peptidų nespecifiškumas $A\beta_{42}$ (Tillet et al., 2020; Villegas et al., 2015). Taigi, modifikuotų karkasų peptidai, paremti agregacijai atspariais $A\beta_{42}$ segmentais, yra alternatyva, leidžianti užtikrinti specifiškumą. Pagrindinės taikomos karkaso modifikacijos yra N-galo amininimas arba metilinimas, padidinančios proteolitinį ir konformacinį stabilumą, ir galimai padedančios pernešime per hematoencefalinį barjerą (Tillet et al., 2020). Khallilia C. Tillet grupė atliko tyrimą, kurio metu buvo susintetinti 14 $A\beta_{42}$ agregaciją inhibuojantys N-amininti heksapeptidai, paremti $A\beta_{42}$ KLVFFA agregacijai atspariu regionu. Jų agregacijos inhibicijos efektyvumas buvo vertinamas tarpsusavyje, taip pat į tyrimą įtraukiant nemodifikuotą heksapeptidą. Efektyviausią inhibicinį poveikį parodė di-aminintas 14 peptidas. Pasiūlytas veikimo mechanizmas pagrįstas peptido prisijungimu prie fibrilių ir vandenilinio ryšio tarp β klosčių blokavimu, užkertant kelią tolimesnei agregacijai (Tillet et al., 2020).

Kita strategija, taikoma stengiantis kurti potencialius vaistinius preparatus, yra paremta sekretazėmis. Vienas iš taikomų metodų yra BACE1 (β -sekretazės) inhibicija. Prieš tai aptarta, kad β -sekretazė yra pirmas APP baltymo proteolitinio karpymo žingsnis, vedantis į $A\beta_{42}$ gavimą. Tam gali būti naudojami ir peptidiniai, ir ne peptidiniai inhibitoriai. Vienas iš peptidinių β -sekretazės inhibitorių yra OM99-2, veikiantis kaip pereinamosios būsenos analogas, atitikdamas tetraedrinį proteolitinės β -sekretazės katalizuojamos reakcijos produktą ir prisijungdamas prie β -sekretazės aktyviojo centro, inhibuodamas jos veiklą (Ghosh et al., 2014). Kitas potencialus taikinytis buvo γ -sekretazė. Vienas iš potencialių vaistinių preparatų „Semagacestat“, ne peptidinės kilmės mažų molekulių principu sukurtas inhibicinis preparatas, trečioje klinikinių tyrimų fazėje buvo atšauktas dėl neveiksmingumo ir potencialaus simptomų apsunkinimo (Doody et al., 2013). Visgi, γ -sekretazės išlieka potencialiu terapiniu taikiniu. Šiuo metu vystoma kitokia strategija, paremta γ -sekretazės veiklos moduliavimu o ne inhibicija, taip sumažinant amiloidogeniškų $A\beta$ ($A\beta_{42}$ ir $A\beta_{40}$) gamybą organizme, bet tuo pačiu neužkertant kelio γ -sekretazės veiklai. Šiuo metu su dauguma šių γ -sekretazę moduliuojančių preparatų (GSM) atliekami iki klinikiniai tyrimai. GSM yra nepeptidinės mažos molekulės, kurios prisijungia prie γ -sekretazės komplekso ir alosteriškai moduliuoja sekretazės veikimą, skatinant didesnę ne amiloidogeniškų $A\beta_{37}$ ir $A\beta_{38}$ gamybą. GSM pagal savo cheminę struktūrą gali būti išskiriami kaip imidazolu paremti GSM, karboksilo rūgštimi paremti GSM, nesteroidiniais prieš uždegiminius vaistus (NSPUV) paremti GSM. Kai kurie iš šių preparatų jau patikrinti pirmos fazės klinikiniuose tyrimuose. Vienas iš jų yra NSPUV principu sukurtas modulatorius E2012, kuris 50 % sumažino plazmoje aptinkamą $A\beta_{42}$. Visgi, jis turėjo tokius

šalutinius poveikius kaip cholesterolio metabolizmo sutrikdymas, kas galėjo paskatinti kataraktos išsivystymą. Tai buvo išspręsta su naujesniu GSM E2212, kuris neturėjo tokio šalutinio poveikio. Visgi, E2212, kaip ir kai kurie kiti γ -sekretazės modulatoriai, buvo nutrauktas dėl nenurodytų priešasčių. Taigi, GSM yra potenciali terapinė strategija, reikalaujanti tolimesnių tyrimų, kurie reikalingi norint geriau suprasti jos efektyvumą (Nordvall et al., 2023).

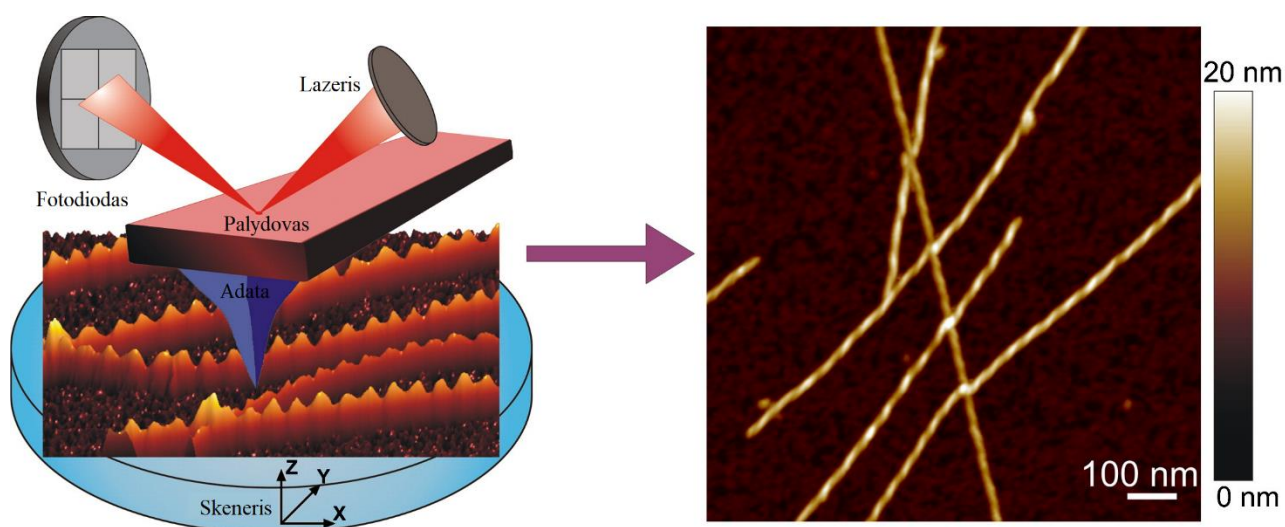
Kitokios smulkios molekulės taip pat tiriamos kaip galimi A β agregacijos inhibitoriai. Vieni iš jų yra benzensulfonamidai. Šie junginiai, turintys sulfonamido grupę, per sierą sujungtą su benzeno žiedu, yra potenciali vėžinių susirgimų gydymo priemonė dėl gebėjimo inhibuoti anglies anhidrazes (su navikais susijęs fermentas). Visgi, benzensulfonamidai pasižymi amiloidų kaip alfa sinukleinas ir A β_{42} agregacijos slopinimu. Potencialus veikimo mechanizmas, kaip ir su prieš tai minėtais peptidų pagrindu veikiančiais agregacijos slopikliais, manoma, kad yra paremtas benzensulfonamido sąveika su hidrofobiniu A β fragmentu KLVFFAE, kuris pasiūlytas kaip agregaciją skatinanti A β dalis. Benzensulfonamidai sąveikauja su A β_{42} monomerais ir smulkiais oligomerais (Žvirblis et al., 2024; Selim et al., 2025; PubChem, 2025). Tiriant skirtingų cheminių modifikacijų benzensulfonamidus, A β_{42} agregacijos pusperiodį padidinti pavyko naudojant daug skirtingų modifikacijų, iš kurių efektyviausios buvo grupė su sulfonamido modifikacijomis (Žvirblis et al., 2024).

Taip pat, amiloidų agregatus veikiančių vaistų tyrimų rezultatai *in vitro* gali skirtis priklausomai nuo naudojamų buferinių tirpalų. Vienas iš to pavyzdžių yra dviejų potencialių agregacijos inhibitorių – oksiduoto polifenolio EGCG ir fluorinto benzensulfonamido VR-16-09 – efektyvumo tyrimas, atliktas dirbtiniame smegenų skystyje (dSS), turinčiame pagrindinius smegenų skysčio komponentus ir PBS tirpale. Šis tyrimas parodė sumažėjusį EGCG inhibicinį efektyvumą dSS ir nežymiai padidėjusį VR-16-09 inhibicinį efektyvumą, kuris, manoma, buvo sukeltas albumino, esančio dSS tirpale. Tai parodo, kad inhibicinis vaisto potencialas *in vitro* gali skirtis priklausomai nuo naudojamo tirpalo ir turi būti vertinamas parenkant sąlygas, artimiausias fiziologinėms (Sakalauskas et al., 2023).

1.7 Atominės jėgos mikroskopija ir kriogeninė atominė mikroskopija

Amiloidų fibrilės yra struktūruoti junginiai, pasireiškiantys Alzheimerio ligos ir kitų amiloidinių patologijų atveju. Šios struktūros yra svarbios biologijos ir medicinos tyrimuose bei turi pritaikymus nanotechnologijų srityje. Fizikinių ir mechaninių fibrilių savybių bei jų formavimosi ypatumai yra svarbūs norint suprasti jų biologinę rolę medicininiais ar kitiems tikslams. Atominės jėgos mikroskopija (AJM) yra priemonė, leidžianti tirti topografines, chemines, elektrines, magnetines, optines ir mechanines mėginio paviršiaus savybes (Adamcik et al., 2012). Atominės jėgos mikroskopas veikia palydovui vedant aštrią adatą per mėginio paviršių. Atliekamas paviršiaus nuskaitymas – vaizdo fiksavimas ir perdavimas. Adata yra prijungiama prie lanksčios atramos, prijungtos prie palydovo. Piezoelektrinis keraminis skeneris valdo palydovo horizontalią ir vertikalią

poziciją paviršiaus atžvilgiu. Adatai judant per paviršių atramos pozicijos pokyčiai yra sekami lazerio, kurio atspindėjimo pokyčiai fiksuojami pozicijai jautriu fotodetektoriumi. Atgalinio ryšio sistema leidžia valdyti vertikalią skenerio poziciją užtikrinant pastovų lazerio atspindėjimą ir kontaktą su paviršiumi. Surenkami koordinatinių duomenys yra konvertuojami į trijų dimensijų topografinį vaizdą. Amiloidų tyrimuose šie topografiniai žemėlapiai leidžia įvertinti agregatų būseną (sankaupų buvimą ir pasiskirstymą) bei jų morfologines savybes tokias kaip aukštį, ilgį, plotį ir periodiškumą (NanoAndMore, 2025; Adamcik et al., 2012).



5. Pav. Atominės jėgos mikroskopijos veikimo principas skenuojant paviršių ir prietaiso komponentai (kairėje), bei amiloidinių fibrilių vizualizacija su aukščio ir dydžio skalėmis (dešinėje) gaunama programiškai apdorojus gautus atominės jėgos mikroskopijos duomenis (Adamcik et al., 2012).

Atominės jėgos mikroskopija skirstoma į kontaktinę, osciliuojančią ir bekontaktę. Kontaktinės AJM (pavaizduota 5. pav.) metu, adata turi pastovų kontaktą su mėginio paviršiumi. Osciliuojančioje atominės jėgos mikroskopijoje adatos laikiklis ritmiškai pakyla ir nusileidžia pagal nustatytą amplitudę ilgiau išsaugant adatos efektyvumą. Osciliacinė AJM įprastai naudojama tiriant minkštus mėginius arba mėginius su prastai besilaikančiais tiriamaisiais objektais. Bekontaktinio AJM metu fiksuojamos Van der Valso jėgos palydovas osciliuoja, bet adata nesudaro kontakto su paviršiumi (NanoAndMore, 2025).

Kita efektyvi priemonė amiloidinių agregatų tyrimams yra kriogeninė elektronų mikroskopija (cryo-EM). Šis metodas buvo efektyviai naudojamas vizualizuoti ląstelių, virusų ir baltymų struktūras. Gaunamų duomenų rezoliucija yra molekulinio lygmens, kas yra ypatingai naudinga tiriant amiloidines fibriles. Molekulinio lygmens duomenys gali padėti giliau suprasti agregacijos mechanizmus ir slopinimo veikimo principus, vertinant molekulinis sąveikos skirtumus tarp fibrilių

paveiktų agregacijos inhibitoriais ir fibrilių nepaveiktų inhibitoriais. Cryo-EM leidžia geriau suprasti agregacijos skirtumus tarp skirtingų Alzheimerio ligos tipų (paveldimos ir sporadiškos), taip pat įvertinti agregacijos skirtumus tarp fibrilių gautų *in vitro* ir klinikinių mėginių, padedant užtikrinti efektyvų inhibitorių vystymą ir *in vitro* tyrimams naudojamų tirpalų tobulinimą (bandant sukurti tirpalus, kurie sudarytų sąlygas, artimesnes fiziologinėms) (Milne et al., 2013; Yang et al., 2022). Kriogeninės elektronų mikroskopijos metu vaizdas išgaunamas naudojant transmisinį elektronų mikroskopą (TEM). Vizualizacija gali būti atliekama skirtingais elektronų mikroskopais, įprastai pirminė vizualizacija vykdoma paprastesniais senesniais TEM prietaisais, kur elektrono signalas paverčiamas fotonais vaizdui išgauti. Tokie paprastesni prietaisai veikia kaip tarpinis įvertinimas siekiant suprasti, ar mėginys yra paruoštas teisingai ir ar pavyko užšaldymas. Vėliau optimizuoti mėginiai fotografuojami brangesniais mikroskopais, o gaunamų nuotraukų kiekis gali siekti keletą tūkstančių. Surinkti duomenys yra apdorojami. Pirmiausia yra koreguojama nuotraukų kokybė. Kadangi cryo-EM nuotraukos daromos ne kaip pavienės nuotraukos o kaip filmai, kurie gali turėti 100 kadrų per sekundę, pirmiausia kadrai yra sulyginami ir šalinami neryškumai. Koreguojami optikos netikslumai ir nuotraukose yra atrenkami regionai, turintys mėginį. Tai gali būti atliekama mechaniškai arba automatizuotai. Toliau mėginių nuotraukos yra klasifikuojamos į grupes pagal orientaciją. Šis klasifikavimas leidžia grupuoti skirtingai pasisukusias makromolekules ir atrinkti neoptimalias mėginio nuotraukas arba priemaišas (Savva, 2019). Toliau 2D vaizdai yra konstruojami į prastos rezoliucijos 3D modelį. Tokie prastos rezoliucijos referenciniai 3D modeliai yra lyginami tarpusavyje ir sudaro vaizdą iš skirtingų kampų. Geriausiai atitinkantis duomenų 2D vaizdas sulyginus su 2D vaizdo atkarpa iš 3D modelio yra naudojamas galutinio 3D modelio suformavimui. Šie sulyginimai kartojami, kol gaunamas geriausios rezoliucijos 3D struktūrinis mėginio modelis. Galutinis žingsnis yra atominės struktūros vizualizavimas. Aukštos rezoliucijos modelis naudojamas kaip žemėlapis modeliuojant amino rūgščių seką mėginyje. Žinant teorinę amino rūgščių seką ir naudojant modeliavimo programas, kiekviena amino rūgštis yra pridėjama mechaniškai ir pakoregavus geometrinius neatitikimus, modelis gali būti naudojamas tyrimo tikslams (Savva, 2019).

2. Medžiagos ir metodai

2.1 Naudotos medžiagos

Reagentai:

Sigma-ALDRICH: Acto rūgštis (99 %); cholesterolis 99 %; žmogaus serumo albuminas; tioflavinas-T, natrio laktatas.

CARL ROTH: Agaras Kobe I; tricinas (99 %); MgSO_4 ; NaH_2PO_4 ; K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; triptonas/peptonas; α -laktozė; Guanidino tiocionatas (GuSCN); gliukozė.

Thermofischer Scientific:

Tris; imidazolas (99 %); KH_2PO_4 ; KCl ; NaCl ; mielių ekstraktas; dekstrozė; NDS; glicinas; kanamicinas; akrilamidas (40 %); EDTA; urėja 99 %; glutaminas 99 %; glicerolis CaCl_2 .

Acros Organics:

Glicerolis (99 %); Na_2SO_4 .

Honeywell:

Etanolis (99,8 %).

Cytiva:

IMAC sefarozė.

Terpės ir tirpalai:

PBS tirpalas: 137 mM NaCl , 2,7 mM KCl , 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4;

dSS tirpalas: 4 mM gliukozės, 1,4 mM CaCl_2 , 1,3 mM MgCl_2 , 0,7 mM gliutamino, 0,65 mM urėjos, 0,052 mM cholesterolio, 2,4 mM natrio laktato, 0,0615 mM žmogaus serumo albumino, 127 mM NaCl , 1,8 mM KCl , 1,2 mM KH_2PO_4 , 7,81 mM Na_2HPO_4 , 3,19 mM NaH_2PO_4 pH 7,35;

ZYM-5052 terpė: 10 g/L triptono, 5 g/L mielių ekstrakto, 0,5 g/L NaCl , 1 g/L NH_4Cl , 6,78 g/L Na_2HPO_4 , 3 g/L KH_2PO_4 , 0,3 g/L Na_2SO_4 , 0,5 g/L gliukozės, 5 mL glicerolio 0,5 % (w/v), 2 g laktozės 0,2 % (w/v);

„Lysogeny Broth“ (LB) terpė su arba be priedų: mielių ekstraktas 0,5 % (w/v), peptonas 1 % (w/v), NaCl 0,5 % (w/v), priedai: kanamicinas 100 $\mu\text{g/ml}$, agaras 2 % (w/v);

„Fast Running Buffer“ 10 $\times$: (NDS-PAGE buferinis tirpalas) 60,57 g/L Tris, 63,05 g/L EPPS, 1 % (w/v) NDS, 1,5 g/L EDTA;

Katodinis buferinis tirpalas 10 $\times$: (Tricino NDS-PAGE) 1 M Tris, 1 M Tricino, 1 % NDS pH 8,25;

Anodinis buferinis tirpalas 10 $\times$: (Tricino NDS-PAGE) 1 M Tris, 0,225 M HCl , pH 8,9;

Buferinis tirpalas C: (Dydžiu paremtos chromatografijos buferinis tirpalas): 20 mM fosfatų 94:6 (0,5 M Na_2HPO_4 : 0,5 M NaH_2PO_4), 0,2 mM EDTA pH 8;

Guanidino tiocionato tirpalas 6 M GuSCN , 1 mM EDTA pH 8;

Urėjos tirpalas 6M urėjos, 20mM Tris, 300 mM NaCl pH 8 ;

A tirpalas (gryninimo) 20 mM Tris 300 mM NaCl pH 8;

B tirpalas (gryninimo) 0,5 M imidazolo 20 mM Tris 300 mM NaCl pH 8.

Naudoti kamieniai ir plazmidės:

- *Escherichia coli* BL21 Star™ (genotipas: *F⁻ ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm rne131 (DE3)*) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific);
- pDS111_SUMO-Ab42 plazmidė gauta iš Biotechnologijos Instituto, Amiloidų tyrimų grupės.

Naudoti prietaisai ir įranga:

Fisherbrand „Isotemp” termoblokas;

Biosan „Microspin FV-2400” centrifūga;

Eppendorf „Centrifuge 5418 R” centrifūga;

Eppendorf „Centrifuge 5810 R” centrifūga;

Fisherbrand „Isotemp” maišymo ir kaitinimo lenta;

Kern „EMB 500-1” svarstyklės;

Thermofisher Scientific „Orion 3-STAR” pH metras;

Biosan „RTS-1C” purtyklė su realaus laiko OT matavimu;

Cytiva „Akta start” chromatografijos Sistema;

BMG Labtech „CLARIOstar Plus” plokštelių skaitytuvas;

Denver Instrument „TB-215D” svarstyklės;

Fisherbrand „FB 70155” vakuminė pompa;

Biometra „PS 300 T” elektroforezės aparatas (maitinimo šaltinis);

Invitrogen „PowerEase Touch” elektroforezės aparatas (maitinimo šaltinis);

Biometra „Eco-Line“ elektroforezės stovas;

Superdex 75 gelfiltracijos kolona;

Bruker Dimension „ICON SPM” atominės jėgos mikroskopas;

Thermofisher scientific „Air-Tite™ Henke-Ject™“ 1 ir 3 mL švirkštai;

Corning „Assay Plate REF 3881“ plokštelės;

Thermofisher scientific „Sealing tape, Clear Polyolefin“ plokštelių uždengimo plėvė;

BioDesign Inc of New York „BioDesignDialysis Tubing™“ dializės maišeliai;

Kinesis „Filtration Membranes“ švirkštiniai filtrai.

2.2 Taikyti metodai

2.2.1 Cheminė ląstelių transformacija, kultūros auginimas ir baltymo sintezė

Plazmidė pDS111_SUMO-aB42 įterpiama į kompetentines *Escherichia coli* BL21 Star™ ląsteles. Kompetentinės ląstelės maišomos su 15 µl mišinio su plazmide ir inkubuojamos 30 min ledo vonelėje. Vykdomas karščio šokas 1,5 min. prie 42 °C, tada ląstelės 2 min grąžinamos į ledo vonelę, resuspenduojamos 0,5 ml SOC terpės ir inkubuojamos 1 val 37 °C. Transformacijos mišinys sėjamas ant LB terpės lėkštelių su pridėtu kanamicinu 100 µg/ml, lėkštelės inkubuojamos 16 val 37 °C. Užaugusios kolonijos atrenkamos ir pasėjamos į SOC terpę su 100 µg/ml kanamicino, auginamos 8 val 37 °C. Ruošiamos užšaldytos kultūros, maišoma 1 mL kultūros su 100 µl DMSO. Kultūros ir glicerolio mišinys perpilamas į 1 mL kriogeninius mėgintuvėlius. Mišinys mėgintuvėlyje sumaišomas lengvai vartant mėgintuvėlį ir perkeliamas į -80 °C šaldiklį. Tolimesniam auginimui viena *Escherichia coli* BL21 Star™ su pDS111_SUMO-aB42 plazmide perkeliama į autoinduktyvią terpę (ZYM 5052). Ląstelės auginamos iki 0,9 OT. Gautos ląstelės surenkamos centrifuguojant 18000 G, 20 min, supernatantas nupilamas ir mėginiai suspenduojami 6 M urėjos, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8 tirpale siekiant sudaryti sąlygas, kuriose Aβ₄₂ negalėtų agreguoti (Sakalauskas et al., 2023).

2.2.2 Baltymo gryninimas

Viso gryninimo proceso metu vengiama mėginius laikyti kambario temperatūroje ilgesnį negu būtina laiko tarpą, nenaudojami mėginiai laikomi -80 °C temperatūroje, naudojami – ant ledo. Mėginiai 15 min homogenizuojami ultragarsu naudojant VS70/T angalį, naudojant 50 % galios ir 30 sekundžių ciklus, mėginį laikant lede ir papildomai homogenizuojami stumokliu iki kol pasiekama vientisa konsistencija. Mėginiai centrifuguojami 18000 G, 20 min, supernatantas surenkamas. Atliekamas NDS-PAGE patikrinant, ar gautas baltymas. Paruošiamas 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8 tirpalas (A) ir 0,5 M imidazolo, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8 tirpalas (B). Tirpalai yra filtruojami naudojant 0,22 µm PVDF membranos filtrą. Baltymo eliucijai naudojamas laiptinis imidazolo gradientas (50 mM; 100 mM; 200 mM). Paruošiama gravitacinė kolonėlė, Ni-NTA sorbentas maišomas ir perkeliamas į švarų indą, plaunamas 50 mM imidazolo tirpalu. Kolonos apačia uždengiama ir sorbentas supilamas į vidų per piltuvėlį. Sorbentui nusistovėjus, kolonėlės apačia atidaroma išpilant perteklinį imidazolo tirpalą, bet paliekant sorbentą apsemtą. Supernatantas supilamas į koloną leidžiant jam susigerti į sorbentą, prašokimo frakcija surenkama. Toliau vykdoma eliucija, naudojamas laiptinis imidazolo gradientas (50 mM; 100 mM ir 200 mM). Surenkamos frakcijos tikrinamos NDS-PAGE. Atrenkamos frakcijos, turinčios didžiausias baltymo koncentracijas, frakcijos sumaišomos į vieną mėginį.

Paruošiama 4 L dializės buferinio tirpalo (20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Atkerpamas celiuliozės membranos dializės maišelis („BioDesignDialysis Tubing” iš BioDesign Inc. of New York), suvilgomas dejonizuotame vandenyje. Vienas maišelio galas užspaudžiamas ir į maišelį supilamas mėginys. Antras maišelio galas užspaudžiamas ir mėginys patalpinamas į dializės buferinį tirpalą kartu su magnetiniu maišytuvu. Dializė vykdoma per naktį ~ 12 val 4 °C temperatūroje su maišymu.

Vykdomas SUMO žymens nukirpimas naudojant Ulp1 proteazę. Po dializės mėginys skiedžiamas gaunant 1 M urėjos koncentraciją ir inkubuojamas su proteaze (0,5 µl Ulp1 / 200 µl mėginio) 2 val kambario temperatūroje. Po karpymo atliekamas tricino NDS-PAGE, patikrinant ar proteazės vykdomas kirpimas buvo sėkmingas.

Vykdoma dydžiu paremta chromatografija. Pirmiausia paruošiamas dydžiu paremtos chromatografijos 20 mM natrio buferinis tirpalas C 0,2 mM EDTA, pH 8. Naudojami 0,5 M NaH₂PO₄ ir 0,5 M Na₂HPO₄, kurie maišomi santykiu 94:6 (Na₂HPO₄: NaH₂PO₄). Tirpalas filtruojamas naudojant 0,22 µm PVDF membranos filtrą. Naudojant HCl ir NaOH pH privedamas iki 8. Kolona yra kalibruojama, leidžiant 3-5 kolonos tūrius fosfatinio buferio, stebint 280 nm absorbcija ir užtikrinant, kad absorbcija būtų lygi 0 arba kuo arčiau 0 ir kolonoje nebūtų susidariusių burbulų. Po dializės ir proteazės karpymo gautas mėginys sušvirkščiamas į sistemą (2 mL). Leidžiama mėginiais pilnai patekti į sorbentą ir vykdoma eliacija naudojant buferinį tirpalą C. Stebint 280 nm absorbcijos smailes renkamos frakcijos. Frakcijos, numanomai turinčios Aβ₄₂, yra surenkamos į mažo baltymų prisikabinimo mėgintuvėlius Thermofisher scientific „Low protein binding” mėgintuvėlius stengiantis sumažinti mėginio praradimą dėl prikibimo ir agregacijos su plastikinėmis mėgintuvėlio sienelėmis. Surinktos frakcijos su Aβ₄₂ užšaldomos ir ruošiamos liofilizavimui. Frakcijos sumaišomos ir perkeliama į indą su liofilizavimui tinkamu dangteliu, leidžiančiu vandens garams išgaruoti iš indo. Mėginys perkeliama į -80 °C šaldiklį 2 val. Mėginiai patalpinami į liofilizatorių ir vakuume -30 °C laikomi 2 val. Toliau įjungiama liofilizavimo funkcija, mėginiai laikomi -10 °C vakuume (0,05 mbar) 24 val. Dėl sublimacijos drėgmė išgarinama. Toliau naudojant mėginys resuspenduojamas 6 M GuSCN, 1 mM EDTA, pH 8 tirpale. Pakartotinamai atliekama gelfiltracija ir iš karto surinkta tikslinio baltymo frakcija yra naudojama tyrimams (Sakalauskas et al., 2023).

2.2.3 NDS-PAGE ir Tricino NDS-PAGE

Tyrimo metu tarpiniai rezultatai vertinami atliekant NDS-PAGE. Procesas pradedamas nuo 10 % skiriamojo akrilamido gelio paruošimo, 10 % akrilamido tirpalas supilamas į stikliuką ir užpilamas dejonizuotu vandeniu. Skiriamajam gelio sluoksniui sustingus paruošiamas 4 % koncentruojamasis akrilamido tirpalas. Vanduo išpilamas iš stovo ir ant sustingusio skiriamojo gelio supilamas koncentruojamasis 4 % akrilamido tirpalas ir įstatomos „šukos” skirtos šulinėlių formavimui.

Sustingus koncentruojamajam geliui, nuimama tarpinė guma ir stikliukai su geliu perkeliama į elektroforezės stovą. Gelis apsemiamas elektroforezės buferiniu tirpalu (*angl.* Fast Running Buffer). „šukos“ ištraukiamos, mėginiai ir baltymų molekulinės masės žymuo su pipete įleidžiami į šulinėlius. Uždedamas elektroforezės stovo dangtis. Teigiamos ir neigiamos elektros srovės laidai prijungiami prie elektros srovę valdančio elektroforezės aparato. Elektroforezė vykdoma ~ 40 min naudojant 200 V įtampos parametrus. Dažui pradėjus veržtis į elektroforezės buferį elektros srautas sustabdomas, stikliukas išimamas iš elektroforezės stovo. Koncentruojamojo gelio sluoksnis atskiriamas, o mėginys patalpinamas į plastikinį indą su vandeniu. Tricino NDS-PAGE procesas analogiškas, bet skiriasi gelio komponentais, naudojamais buferiais ir elektroforezės trukme. Tricino NDS-PAGE gelis suformuojamas į stikliuką supilant 16 % skiriamojo akrilamido tirpalo ir iš karto ant jo supilant 10 % pereinamojo akrilamido tirpalo. Ant viršaus užpilama dejonizuoto vandens. Šiems geliams sustingus paruošiamas 4 % koncentruojamasis akrilamido tirpalas ir įstatomos „šukos“. Tricino NDS-PAGE metu naudojami du skirtingi buferiniai tirpalai. Katodinis buferinis tirpalas supilamas į viršutinį elektroforezės stovo kompartmentą (artimiausią katodui) paruošiamas skiedžiant 10 × koncentruotą 1 M Tris, 1 M Tricino, 1 % NDS, pH 8,25 buferinį tirpalą iki 1 ×. Anodinis buferinis tirpalas, supilamas į apatinį artimiausią anodo esantį elektroforezės stovo kompartmentą, paruošiamas skiedžiant 10 × koncentruotą 1 M Tris, 0,225 M HCl, pH 8,9 buferinį tirpalą iki 1 ×. Elektroforezė vyksta ~ 3 val, naudojant 150 V įtampos parametrus.

Gelio dažymas vykdomas pašildant gelį, panardintą vandenyje mikrobangų krosnelėje ir neleidžiant vandeniui užvirti. Vanduo nupilamas ir gelis užpilamas „GelCode™ Blue Safe Protein Stain“ (ThermoFisher scientific) gelio dažų. Mikrobangų krosnelėje gelis kartu su dažais pakaitinamas neleidžiant gelio dažui užvirti. Tada dažas grąžinamas į indą, o gelis užpilamas vandeniu ir praplaunamas pakaitinant mikrobangų krosnelėje, neleidžiant vandeniui užvirti. Paskutinis praplovimo žingsnis kartojamas du kartus. Per ~ 15 min gelyje esantys nusidažę baltymai tampa matomi. Dažant akrilamido gelį, gautą vykdant Tricino NDS-PAGE, pritaikomas papildomas gelio fiksavimo žingsnis. Po elektroforezės surinktas gelis patalpinamas į 50 % etanolio, 40 % H₂O, 10 % acto rūgšties tirpalą. To tikslas denatūruoti baltymus sustabdant jų difundavimą iš gelio dažymo metu.

Mėginių paruošimas vykdomas maišant mėginį su 6× baltymų dažais. 5 µl mėginio maišomi su 25 µl dažo gaunant galutinę 1 × dažo koncentraciją. Mėginiai su šiuo mišiniu 10 min pakaitinami 95 °C termobloke (Sakalauskas et al., 2023).

2.2.4 Baltymų kinetika

Atliekant baltymų kinetikos eksperimentus pirmiausia paruošiamas PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) tirpalas ir dirbtinio smegenų skysčio dSS tirpalas, į

kurį įeina 4 mM gliukozės, 1,4 mM CaCl₂, 1,3 mM MgCl₂, 0,7 mM glutamino, 0,65 mM urėjos, 0,052 mM cholesterolio, 2,4 mM natrio laktato, 0,0615 mM žmogaus serumo albumino, 127 mM NaCl, 1,8 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 7,81 mM Na₂HPO₄, 3,19 mM NaH₂PO₄. Taip pat, ir PBS, ir dSS naudojama 20 mM tioflavino-T (ThT), skirto suteikti fluorescensinį signalą amiloidų agregatams. Tyrimo metu buvo atliekami skirtingi baltymų kinetikos eksperimentai (Lent.1.). Vienas eksperimentas, lyginantis Aβ₄₂ agregaciją PBS ir dSS, eksperimentas, lyginantis Aβ₄₂ ir Aβ₄₂ su agregacijos inhibitoriumi VR16-09 (fluorintu benzensulfonamidu) dSS ir eksperimentas, lyginantis Aβ₄₂ agregaciją dSS tirpale ir PBS tirpale su ko-agreguojančiu MoPrP prioninio baltymo N galo motyvu (MoPrP23-143).

Lent. 1. Skirtingus atliktus baltymų kinetikos eksperimentus vaizduojanti lentelė. Vaizduojamos naudotos Aβ₄₂ koncentracijos, tirpalai, kuriose buvo vykdoma agregacija, ir mėginių, kuriems buvo atlikti agregacijos tyrimai, kiekis (pagal plokštelės šulinėlius).

	I. Eksperimentas		II. Eksperimentas		III. Eksperimentas	
	8 μM Aβ ₄₂	16 μM Aβ ₄₂	4 μM Aβ ₄₂	8 μM Aβ ₄₂	8 μM Aβ ₄₂	8 μM Aβ ₄₂
PBS	8 mėginiai	8 mėginiai	-	-	-	-
dSS	8 mėginiai	8 mėginiai	4 mėginiai	4 mėginiai	4 mėginiai	4 mėginiai
dSS + VR- 16-09	-	-	4 mėginiai	4 mėginiai	-	-
PBS + MoPrP23- 143 (1:1 santykiu su Aβ ₄₂)	-	-	-	-	4 mėginiai	4 mėginiai

Skirtingų koncentracijų Aβ₄₂ mėginiai buvo maišomi su tirpalais ir agregacijos inhibitoriumi VR16-09 arba MoPrP23-143 prioninio baltymo N galo motyvu (priklausomai nuo tyrimo). Mėginiai buvo išpilstomi į plokštelių skaitytuvui skirtų plokštelių šulinėlius. Plokštelės buvo uždengiamos Thermofisher scientific Nunc™ plėve ir patalpinaamos į plokštelių skaitytuvą. Aβ₄₂ agreguojant, mėginiuose esančiam ThT jungiantis prie fibrilių gaunamas fluorescensinis signalas. Šį fluorescensinį

signalą matuodamas plokštelių skaitytuvas sudaro agregacijos kreivę. Amiloidams agregavus tyrimas baigiamas, o plokštelėje esantys mėginiai naudojami tolimesniems tyrimams. Baltymų kinetikos duomenys apdorojami „Origin 2018“ programa (Sakalauskas et al., 2023).

2.2.5 Atominės jėgos mikroskopija (AJM)

Paruošiamas 1 % APTES tirpalas. Visi toliau atliekami žingsniai vykdomi metalinį dėklą, prie kurio priklijuotas žerutis (silikatų klasės mineralas), prilaikant su žnyplėmis, kad nebūtų pažeistas paviršius. Naudojant lipnią juostą žeručio paviršiaus nelygumai nulupami, sudarant kuo plokštesnį paviršių be obstrukcijų. Ant žeručio paviršiaus užpilama 50 μ l APTES ir laikoma 5 min, sudarant žeručio paviršiuje teigiamą krūvį, prie kurio prikibėtų neigiamai įkrautas $A\beta_{42}$. APTES nuplaunamas naudojant 2 mL dejonizuoto vandens, likusius vandens lašus nupurškiant kompresuotu oru. Ant žeručio užpilama 40 μ l mėginio ir laikoma 5 min. Naudojamas mėginys su agregavusiu $A\beta_{42}$, gautas po baltymų kinetikos eksperimento. Žerutis pakartotinai nuplaunamas 2 mL dejonizuotu vandeniu, išdžiovinamas kompresuotu oru ir yra paruoštas tolimesniam naudojimui. Toliau metalinis dėklas su priklijuotu žeručiu patalpinamas į atominės jėgos mikroskopo („Dimension Icon Bruker“) kamerą, kurioje jis prisitvirtina per orą traukiančią angą. Toliau kameros durys uždaromos ir programoje nustatomas paviršiaus suradimas. Vykdoma tapšnojo režimo atominės jėgos mikroskopija. AJM palydovas kartu su silicio nitrido adata (RTESPA-300 Bruker) suranda mėginio paviršių. Suradus paviršių su amiloidinėmis fibrilėmis daromos aukštesnės rezoliucijos (1024×1024 taškų) $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ ploto nuotraukos ir priartintos $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ ploto nuotraukos. Naudojamas skenavimo greitis – 0,5 Hz ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ ploto nuotraukoms) ir 1 Hz ($4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$ ploto nuotraukoms), adatos osciliacijos dažnis ~ 300 kHz. Gautos nuotraukos apdorojamos naudojant „Gwyddion“ programą, gauti duomenys papildomai analizuojami naudojant „Origin 2018“ programą. „Gwyddion“ programoje nuotraukose yra surenkama 50 atsitiktinių fibrilių aukščių profilių. Šie profiliai yra aproksimuojami naudojant Gauso kreivę, gaunant aukščiausią kiekvieno profilio tašką. Toliau duomenys perkeliama į „Origin 2018“ programą, kur yra sudaromi aukščių pasiskirstymo grafikai. Toliau duomenų normalumas patikrinamas atliekant Shapiro-Wilk analizę. Priklausomai nuo duomenų normalumo toliau atliekamas T-testas arba Mann-Whitney analizė. Nustatomas aukščių pasiskirstymo duomenų statistinis reikšmingumas, aukščių vidurkis, medianos linija ir standartinis nuokrypis. Pavienių fibrilių analizė atliekama „Gwyddion“ programoje iškerpant pasirinktas fibriles ir jas orientuojant tokia pačia kryptimi. Toliau fibrilės duomenys eksportuojami ir perkeliama į „Origin 2018“ programą, kurioje sudaromi spalvų spektro žemėlapiai. „Origin 2018“ programoje fibrilių profiliai buvo aproksimuojami Gauso funkcija, surinkus duomenis apie pločio parametrus buvo sudaromi pločio pasiskirstymo grafikai. Aukščio pasiskirstymo grafikai buvo sudaryti programoje „ImageJ“. Fibrilės duomenys gauti iš „Gwyddion“ programos buvo perkeliama į

„ImageJ“ programą, joje fibrilė buvo pažymima segmentuota linija ir ištiesinta naudojant programines funkcijas. Pagal „Gwyddion“ programos duomenis „ImageJ“ programoje buvo parenkama kiekvieną fibrilę atitinkanti dydžio skalė ir buvo sukuriama aukščio profilių grafikas.

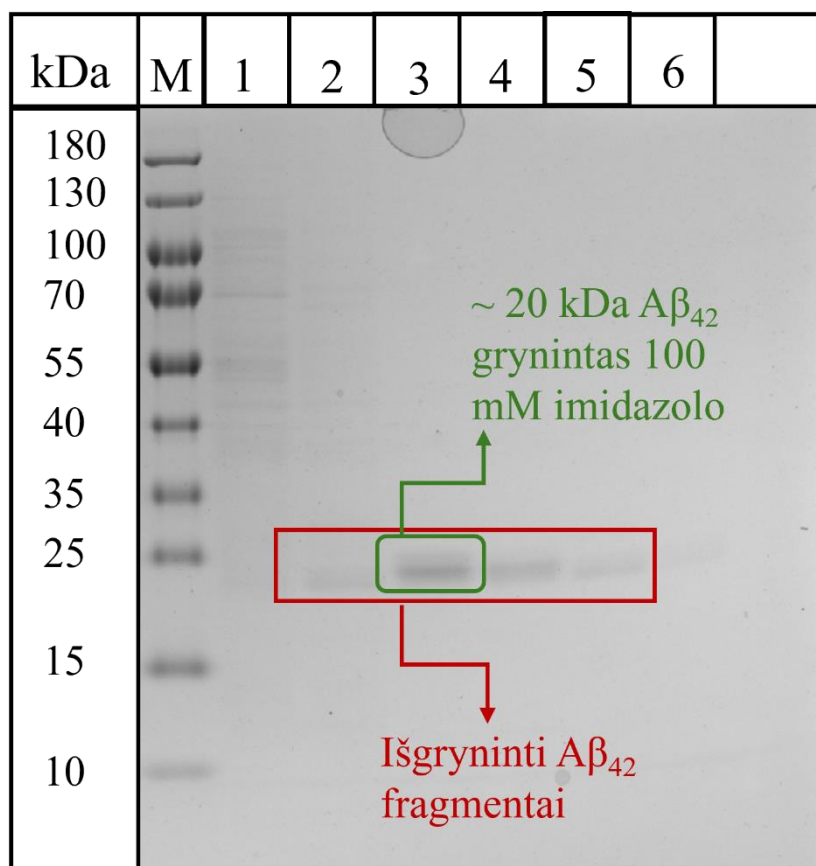
2.2.6 Kriogeninė elektronų mikroskopija

Matavimai naudojami tyrimo metu buvo atlikti Dr. Dariaus Šulskio CEITEC laboratorijoje (Bruno, Čekija). Gauti duomenys perkeliama į „Relion“ programą. Programoje nuotraukų apdorojimas pradedamas judesio korekcija, kuri padeda išvengti vaizdo išblukimo. Vykdoma korekcija pagal kontrasto perdavimo funkciją (CTF), sutvarkomas optikos sukeltas vaizdo iškraipymas ir vykdomas mechaninis dalelių atrinkimas. Toliau gautos dalelės pagal struktūrą yra klasifikuojamos į grupes naudojant „FilamentTools“ programą (CryoEM101, 2025).

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1 Gryninimo rezultatai

Įterpus pDS111_SUMO-aB42 plazmidę į kompetentines *Escherichia coli* BL21 Star ląsteles, buvo atlikta A β ₄₂ amiloidinio baltymo sintezė. Po baltymo gryninimo gravitacine kolonėle ir atlikus NDS-PAGE, patikrinta gauto baltymo molekulinė masė (6. pav.). Teorinė A β ₄₂ peptido masė ~4,5 kDa (PubChem, 2021), SUMO žymens masė ~11,5 kDa (UniProt, 2025), histidino 6x žymens masė ~0,84 kDa (Cusabio, 2025). Kartu teorinė chimerinio baltymo A β ₄₂-SUMO-His6x molekulinė masė turėtų būti ~ 16,84 kDa.

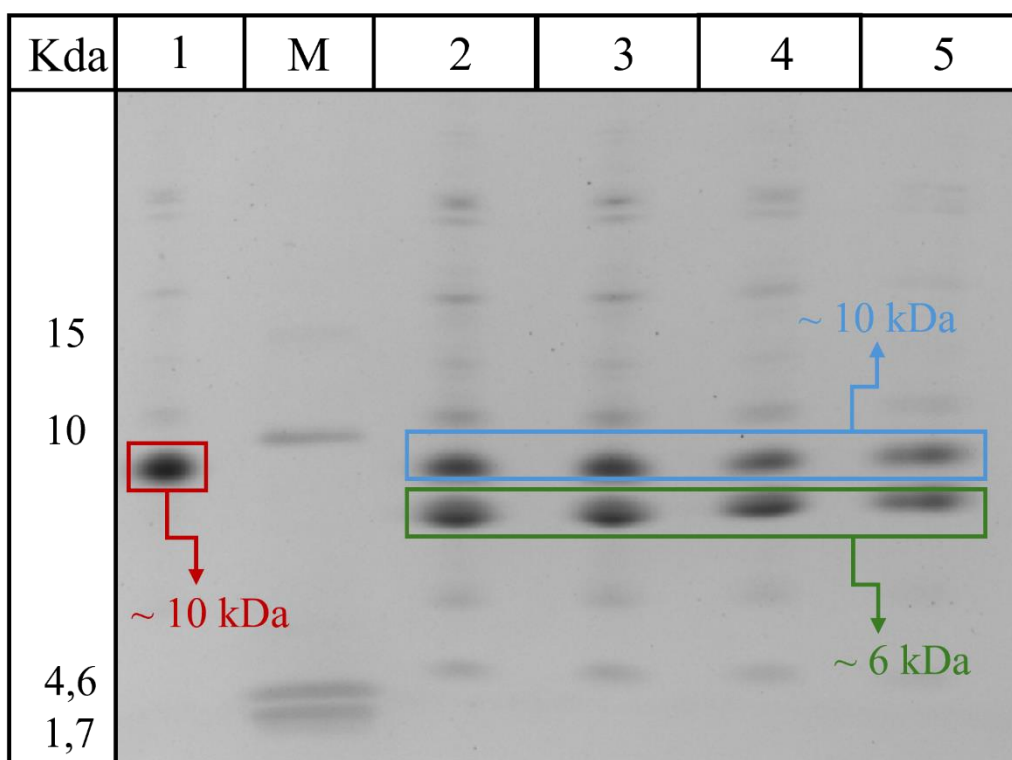


6. Pav. Gravitacine kolona (afinine chromatografija), naudojant Ni²⁺ jonais aktyvuotą afininį sorbentą, gryninto A β ₄₂-SUMO-His6x baltymo NDS-PAGE gelio nuotrauka. Nuo 1 iki 5 numerio pažymėti takeliai su A β ₄₂-SUMO-His6x baltymo mėginiais, gautais grynimui naudojant laiptinį imidazolo gradientą: 1 – 20 mM, 2 – 50 mM, 3 – 100 mM, 4 – 200 mM, 5 – 300 mM, 6 – 500 mM. Raudona spalva apibrėžti vizualiai pastebimi išgryninti fragmentai (2-5 takeliai). Žalia spalva pažymėtas vizualiai įvertintos didžiausios koncentracijos mėginys (3). M – Thermofisher scientific „PageRuler™ Prestained Protein Ladder” #26616 (pavaizduota dešinėje iliustracijos pusėje).

Gautuose mėginiuose (6. pav.) A β ₄₂-SUMO-His6x baltymo molekulinė masė ~ 20 kDa. Matomas baltymo masės skirtumas nuo teorinio ~16,8 kDa. Tai gali būti aiškinama kaip netipiniu baltymo judėjimu gelyje, įprastu amiloidogeniniams peptidams. Remiantis literatūra šį netipinį baltymo judėjimą geliu galėjo sukelti ir SUMO žymuo. Kadangi A β ₄₂ turi neigiamą krūvį

fiziologiniame pH, sukeliama didelio kiekio rūgštinių aminorūgščių, kurios elektrostatiškai atstumia NDS molekules, kas gali paskatinti netipinį peptido judėjimą, neatitinkantį teorinės molekulinės masės (Alavi et. al., 2022; Tiwari et al., 2019; Pryor et al., 2012).

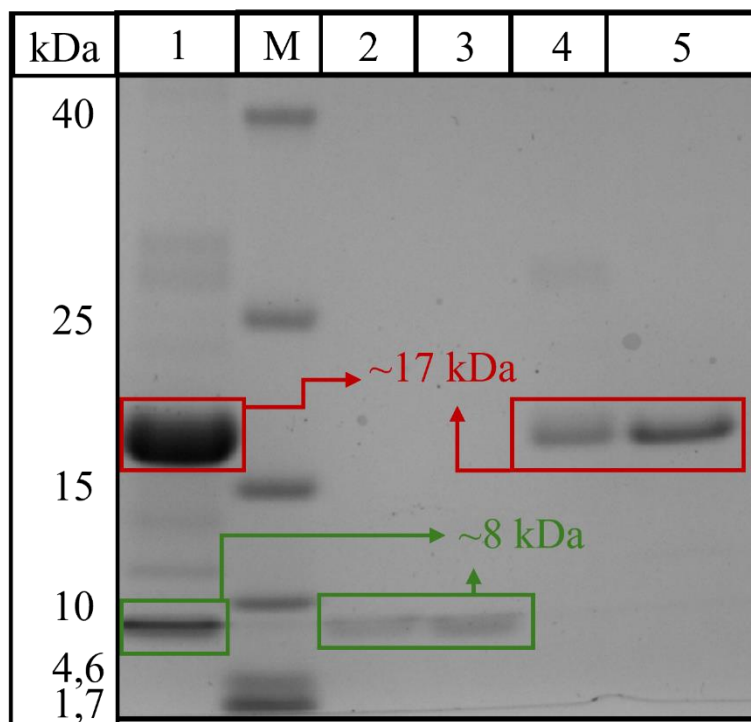
Atlikus pirminį afininės chromatografijos gryninimo etapą SUMO-His6x baltymo dalis tapo nebereikalinga. Tolimesniems agregacijos tyrimams reikalingas A β ₄₂ peptidas, kuris būtų kuo artimesnis fiziologiniam peptidui. Taigi chimerinis baltymas buvo karpomas naudojant Ulp1 proteazę. Stengiantis optimizuoti procesą buvo atliekamas mažos skalės karpymas ir rezultatų vizualizavimas atliekant NDS-PAGE (7. pav.), įvertinantis optimaliausią proteazės koncentraciją ir kirpimo laiką.



7. Pav. Mažos skalės proteazės vykdomo karpymo mėginiai tricino NDS-PAGE gelyje. A β ₄₂-SUMO-His6x pilnas baltymas (pažymėtas raudonai) pavaizduotas 1 takelyje. A β ₄₂-SUMO-His6x baltymas, karpomas Ulp1 proteaze, pavaizduotas 2-5 takeliuose. Mėginiai 2-3 takeliuose inkubuoti 50 min, 4-5 takeliuose 120 min. Naudoti du skirtingi proteazės tūriai 0,5 μ l (2 ir 4 mėginiai) ir 1 μ l (3 ir 5 mėginiai) (200 μ l mėginio). Žaliai pažymėti A β ₄₂ peptidai, gauti kirpimo metu, mėlynai – SUMO-His6x žymenys. M – Thermofisher scientific „Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder” #26628 (pavaizduota dešinėje iliustracijos pusėje).

Ulp1 proteaze vykdytas mėginių karpymas pavyko sėkmingai, gaunant ~ 6 kDa masės A β ₄₂ peptidą. Gelyje (7. pav.) vėlgi matomas netipinis pilno A β ₄₂-SUMO-His6x baltymo judėjimas, neatitinkantis teorinės pilnos baltymo molekulinės masės. Vertinant proteazės kirpimo efektyvumą, nebuvo nustatytas didelis skirtumas tarp naudojamų koncentracijų ir inkubavimo laiko. Taigi, didesnės skalės karpymui buvo naudojama 0,5 μ l tūris inkubuojant 120 min.

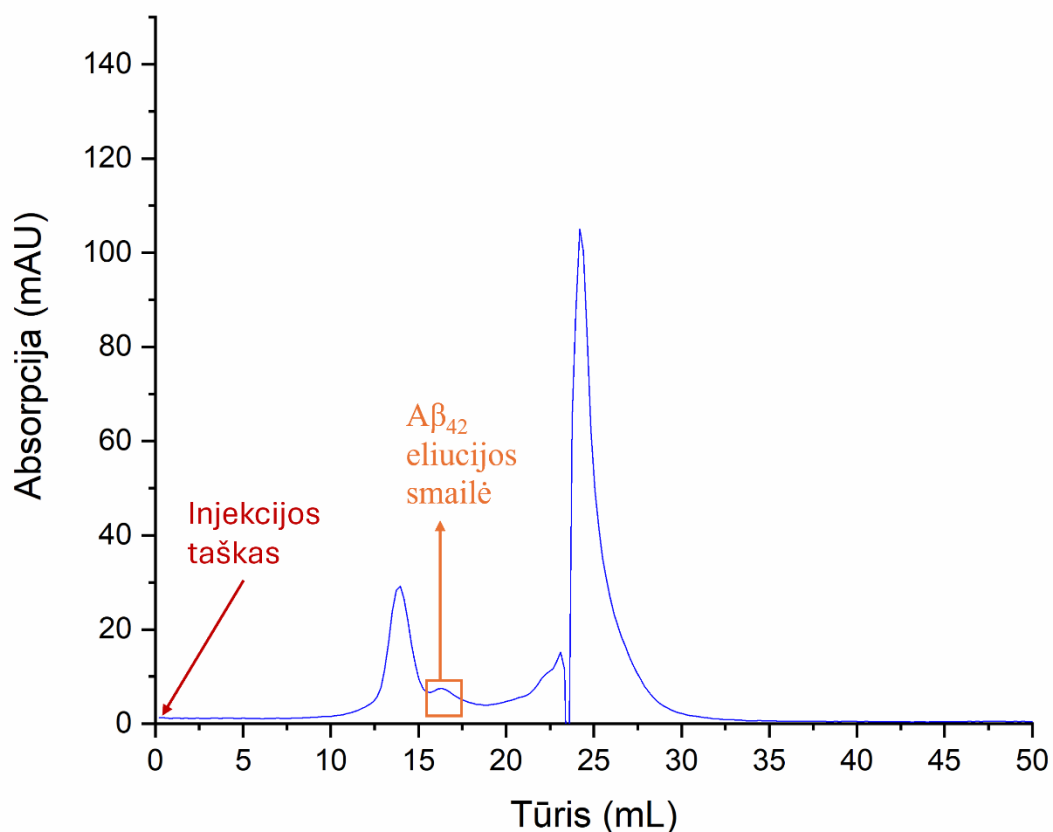
Tolimesnio gryninimo dydžiu paremtos chromatografijos metodu buvo šalinama SUMO-His6x baltymo dalis. Naudojant dvi skirtingas imidazolo koncentracijas, 50 mM ir 500 mM, buvo išplaunamas SUMO-His6x. A β ₄₂ surinktas prašokimo frakcijoje ir naudojant dializės buferį (20 mM Tris 1 mM EDTA pH 8) eliucijai. Šio gryninimo rezultatas buvo įvertintas NDS-PAGE (8. pav.).



8. Pav. Po antro gryninimo etapo gravitacine kolona gauta tricino NDS-PAGE gelio nuotrauka. Nuotraukoje pavaizduotas proteaze kirptas A β ₄₂-SUMO-His6x baltymas (1). Taip pat prašokimo frakcijoje (2) ir eliucijai naudojant dializės buferį (3) gauti A β ₄₂ mėginiai. Raudonai pažymėti nesukarpyti A β ₄₂-SUMO-His6x baltymai, žaliai – A β ₄₂ peptidai. 4 takelyje eliucija vykdyta naudojant 50 mM, o 5 – 500 mM imidazolo koncentracijas. M – Thermofisher scientific „Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder” #26628 (pavaizduota dešinėje iliustracijos pusėje).

Atlikus didelio kiekio A β ₄₂-SUMO-His6x baltymo karpymą ir antrą gryninimo gravitacine kolona etapą tricino NDS-PAGE gelyje (8. pav.), pastebėta, kad gauto A β ₄₂ peptido koncentracija nėra didelė. Tai galima aiškinti neefektyviu proteazės karpymu, numanomi dėl buferiniame tirpale esančios 1 M koncentracijos urėjos, kuri galėjo denatūruoti proteazę ir sumažinti jos efektyvumą (Das et. al., 2009). Visgi, skirtumai tarp 1 ir 2-3 takelių rodo koncentracijos sumažėjimą po gryninimo kolonėle, kas galimai gali būti susiję su precipitacija prie kolonos paviršių, prarandant dalį mėginio (Rakow et. al., 2014). Visgi, 2 ir 3 takelyje matomos frakcijos buvo naudojamos tolimesniuose tyrimo etapuose, papildomai neoptimizuojant šio gryninimo etapo.

Toliau mėginiai buvo papildomai gryninamidydžiu paremtos chromatografijos metodu, naudojant gelfiltracinę koloną. Šio gryninimo metu buvo sudaryta chromatograma, pažyminti A β ₄₂ eliucijos smailę ir mėginio suleidimo į koloną tašką (9. pav.)

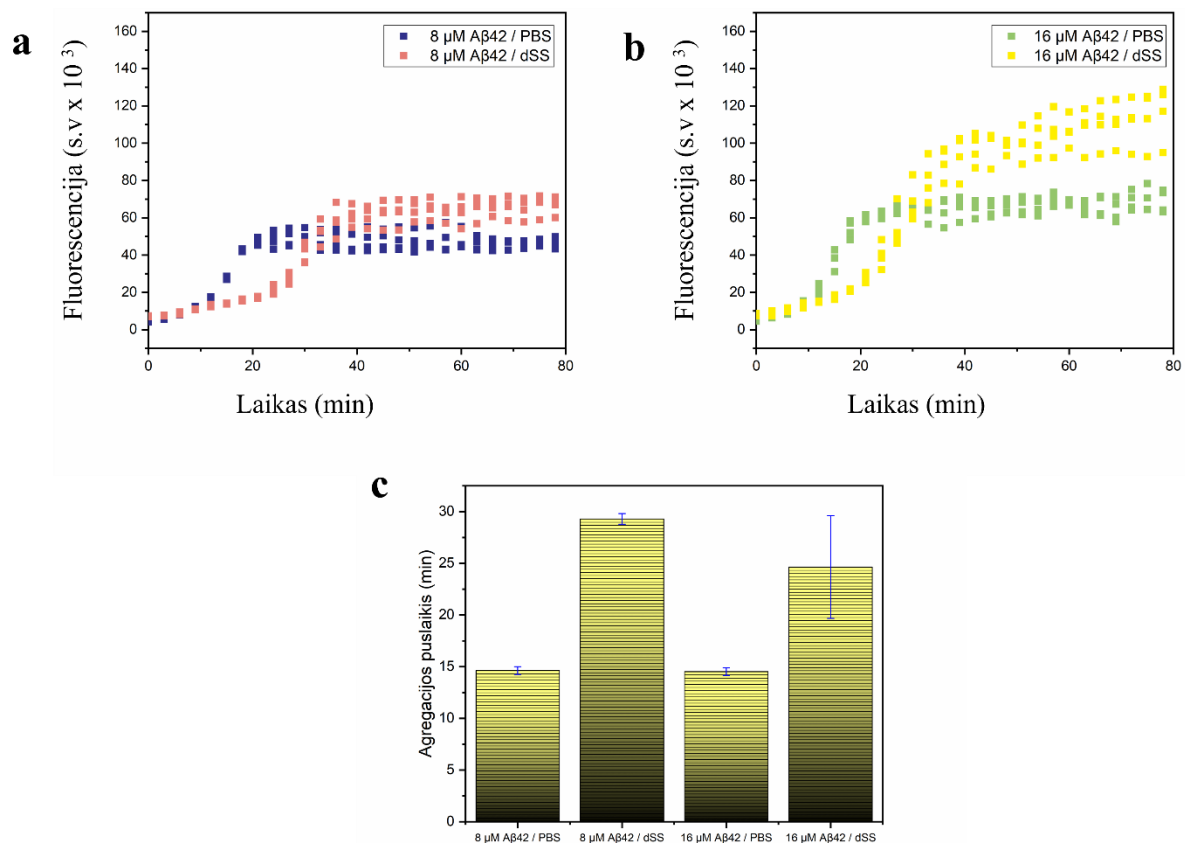


9. Pav. Gryninimodydžiu paremtos chromatografijos metu gauta chromatograma. Oranžine spalva pažymėta $A\beta_{42}$ eliacijos smailė, prasidedanti ties ~ 16 mL. Smailė pasiekia ~ 10 mAU absorbciją. Pagal Beer-Lambert dėsnį apskaičiuota gautos $A\beta_{42}$ koncentracija ~ 10 μ M. Raudona spalva pažymėtas mėginio suleidimo į koloną taškas (injekcijos taškas).

Gautoje chromatogramoje (9. pav.) matomi 5 pagrindinės smailės, iš kurių, remiantis ankstesnių tyrimų duomenimis, $A\beta_{42}$ eliacijos smailė identifikuota ties ~ 16 mL. Kituose pikuose, numanoma, yra pašalinamos įvairios priemaišos iš gelfiltracinės kolonos, buferio komponentai ir druskos, taip pat po gryninimo galimai likę SUMO-His6x žymenys.

3.2 $A\beta_{42}$ agregacijos kinetinių tyrimų rezultatai

Pirmo baltymų kinetikos eksperimento metu buvo lyginama dviejų koncentracijų $A\beta_{42}$ (8 μ M ir 16 μ M) agregacija fosfatų buferiniame tirpale PBS ir dirbtiniame smegenų skystyje dSS. Taip pat buvo lyginama dviejų koncentracijų $A\beta_{42}$ agregacija naudojant agregacijos inhibitorių VR16-09 (fluorintą benzensulfonamidą) (10. pav.)



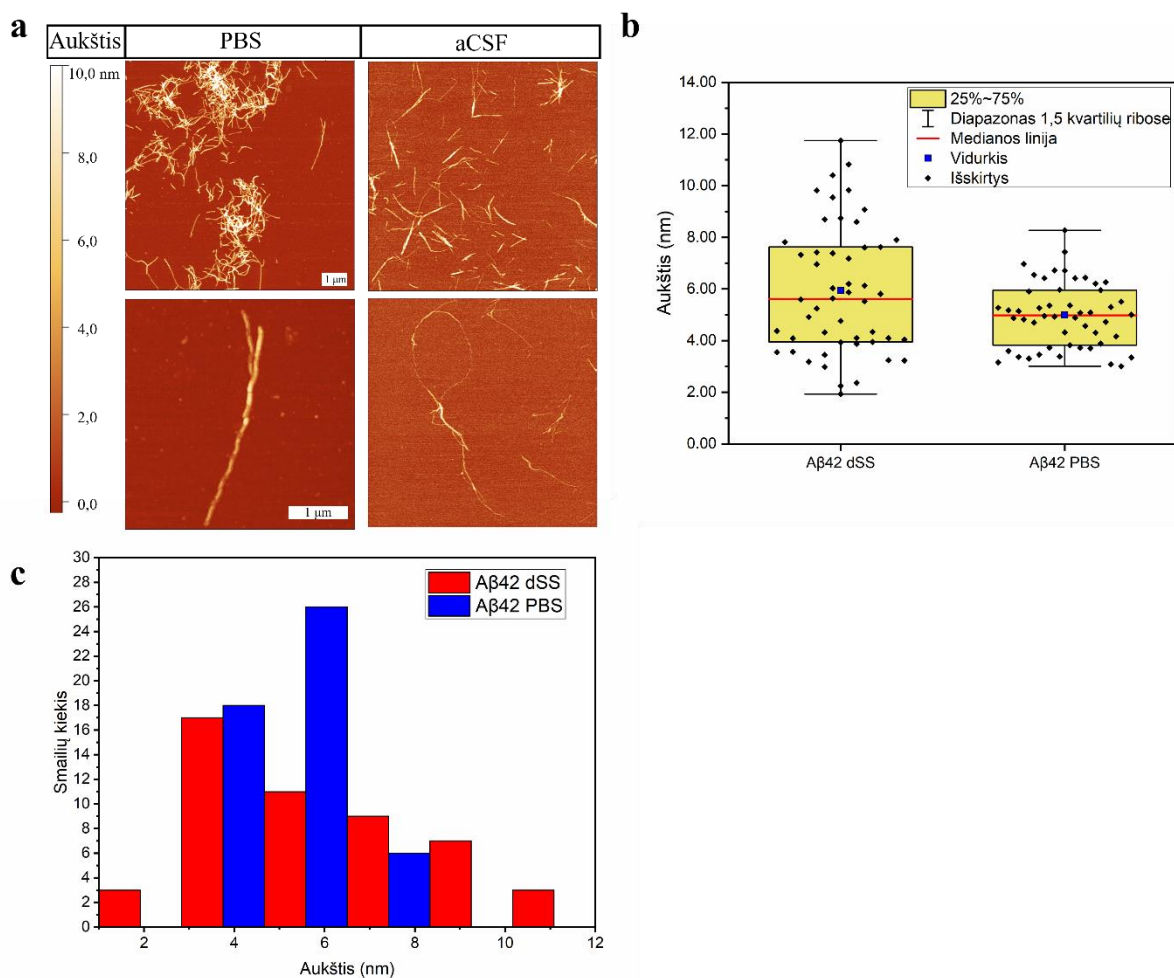
10. Pav. Aβ₄₂ amiloido agregacijos kinetinių eksperimentų grafikai. Agregacija vertinta pagal fluorescenciją, naudojant tioflaviną T (THT). A dalyje pavaizduotos 8 μM Aβ₄₂ agregacijos kinetinės kreivės dirbtiniame smegenų skystyje (rožinė kreivė) ir fosfatų buferiniame tirpale (mėlyna kreivė), B dalyje pavaizduotos 16 μM Aβ₄₂ agregacijos kinetinės kreivės dirbtiniame smegenų skystyje (geltona kreivė) ir fosfatų buferiniame tirpale (žalia kreivė). C dalyje pavaizduotas grafikas vaizduojantis A ir B dalių agregacijos kreivių puslaikio vertes, su standartiniais nuokrypiais.

Pagal baltymų kinetikos kreives (10. pav.), A ir B dalyse bei agregacijos puslaikio verčių grafiką C dalyje galima įvertinti, kad PBS tirpale Aβ₄₂ agreguoja greičiau nei dSS, bet 16 μM koncentracijos Aβ₄₂ agregacijos metu matuojamas fluorescensinis signalas yra aukštesnis nei kitų kreivių. PBS tirpale 8 μM Aβ₄₂ agregacijos puslaikis buvo 14,6 min (SD 0,38). Lyginant su 8 μM Aβ₄₂ agregacijos puslaikiu dSS tirpale (29,3 min, SD 0, 52) PBS tirpale agregacija vyko beveik 2 kartus greičiau. Panaši tendencija matoma naudojant aukštesnę (16 μM) Aβ₄₂ koncentraciją. Naudojant didesnės koncentracijos Aβ₄₂ PBS tirpale agregacijos puslaikis buvo 14,5 min (SD 0,37), o dSS tirpale 24,6 min su daug didesniu standartiniu nuokrypiu (SD 4,9). Šie rezultatai atitinka literatūroje aprašytas Aβ₄₂ savybes smegenų skystyje ir fosfatų buferiniame tirpale. Literatūros šaltiniuose aprašomas intensyvesnis fluorescensinis Aβ₄₂ agregacijos signalas smegenų skystyje lyginant su fosfatų buferiniu tirpalu, nėra siejamas su intensyvesne agregacija, o su aplinkos, kurioje vyksta fluorescencija pokyčiais. Taip pat literatūros šaltiniuose aprašoma, kad Aβ₄₂ agregacijos puslaikiai

yra lėtesni smegenų skystyje (Frankel et. al., 2019; Padayachee et. al., 2016). Šiuose eksperimentuose gauti duomenys atitiko literatūros šaltiniuose aprašomas $A\beta_{42}$ agregacijos tendencijas ir sudarė bazę, leidžiančią nustatyti, kada $A\beta_{42}$ suformuos fibriles, kadangi tolimesnių eksperimentų metu naudojamas mėginys turėjo būti agregavęs.

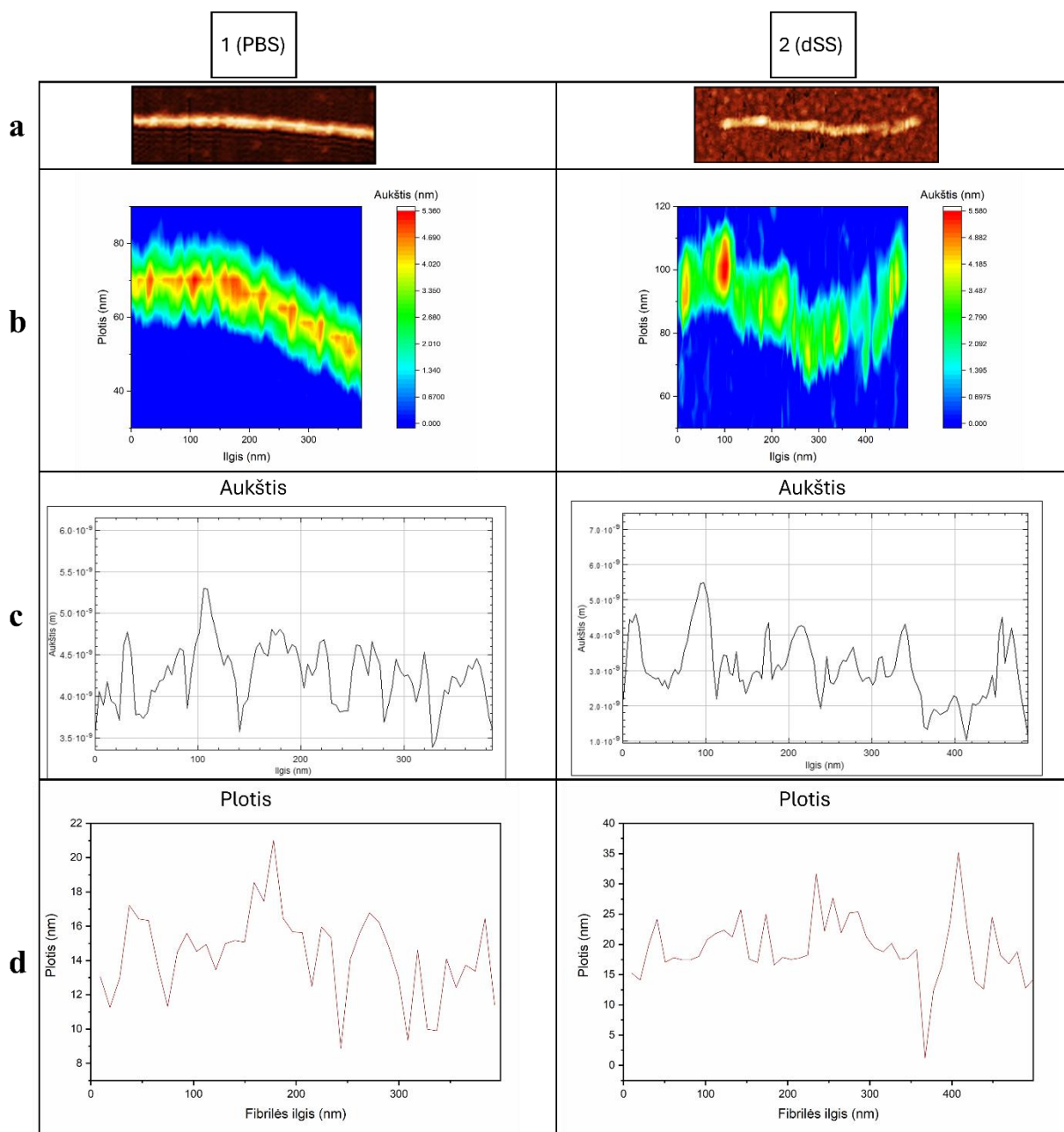
3.3 Atominės jėgos mikroskopijos rezultatai

Po baltymų kinetikos tyrimo mėginiai su agregavusiu $A\beta_{42}$ buvo perkeliama ant žeručio ir tiriami atominės jėgos mikroskopu. Pirmiausia buvo tiriami 8 μM koncentracijos $A\beta_{42}$ PBS ir dSS tirpaluose ir lyginamos jų agregacijos savybės (fibrilių morfologija, agregatų sancaupų pasiskirstymas ir gausumas). Šis palyginimas vaizduojamas 11 paveiksle.



11. Pav. Atominės jėgos mikroskopijos būdu gautos nuotraukos, parodančios 8 μM koncentracijos $A\beta_{42}$ amiloidinių fibrilių skirtumus fosfatų buferiniame tirpale (PBS) ir dirbtiniame smegenų skystyje (dSS). A dalies viršuje pavaizduotos 10 $\times$ 10 μm (1024 $\times$ 1024 pikselių) nuotraukos. Apačioje pavaizduotos iš tų pačių mėginių gautos priartintos 4 $\times$ 4 μm (1024 $\times$ 1024 pikselių) nuotraukos. B dalyje pavaizduotas atsitiktine tvarka 10 $\times$ 10 μm nuotraukose sužymėtų fibrilių aukščių pasiskirstymo grafikas (n = 50). C dalyje vaizduojama histograma, kurioje vaizduojamas fibrilių aukščių pasiskirstymas pagal taškų dažnį.

Pagal 11. pav. A dalies nuotraukas galima matyti, kad PBS tirpale $A\beta_{42}$ formuoja tankesnes agregatų sankaupas lyginant su dSS, kuriame fibrilės yra labiau pasisklaidžiusios. Remiantis 11. Pav. B dalyje pavaizduotu penkiasdešimties aukščio pasiskirstymo grafiku ($n = 50$), galima įvertinti bendrą fibrilių aukščių pasiskirstymą. Patikrinus duomenų normalumą atliekant Shapiro-Wilk analizę ($p > 0,05$) ir atlikus T-testo statistinę analizę, įvertinta, kad PBS tirpale fibrilių aukščių pasiskirstymas yra pastovesnis – vidurkis (4,9 nm) sutampa su medianos linija (4,9 nm), standartinis nuokrypis – $SD = 1,26$ nm. Kita vertus dSS tirpale matomas didesnis bendras fibrilių aukštis (vidurkis $\sim 5,9$ nm, medianos linija ties $\sim 5,6$ nm), standartinis nuokrypis – $SD = 2,49$ nm. Taip pat, remiantis 11. Pav. C dalimi galima pastebėti, kad agregatų, formotų dSS, aukščio pasiskirstymas yra labiau variabilus, išskiriamos 6 skirtingų aukščių fibrilių populiacijos (palyginus su 3 populiacijomis $A\beta_{42}$ fibrilių, formotų PBS). Tai parodo, kad dSS fibrilių aukščiai yra mažiau pastovūs. Statistinis reikšmingumas darant prielaidą apie vienodą dispersiją $p = 0,018$, darant prielaidą, kad dispersijos skiriasi – $p = 0,019$. Apibendrinant įvertinta, kad tarp dSS ir PBS suformotų $A\beta_{42}$ agregatų aukščių pastebimas statistiškai reikšmingas skirtumas. Remiantis šiais pastebėjimais buvo sudaryti pavienių fibrilių aukščio žemėlapiai, siekiant vizualizuoti detalų pavienės fibrilės profilį PBS ir dSS tirpaluose (12. pav.).

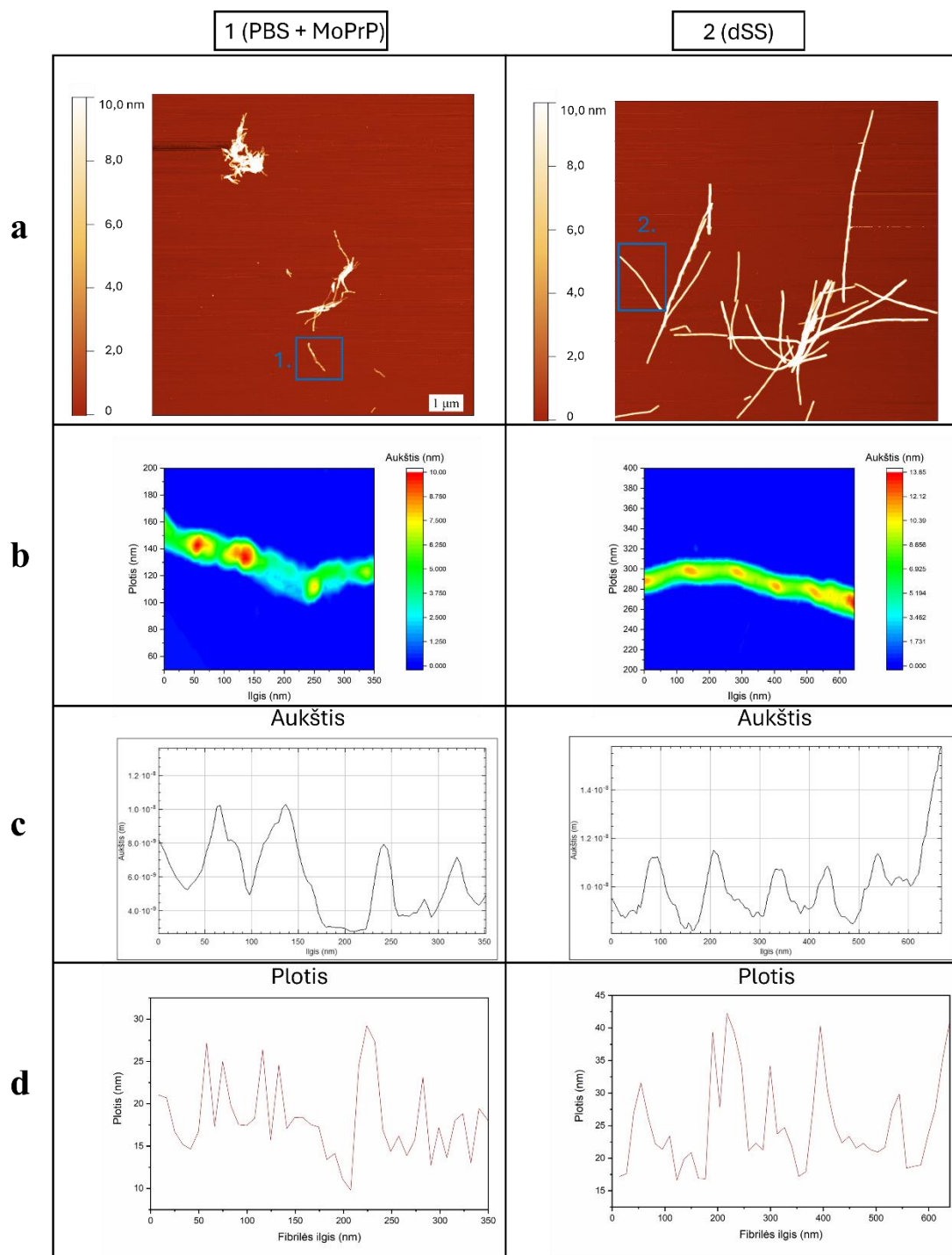


12. Pav. Pavienių fibrilių, gautų atominės jėgos mikroskopijos būdu, profilių analizė. Fibrilės paimtos iš nuotraukų, pavaizduotų 12. pav. Kairėje pusėje (1 (PBS)) pavaizduota $A\beta_{42}$ fibrilė gauta iš PBS mėginio atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos, dešinėje (2(dSS)) $A\beta_{42}$ fibrilė gauta iš dSS mėginio atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos. Viršutinėje dalyje (a) vaizduojama analizuojama fibrilė, žemiau pateikti atitinkamų fibrilių spalvinės skalės žemėlapiai (b) ir grafikai, vaizduojantys aukščio (c) bei pločio (d) pokyčius fibrilės ilgio atžvilgiu.

Remiantis šiuo individualių fibrilių palyginimu galima pastebėti, kad PBS tirpale suformuotos $A\beta_{42}$ fibrilių aukščio smailės ir įdubos pasiskirsčiusios stabilesniais periodais lyginant su dSS tirpale suformuota $A\beta_{42}$ fibrile, kurios smailės ir įdubos nėra taip reguliariai pasiskirsčiusios. Taip pat galima pastebėti, kad smailių aukštis PBS tirpale suformuotoje fibrilėje yra pastovesnis, kas gali paaiškinti ankstesniuose rezultatuose (11. pav.) įvertintą tolygesnį $A\beta$ fibrilių aukščio pasiskirstymą PBS tirpale. Aukščiausia smailė, pastebima dSS tirpale suformuotoje fibrilėje ~ 5,58 nm. Remiantis 12.

pav. D dalyje vaizduojamu fibrilių pločio pasiskirstymo ilgio atžvilgiu grafikais, galima matyti, kad PBS tirpale suformuota fibrilė buvo plonesnė, nei dSS tirpale suformuota fibrilė. Tam įtaką galėjo daryti skirtumai tarp fibrilių tiesumo, matomi 12. pav. B dalyje, kur matoma, kad dSS tirpale suformuota fibrilė turėjo labiau netaisyklingą formą (daugiau sūkių)

Toliau tyrimo metu buvo vertinami $A\beta_{42}$ agregacijos skirtumai tarp $A\beta_{42}$ dSS tirpale ir $A\beta_{42}$ PBS tirpale su MoPrP23-143 (13. pav.).

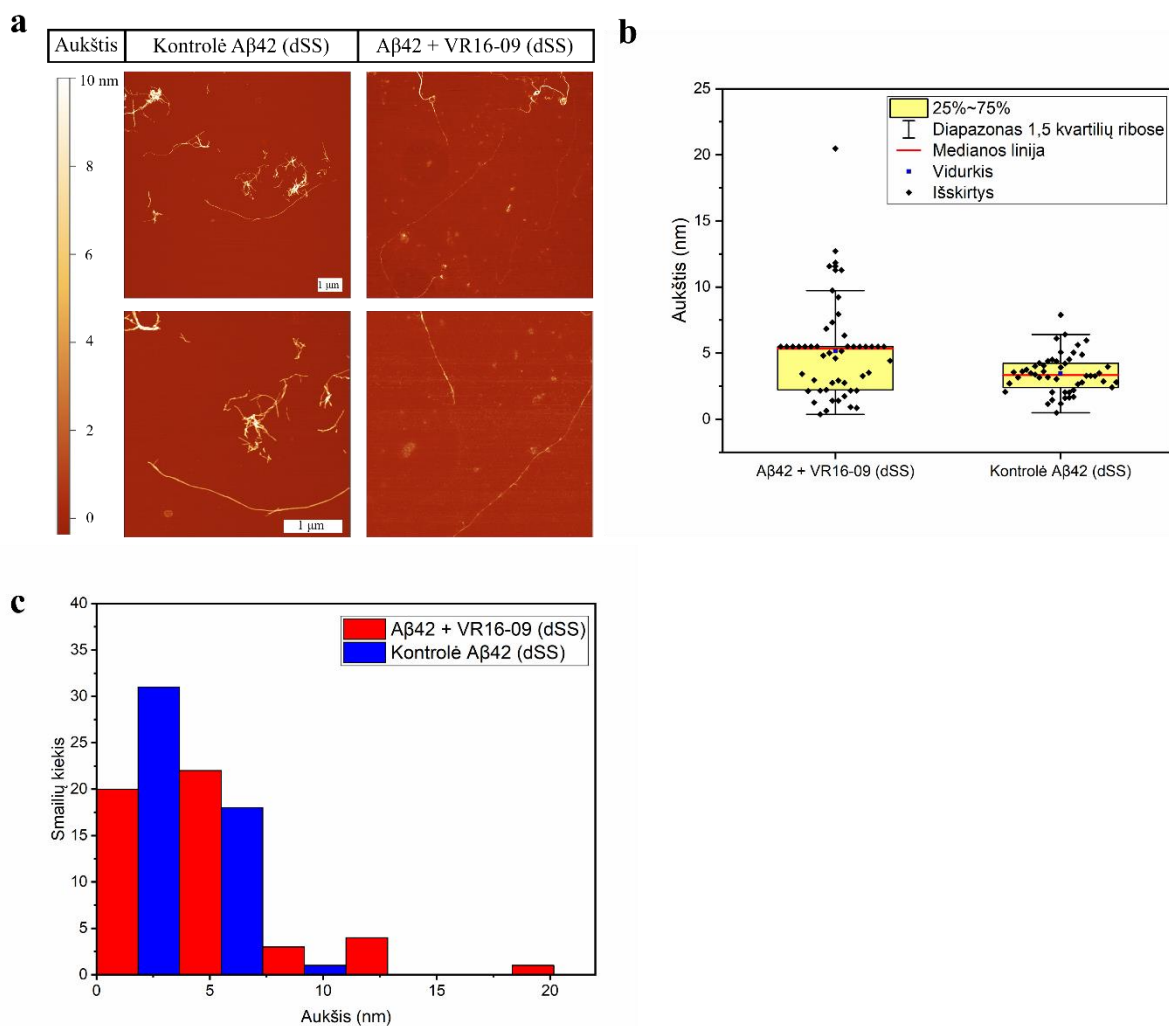


13. Pav. Atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos (a) gautos lyginant 8 μ M koncentracijos $A\beta_{42}$ agregatus dSS tirpale ir PBS tirpale su kartu agreguojančiu pelės prioninio baltymo N galo motyvu MoPrP23-143. Taip pat individualių pavienių fibrilių iš nuotraukų spalvų spektro žemėlapiai (b),

aukščio (c) ir pločio (d) pasiskirstymo ilgio atžvilgiu analizė. Numeriu 1 pažymėta PBS tirpale su MoPrP prioninio baltymo N galo motyvu suformuota pavienė analizuojama fibrilė, numeriu 2 dSS tirpale suformuota pavienė analizuojama fibrilė. Šių fibrilių aukščio analizės pateiktos apačioje, atitinkamai pažymėtos numeriais 1 ir 2.

Remiantis atominės jėgos mikroskopijos nuotraukomis (13. pav. A) galima įvertinti, kad PBS tirpale su ko-agreguojančiu MoPrP23-143 prioninio baltymo N galo motyvu, A β ₄₂ agregatai yra koncentruoti keliuose taškuose, su keletu pavienių fibrilių. Dėl šios priežasties didelio kiekio fibrilių aukščių profilių analizės atlikti nepavyko. Dirbtinio smegenų skysčio (dSS) tirpale, A β ₄₂ fibrilės buvo agregavusios mažiau tankiai, sudarydamos daugiau pavienių fibrilių. Pavienių fibrilių spalvų spektro (b), aukščio (c) ir pločio (d) pasiskirstymo ilgio atžvilgiu profiliai parodo, kad dSS tirpale suformuota A β ₄₂ fibrilė buvo aukštesnė (dauguma smailių buvo aukštesnės nei 10 nm) ir platesnė (pločių variacija nuo ~ 17 nm iki ~ 40 nm). Remiantis šiuo rezultatu bei didesniu fibrilių aukščių pasiskirstymo variabilumu nustatytu 11. pav. C dalyje, galima teigti, kad dSS tirpale sudaro sąlygas „brandžių“ (aukštų ir plačių) fibrilių polimorfų formavimuisi.

Tyrimo metu taip pat buvo atliktas palyginimas tarp 8 μ M koncentracijos A β ₄₂ fibrilių suformuotų dSS tirpale naudojant VR16-09 (fluorintas benzensulfonamidas) agregacijos slopiklį ir nenaudojant slopiklio (14. pav.).

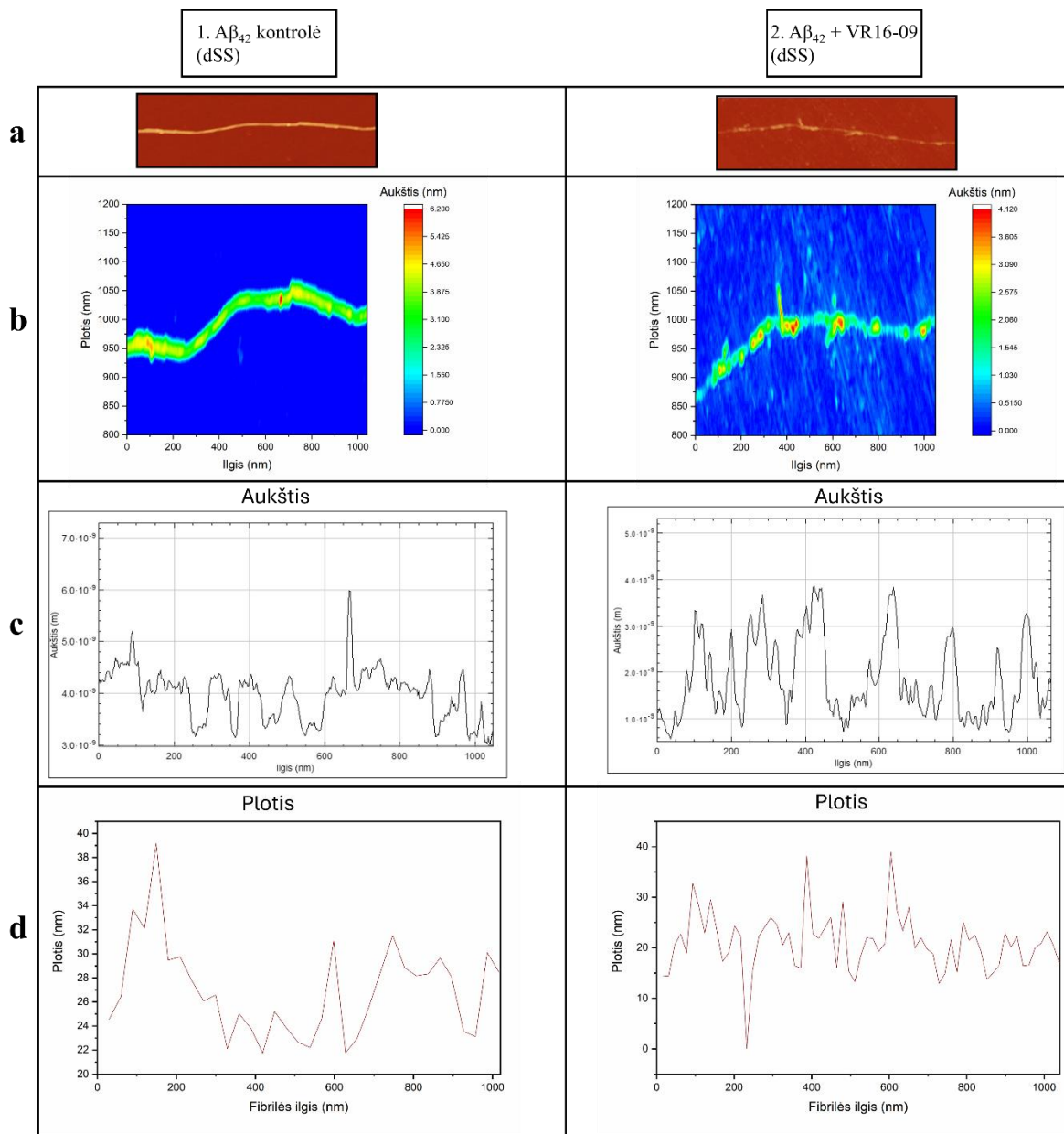


14. Pav. Atominės jėgos mikroskopijos būdu gautos nuotraukos, parodančios 8 μ M koncentracijos A β ₄₂ amiloidinių fibrilių skirtumus dirbtiniame smegenų skystyje (dSS) naudojant slopiklį VR16-09 (fluorinta benzensulfonamida) ir lyginant su kontroliniu mėginiu be slopiklio. A dalies viršutinėje eilėje pavaizduotos 10 $\times$ 10 μ m (1024 $\times$ 1024 pikselių) nuotraukos. Apatinėje eilėje pavaizduotos iš tų pačių mėginių gautos priartintos 4 $\times$ 4 μ m (1024 $\times$ 1024 pikselių) nuotraukos. Dešinėje pusėje pavaizduotas atsitiktine tvarka 10 $\times$ 10 μ m nuotraukose sužymėtų fibrilių (n = 50) aukščių pasiskirstymo grafikas (n = 50). C dalyje vaizduojama histograma, kurioje vaizduojamas fibrilių aukščių pasiskirstymas pagal taškų dažnį.

Gautose atominės jėgos mikroskopijos nuotraukose (14. pav. A) matomas didesnis fibrilių kiekis kontroliniame mėginyje lyginant su mėginiu, turinčiu agregacijos slopiklį. Kontroliniame mėginyje fibrilės tiesesnės, matomos sritys, kuriose agregatai susikaupę tankiai ir matomos kelios pavienės ilgos, aukštos fibrilės. Mėginyje su slopikliu matomos kelios ilgos, bet neaukštos fibrilės bei kelios tankesnės agregatų sankaupos, kuriuose dominuoja fibrilės, turinčios daug sūkių ir žemo aukščio galus. Taip pat mėginyje su inhibitoriumi matoma daugiau smulkių junginių, kurie gali būti smulkios fibrilės arba oligomerai. 14. pav. B iliustracijos dalyje pavaizduotas atsitiktine tvarka parinktų fibrilių aukščių pasiskirstymo grafikas (n = 50) tarp mėginio su inhibitoriumi (VR16-09) ir

kontrolės. Atlikus Shapiro-Wilk analizę buvo pastebėta, kad duomenų pasiskirstymas nėra normalus ($p < 0.05$), taigi statistinei analizei buvo pasirinktas Mann-Whitney tyrimas. Jo metu nustatyta kontrolinio mėginio medianos linija – 3,33 nm, mėginyje, kuriame $A\beta_{42}$ buvo paveiktas inhibitoriumi, nustatyta medianos linija – 5,32 nm ($p = 0,014$). Remiantis šiais duomenimis galima įvertinti, kad didžiosios dalies fibrilių, paveiktų inhibitoriumi (VR16-09), aukštis buvo mažesnis nei kontrolinio mėginio be inhibitoriaus. Remiantis grafiku galima pastebėti, kad inhibitoriaus paveiktų $A\beta_{42}$ fibrilių aukščiai yra labiau pastovūs virš 5,32 nm, o mažesnio aukščio fibrilių pasiskirstymo įvairovė yra didesnė. Visgi, mėginyje paveiktame inhibitoriaus matoma daugiau aukštų fibrilių išskirčių. Taip pat remiantis 14. Pav. C dalimi galima pastebėti, kad agregatų, formuotų dSS su agregacijos inhibitoriumi (VR16-09), aukščio pasiskirstymas yra labiau variabilus, išskiriamos 5 skirtingų aukščių fibrilių populiacijos (palyginus su 3 populiacijomis $A\beta_{42}$ fibrilių formuotų dSS tirpale). Tai parodo, kad dSS tirpale su agregacijos inhibitoriumi (VR16-09) suformuotų fibrilių aukščiai yra mažiau pastovūs.

Toliau buvo nagrinėjamos pavienės $A\beta_{42}$ fibrilės, suformuotos dSS tirpale su ir be agregacijos inhibitoriaus (VR16-09). Buvo vertinamas individualių fibrilių aukščio ir pločio pasiskirstymas ilgio atžvilgiu bei sudaromi spalvinės skalės fibrilių žemėlapiai (15. pav.).



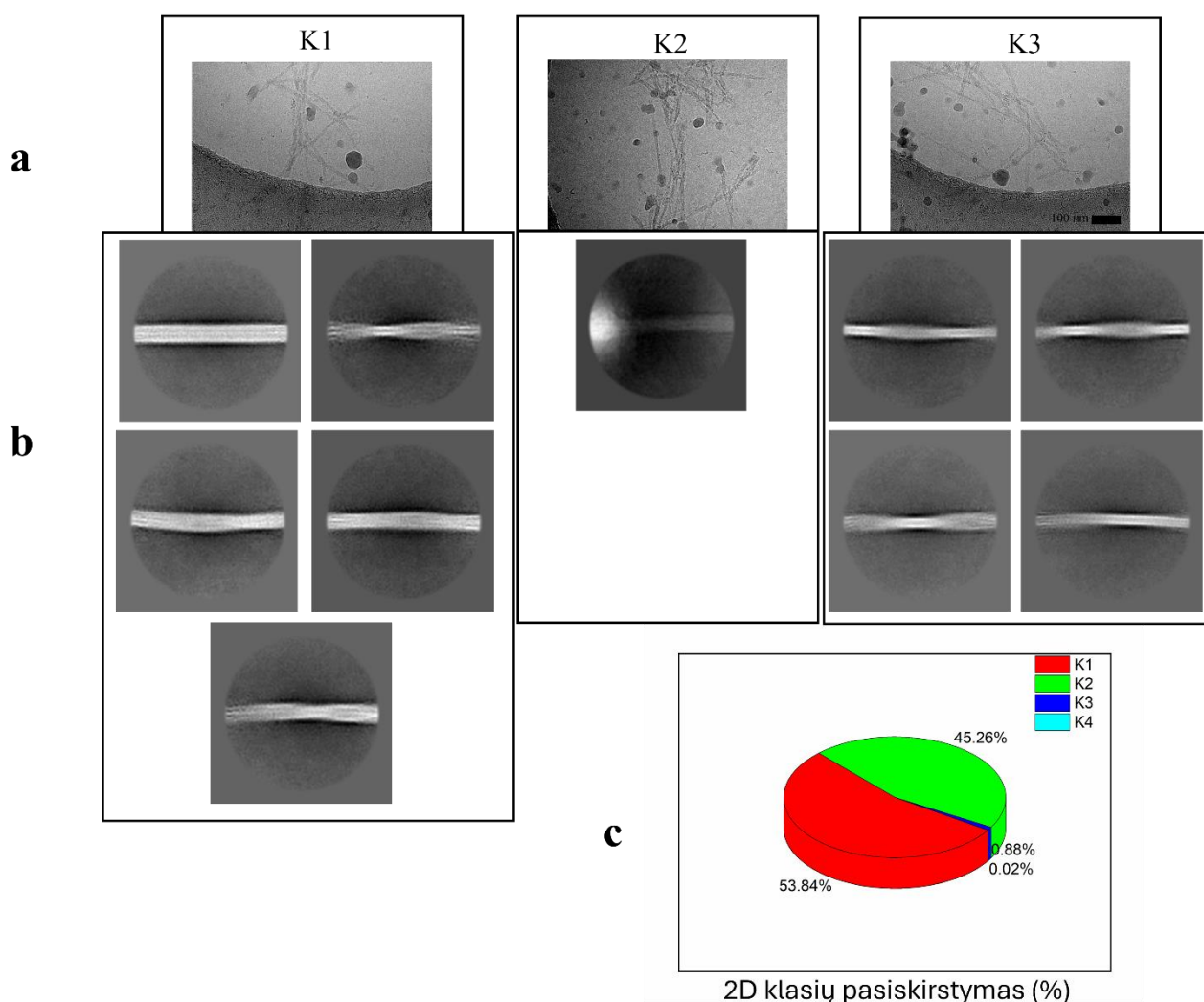
15. Pav. Pavienių fibrilių, gautų atominės jėgos mikroskopijos būdu, profilių analizė. Fibrilės paimtos iš nuotraukų, pavaizduotų 15. pav. Iliustracijoje pateiktos naudojant 8 μM koncentracijos A β_{42} suformuotos fibrilės. Kairėje pusėje vaizduojama kontrolė be inhibitoriaus, dešinėje – su inhibitoriumi VR16-09 (fluorintu benzensulfonamidu). Viršutinėje nuotraukoje (a) vaizduojama analizuojama fibrilė, žemiau pateikti atitinkamų fibrilių spalvinės skalės žemėlapiai (b) bei grafikai vaizduojantys aukščio (c) ir pločio (d) pokyčius fibrilės ilgio atžvilgiu.

Remiantis gautais spalvų spektro žemėlapiais ir fibrilių aukščio ilgio atžvilgiu grafiku, galima pastebėti skirtumus tarp mėginio paveikto inhibitoriumi (15. pav. 2) ir kontrolės (15. pav. 1). Mėginyje su inhibitoriumi (15. pav. 2. B), galima matyti fibrilę supančius smulkius taškus, kurie, veikiausiai, yra smulkios fibrilės ar įvairūs oligomerai, kurių agregacija buvo slopinama. Taip pat remiantis 15. pav. C dalimi galima matyti, kad fibrilė gauta mėginyje su agregacijos inhibitoriumi turi daugiau trūkių ir giles įdubas, kurių aukščiai daug žemesni nei kontrolės (aukščių variacija nuo $\sim 0,3$ nm iki $\sim 3,8$ nm). Tai parodo, kad fibrilė, suformuota dSS tirpale su agregacijos inhibitoriumi

(VR16-09), yra galimai praardyta ir lyginant su kontrole mažiau morfologiškai pastovi. Pločio pasiskirstymai (15. pav. D) tarp fibrilių yra panašūs, bet pastovesnis plotis matomas fibrilėje, gautoje dSS su agregacijos inhibitoriumi (VR16-09).

3.4 Kriogeninės elektronų mikroskopijos rezultatai

Atominės jėgos mikroskopijos metu gauti duomenys buvo apdorojami naudojant „Relion“ programą ir analizuojami „FilamentTools“ programa. Fibrilių 2D profiliai buvo klasifikuojami pagal jų morfologines savybes. Pirmiausia buvo klasifikuojamos kontrolinio mėginio fibrilės, inkubuotos be inhibitoriaus (16. pav.)

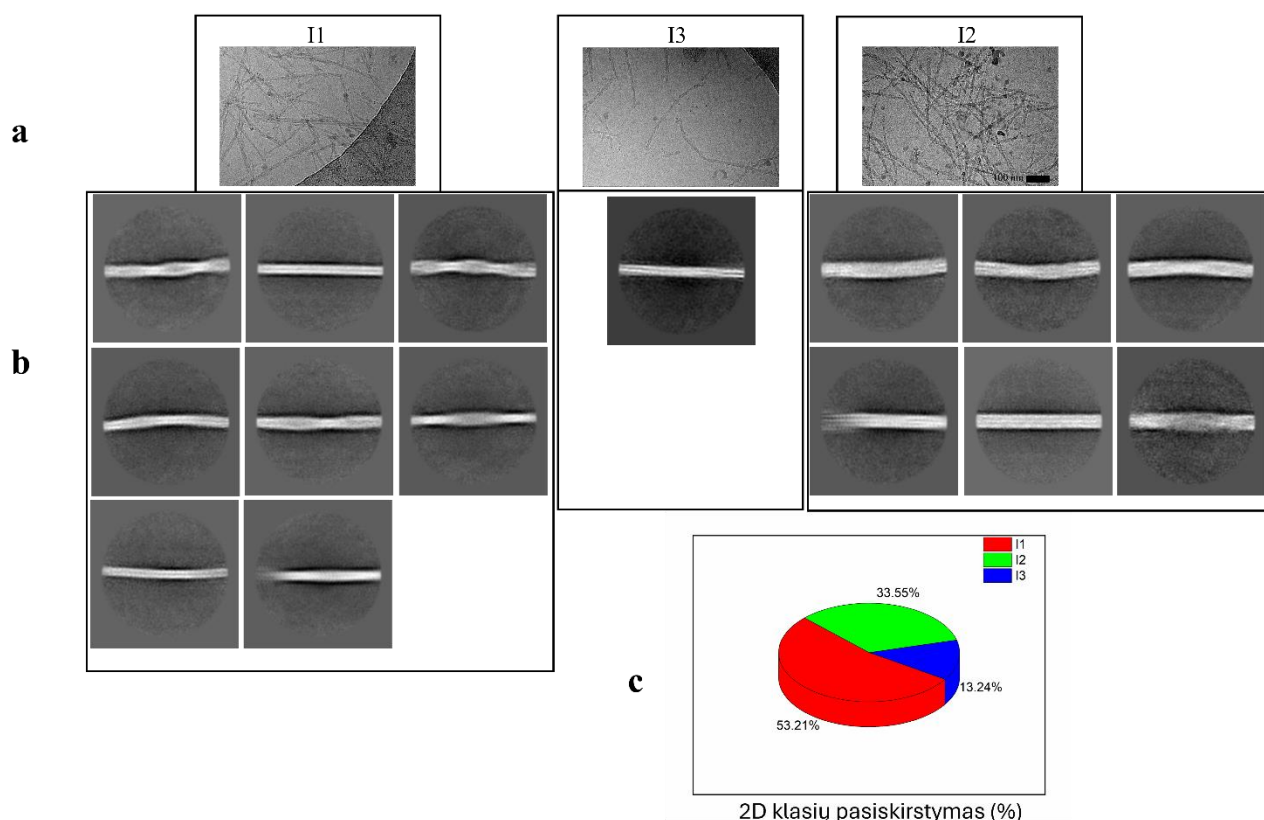


16. Pav. Kriogeninės elektronų mikroskopijos gautų fibrilių 2D profilių klasifikacija gauta naudojant „FilamentTools“ programą. Naudotas kontrolinis mėginys, kuriame $A\beta_{42}$ buvo inkubuojamas dirbtiniame smegenų skystyje be inhibitoriaus. Pagrindinės klasės vaizduojamos A skiltyje (K1, K2 ir K3). B skiltyje vaizduojami atitinkančioms klasėms priklausančių 2D profilių pavyzdžiai. C skiltyje

pavaizduotas klasių pasiskirstymą vaizduojantis grafikas. Juodai pavaizduotas 100 nm dydžio skalės žymuo.

Pagal gautą klasifikaciją galima matyti, kad kontroliniame mėginyje didžioji dalis fibrilių skirstomos į dvi klases. Raudonai pažymėta (K1) grupė, sudaranti 53,84 % visų parinktų fibrilių, kuriai būdingos tiesios ir plačios fibrilės. Žaliai pažymėta (K2) grupė, sudaranti 45,26 % parinktų fibrilių, kuriai būdingos plonesnės fibrilės su vienu ar daugiau sūkių. Taip pat klasifikuojamos dvi smulkesnės klasės – mėlyna (K3), sudaranti 0,88 % parinktų fibrilių ir žydra (K4), sudaranti 0,02 % parinktų fibrilių. K3 klasei, veikiausiai, priklauso netipinės fibrilės arba protofibrilės, taip pat ši klasė, remiantis B skilties duomenimis, gali būti programiškai išskiriama, įtraukiant fibriles, kurių nuotraukose susidaręs vaizdinis „triukšmas“ sudarant fibriles išskiriantį vaizdą. K4 klasei galimai priskiriamos retos morfologijos (netipinės) fibrilės arba į šia grupę irgi yra įtrauktos fibrilės su vaizdiniu „triukšmu“ sudarant retos fibrilės vaizdo įspūdį. A skiltyje pavaizduotose mikrofotose matomos tankios ilgų, struktūriškai variabilių fibrilių sankaupos.

Toliau pagal morfologines savybes buvo klasifikuojami mėginio su inhibitoriumi VR16-09 fibrilių 2D profiliai (17. pav.).



17. Pav. Kriogeninės elektronų mikroskopijos gautų fibrilių 2D profilių klasifikacija, gauta naudojant „FilamentTools“ programą. Naudotas mėginys, kuriame A β ₄₂ buvo inkubuojamas dirbtiniame smegenų skystyje su inhibitoriumi VR16-09 (fluorintu benzensulfonamidu). Pagrindinės grupės vaizduojamos A skiltyje (K1, K2 ir K3). B skiltyje vaizduojami atitinkančioms grupėms

priklausančių 2D profilių pavyzdžiai. C skiltyje pavaizduotas klasių pasiskirstymą vaizduojantis grafikas. Juodai pavaizduotas 100 nm dydžio skalės žymuo.

Mėginyje su inhibitoriumi fibrilės klasifikuojamos į 3 pagrindines klases. Raudonai pažymėta (I1) klasė sudaro didžiąją fibrilių dalį (53,21 %), jai priskiriamos plonos, lenktos fibrilės su vienu ar daugiau sūkių. Žaliai pažymėta (I2) klasei priskiriama 33,55 % parinktų fibrilių, šiai klasei būdingos plačios ir tiesesnės fibrilės. Mėlynai pažymėta (I3) grupei priskiriamos plonos tiesios fibrilės.

Vertinant 16 ir 17 paveikslėliuose pavaizduotas klasifikacijas galima pastebėti, kad kontroliniame mėginyje be inhibitoriaus dominuoja K1 klasės (53,84 %) tiesios plačios fibrilės. Remiantis morfologinėmis fibrilių savybėmis, šios klasės atitikmuo mėginyje su inhibitoriumi yra I3, sudaranti 33,55 % fibrilių. Mėginyje su inhibitoriumi dominuoja plonos fibrilės, kas gali reikšti agregacijos pokyčius arba nepakankamą oligomerų prieinamumą dėl inhibicijos. Pagal gautus duomenis matoma, kad VR16-09 pilnai nesustabdo fibrilių susidarymo, bet pakeičia fibrilių morfologinį pasiskirstymą, sudarant sąlygas, kuriose dominuoja plonos, lenktos, vieną ar daugiau sūkių turinčios fibrilės.

Lyginant gautus rezultatus (16. pav. ir 17. pav.) galima pastebėti, kad dSS (dirbtinio smegenų skysčio) tirpale $A\beta_{42}$ fibrilėms būdingos dvi pagrindinės polimorfinės formos. Remiantis kitų mokslininkų tyrimais, *in vivo* randamas mažesnis kiekis $A\beta_{42}$ fibrilių polimorfinių formų variacijų (dominuoja 1-2 skirtingos formos). Polimorfizmo variabilumas yra veikiamas aplinkos sąlygų (buferinio tirpalo sudėties, agregacijos slopiklių naudojimo), kas yra atkartojama gautuose rezultatuose (16. pav. ir 17. pav.), kuriuose matoma, kad mėginyje su agregacijos inhibitoriumi (VR16-09) nustatoma didesnė fibrilių įvairovė. Taip pat tam tikros polimorfinės formos gali pasižymėti skirtingu toksiškumu. Didesnė polimorfų variacija potencialiai gali sumažinti pagrindinių $A\beta_{42}$ polimorfų toksiškumą dėl mažesnio jų kiekio ir alternatyvios morfologijos fibrilių formavimosi (Yang et. al., 2022; Watanabe et. al., 2016; Tycko, 2015).

Išvados

1. PBS tirpale $A\beta_{42}$ fibrilės agreguoja ~ 2 kartus greičiau nei dSS tirpale.
2. $A\beta_{42}$ fibrilės dirbtiniame smegenų skystyje yra aukštesnės ir pasižymi platesniu randamų aukščių pasiskirstymu lyginant su fosfatiniame buferiniame tirpale (PBS) randamomis fibrilėmis.
3. $A\beta_{42}$ agregatai formuoti su inhibitoriumi (VR16-09) dirbtinio smegenų skysčio (dSS) tirpale pasižymi didesniu morfologiniu variabilumu ir plonesnėmis daugiau sūkių turinčiomis fibrilėmis lyginant su kontrole be inhibitoriaus.

Autoriaus asmeninis indėlis

Tyrimo idėja buvo suformuluota vadovo Dr. Andriaus Sakalausko. Tyrimų planavimas buvo atliekamas prisidedant vadovui. Eksperimentų vykdymas buvo atliktas savarankiškai. Kriogeninės elektronų mikroskopijos matavimai buvo atlikti Dr. Dariaus Šulskio CEITEC laboratorijoje (Bruno, Čekija). Rezultatų analizė buvo atliekama savarankiškai. Išvadų formulavimas buvo atliekamas savarankiškai, pasitariant su tyrimo vadovu.

Padėkos

Už tyrimo idėjos suformulavimą ir tyrimo eigoje suteiktą pagalbą (metodikos apmokymą, konsultacijas teorijos ir praktikos klausimais) norėčiau padėkoti darbo vadovui Dr. Andriui Sakalauskui. Taip pat už konsultacijas teoriniais ir darbo rašymo klausimais norėčiau padėkoti darbo konsultantei Justinai Versockienei. Padėka Dr. Dariui Šulskiui už atliktus kriogeninės atominės jėgos mikroskopijos tyrimus ir suteiktus duomenis bei apmokymą naudojantis kriogeninės elektronų mikroskopijos duomenų analizės programomis.

VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS
MOKSLŲ CENTRAS

Rokas Saulius Vasiliauskas
Magistrinis darbas

**Rekombinantinio amiloido-beta agregatų formuotų dirbtiniame smegenų
skystyje tyrimai**

SANTRAUKA

Viena pagrindinių demencijos vystymosi priežasčių yra Alzheimerio liga, kurios vienu iš pagrindinių sukėlėjų yra laikomas $A\beta_{42}$ amiloidas, turintis savybę agreguotis ir formuoti fibriles. Amiloidų agregaciją stabdančių vaistų efektyvumas priklauso nuo tyrimuose naudojamų tirpalų sudėties. Tikslus fiziologinių sąlygų atkartojimas gali paveikti Alzheimerio ligos sukėlėjo $A\beta_{42}$ amiloido agregacijos savybes, tokias kaip fibrilių morfologiją ir agregacijos greičius, taip pat paveikiant tiriamojo vaisto sąveiką su jo taikiniais, teigiamai arba neigiamai paveikiant efektyvumą. Šio darbo tikslas buvo įvertinti $A\beta_{42}$ amiloidinio baltymo agregacijos kinetines ir morfologines (fibrilių struktūra, dydis, pasiskirstymas) savybes dirbtiniame smegenų skystyje dSS ir fosfatų buferiniame tirpale PBS. Tikslui pasiekti buvo atlikti $A\beta_{42}$ agregacijos kinetiniai tyrimai dirbtiniame smegenų skystyje dSS ir fosfatų buferiniame tirpale PBS. Įvertinta, kad PBS tirpale fibrilės agreguoja greičiau. Remiantis atominės jėgos mikroskopijos rezultatais buvo įvertinta, kad $A\beta_{42}$ fibrilės dirbtiniame smegenų skystyje yra labiau išsisklaidžiusios, aukštesnės ir pasižymi platesniu randamų aukščių pasiskirstymu lyginant su fosfatų buferiniame tirpale (PBS) randamomis fibrilėmis. Taip pat, įvertinus kriogeninės elektronų mikroskopijos rezultatus nustatyta, kad $A\beta_{42}$ fibrilės, paveiktos inhibitoriumi, morfologiškai klasifikuojamos į daugiau klasių lyginant su kontrole be inhibitoriaus. Taip pat, inhibitoriaus paveiktuose mėginiuose dominuoja plonesnės fibrilės su daugiau sūkių, lyginant su kontrole be inhibitoriaus.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Rokas Saulius Vasiliauskas
Bachelor thesis

Attaining the sequence of the A β ₄₂ gene

SUMMARY

One of the main causes of dementia development is Alzheimer's disease, with A β ₄₂ amyloid considered one of its primary pathological agents due to its ability to aggregate and form fibrils. The efficiency of drugs that inhibit amyloid aggregation depends on the composition of the media used in experimental studies. Accurate replication of physiological conditions can influence the aggregation properties of the A β ₄₂ amyloid, affecting fibril morphology and aggregation kinetics, and may also affect the interaction between the drug and its targets, thereby positively or negatively impacting its effectiveness. The aim of this study was to evaluate the kinetic and morphological (fibril structure, size, and distribution) properties of the A β ₄₂ amyloid protein aggregates in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) and in the physiological buffer PBS. To achieve this aim, aggregation kinetics of A β ₄₂ were studied in both aCSF and PBS, with the results indicating that fibrils aggregate faster in PBS. Atomic force microscopy analysis revealed that A β ₄₂ fibrils in aCSF are more dispersed, taller, and exhibit a broader height distribution compared to fibrils formed in PBS. Additionally, cryo-electron microscopy results showed that A β ₄₂ fibrils affected by the inhibitor can be morphologically classified into a greater number of classes than those in the control group without the inhibitor. In the samples treated by the inhibitor, thinner fibrils with more twists dominate compared to the control samples without the inhibitor.

Literatūros sąrašas

1. “Beta-Amyloid Peptide (1-42) (Human).” Accessed May 4, 2025. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71773143>.
 2. “Cryo EM 101 – Cryo EM 101.” Accessed May 22, 2025. <https://cryoem101.org/>.
 3. “Cryo-EM Structures of Amyloid- β 42 Filaments from Human Brain.” *Science (New York, N.Y.)* 375, no. 6577 (January 14, 2022): 167–72. <https://doi.org/10.1126/science.abm7285>.
 4. “What Is AFM? Learn about Atomic Force Microscopy! - NanoAndMore.” Accessed May 4, 2025. https://www.nanoandmore.com/what-is-atomic-force-microscopy?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwkZm_BhDrARIsAAEbX1F8fDfplzgucr2FKX_T88nCJ1ep1h1bxfbOLI1JwnkUVs3qP0jEPSMaALTFEALw_wcB.
 5. Adamcik, Jozef, and Raffaele Mezzenga. “Study of Amyloid Fibrils via Atomic Force Microscopy.” *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17, no. 6 (December 1, 2012): 369–76. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.08.001>.
 6. Alavi, Sana, Hamed Ghadiri, Bahareh Dabirmanesh, and Khosro Khajeh. “SPR Analysis of SUMO-Murine Rap1-Interacting Factor 1 C-Terminal Domain Interaction with G4.” *Biosensors* 12, no. 1 (January 12, 2022): 37. <https://doi.org/10.3390/bios12010037>.
 7. Alzheimer’s Association. “Aducanumab to Be Discontinued as Alzheimer’s Treatment | Alz.Org.” Accessed May 4, 2025. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments/aducanumab>.
 8. Alzheimer’s Association. “Alzheimer’s Disease Facts and Figures.” Accessed April 25, 2023. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures>.
- Alzheimer’s Association. “Alzheimer’s Disease Facts and Figures.” Accessed May 5, 2025. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures>.
9. Alzheimer’s Association. “Medical Tests.” Accessed May 4, 2025. https://www.alz.org/alzheimers-dementia/diagnosis/medical_tests.
 10. Ameen, Taha Basit, Syeda Naveera Kashif, Syed Muhammad Iraj Abbas, Kulsoom Babar, Syed Muhammad Sinaan Ali, and Abdul Raheem. “Unraveling Alzheimer’s: The Promise of Aducanumab, Lecanemab, and Donanemab.” *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery* 60, no. 1 (June 14, 2024): 72. <https://doi.org/10.1186/s41983-024-00845-5>.
 11. Arndt, Joseph W., Fang Qian, Benjamin A. Smith, Chao Quan, Krishna Praneeth Kilambi, Martin W. Bush, Thomas Walz, et al. “Structural and Kinetic Basis for the Selectivity of

- Aducanumab for Aggregated Forms of Amyloid- β .” *Scientific Reports* 8 (April 23, 2018): 6412. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24501-0>.
12. Barz, Bogdan, and Brigita Urbanc. “Dimer Formation Enhances Structural Differences between Amyloid β -Protein (1-40) and (1-42): An Explicit-Solvent Molecular Dynamics Study.” *PloS One* 7, no. 4 (2012): e34345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034345>.
 13. Bernstein, Summer L., Nicholas F. Dupuis, Noel D. Lazo, Thomas Wyttenbach, Margaret M. Condron, Gal Bitan, David B. Teplow, et al. “Amyloid- β Protein Oligomerization and the Importance of Tetramers and Dodecamers in the Aetiology of Alzheimer’s Disease.” *Nature Chemistry* 1, no. 4 (July 2009): 326–31. <https://doi.org/10.1038/nchem.247>.
 14. Bitan, Gal, Marina D. Kirkitadze, Aleksey Lomakin, Sabrina S. Vollers, George B. Benedek, and David B. Teplow. “Amyloid Beta -Protein (Abeta) Assembly: Abeta 40 and Abeta 42 Oligomerize through Distinct Pathways.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 1 (January 7, 2003): 330–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.222681699>.
 15. Blennow, Kaj. “A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer’s Disease: Moving from CSF to Blood.” *Neurology and Therapy* 6, no. Suppl 1 (July 21, 2017): 15–24. <https://doi.org/10.1007/s40120-017-0073-9>.
 16. Braun, Gabriel A., Alexander J. Dear, Kalyani Sanagavarapu, Henrik Zetterberg, and Sara Linse. “Amyloid- β Peptide 37, 38 and 40 Individually and Cooperatively Inhibit Amyloid- β 42 Aggregation.” *Chemical Science* 13, no. 8 (2022): 2423–39. <https://doi.org/10.1039/D1SC02990H>.
 17. Chen, Guo-fang, Ting-hai Xu, Yan Yan, Yu-ren Zhou, Yi Jiang, Karsten Melcher, and H. Eric Xu. “Amyloid Beta: Structure, Biology and Structure-Based Therapeutic Development.” *Acta Pharmacologica Sinica* 38, no. 9 (September 2017): 1205–35. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>.
 18. Constantinides, Vasilios C., George P. Paraskevas, Fotini Boufidou, Mara Bourbouli, Efstratios-Stylianios Pyrgelis, Leonidas Stefanis, and Elisabeth Kapaki. “CSF A β 42 and A β 42/A β 40 Ratio in Alzheimer’s Disease and Frontotemporal Dementias.” *Diagnostics* 13, no. 4 (February 19, 2023): 783. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040783>.
 19. Côté, Sébastien, Rozita Laghaei, Philippe Derreumaux, and Normand Mousseau. “Distinct Dimerization for Various Alloforms of the Amyloid-Beta Protein: A β (1-40), A β (1-42), and A β (1-40)(D23N).” *The Journal of Physical Chemistry. B* 116, no. 13 (April 5, 2012): 4043–55. <https://doi.org/10.1021/jp2126366>.

20. Czarniak, Natalia, Joanna Kamińska, Joanna Matowicka-Karna, and Olga Martyna Koper-Lenkiewicz. "Cerebrospinal Fluid–Basic Concepts Review." *Biomedicines* 11, no. 5 (May 17, 2023): 1461. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051461>.
21. Das, Atanu, and Chaitali Mukhopadhyay. "Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View." *The Journal of Physical Chemistry B* 113, no. 38 (September 24, 2009): 12816–24. <https://doi.org/10.1021/jp906350s>.
22. Dobson, Christopher M. "The Amyloid Phenomenon and Its Links with Human Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9, no. 6 (June 2017): a023648. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023648>.
23. Doody, Rachelle S., Rema Raman, Martin Farlow, Takeshi Iwatsubo, Bruno Vellas, Steven Joffe, Karl Kieburtz, et al. "A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine* 369, no. 4 (July 25, 2013): 341–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1210951>.
24. Florean, Cristina, Enrico Zampese, Marion Zanese, Lucia Brunello, François Ichas, Francesca De Giorgi, and Paola Pizzo. "High Content Analysis of γ -Secretase Activity Reveals Variable Dominance of Presenilin Mutations Linked to Familial Alzheimer's Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783, no. 8 (August 1, 2008): 1551–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.03.012>.
25. Frankel, Rebecca, Mattias Törnquist, Georg Meisl, Oskar Hansson, Ulf Andreasson, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, et al. "Autocatalytic Amplification of Alzheimer-Associated A β 42 Peptide Aggregation in Human Cerebrospinal Fluid." *Communications Biology* 2 (October 8, 2019): 365. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0612-2>.
26. Frisoni, Giovanni B, Marina Boccardi, Frederik Barkhof, Kaj Blennow, Stefano Cappa, Konstantinos Chiotis, Jean-Francois Démonet, et al. "Strategic Roadmap for an Early Diagnosis of Alzheimer's Disease Based on Biomarkers." *The Lancet Neurology* 16, no. 8 (August 2017): 661–76. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30159-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30159-X).
27. Furukawa, K., B. L. Sopher, R. E. Rydel, J. G. Begley, D. G. Pham, G. M. Martin, M. Fox, and M. P. Mattson. "Increased Activity-Regulating and Neuroprotective Efficacy of Alpha-Secretase-Derived Secreted Amyloid Precursor Protein Conferred by a C-Terminal Heparin-Binding Domain." *Journal of Neurochemistry* 67, no. 5 (November 1996): 1882–96. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67051882.x>.
28. Ghosh, Arun K., and Heather L. Osswald. "BACE1 (β -Secretase) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease." *Chemical Society Reviews* 43, no. 19 (October 7, 2014): 6765–6813. <https://doi.org/10.1039/c3cs60460h>.

29. Giaccone, Giorgio, Michela Morbin, Fabio Moda, Mario Botta, Giulia Mazzoleni, Andrea Uggetti, Marcella Catania, et al. "Neuropathology of the Recessive A673V APP Mutation: Alzheimer Disease with Distinctive Features." *Acta Neuropathologica* 120, no. 6 (December 2010): 803–12. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0747-1>.
30. Giorgetti, Sofia, Claudio Greco, Paolo Tortora, and Francesco Antonio Aprile. "Targeting Amyloid Aggregation: An Overview of Strategies and Mechanisms." *International Journal of Molecular Sciences* 19, no. 9 (September 9, 2018): 2677. <https://doi.org/10.3390/ijms19092677>.
31. Girnius, Saulius. "Overview of Systemic and Localized Amyloidosis." *Reviews in Health Care* 4, no. 4 (October 21, 2013): 231–47. <https://doi.org/10.7175/rhc.v4i4.662>.
32. Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, and L. James. "Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease." *Nature* 349, no. 6311 (February 21, 1991): 704–6. <https://doi.org/10.1038/349704a0>.
33. Gremer, Lothar, Daniel Schölzel, Carla Schenk, Elke Reinartz, Jörg Labahn, Raimond B.G. Ravelli, Markus Tusche, et al. "Fibril Structure of Amyloid- β (1-42) by Cryo-Electron Microscopy." *Science (New York, N.Y.)* 358, no. 6359 (October 6, 2017): 116–19. <https://doi.org/10.1126/science.aao2825>.
34. Guo, Tong, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. "Roles of Tau Protein in Health and Disease." *Acta Neuropathologica* 133, no. 5 (2017): 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.
35. Hamley, I. W. "The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization." *Chemical Reviews* 112, no. 10 (October 10, 2012): 5147–92. <https://doi.org/10.1021/cr3000994>.
36. Hampel, Harald, Aya Elhage, Min Cho, Liana G Apostolova, James A R Nicoll, and Alireza Atri. "Amyloid-Related Imaging Abnormalities (ARIA): Radiological, Biological and Clinical Characteristics." *Brain* 146, no. 11 (June 6, 2023): 4414–24. <https://doi.org/10.1093/brain/awad188>.
37. Higienos institutas. "Sergančių Asmenų Skaičius Pagal Diagnozių Grupes," 2022. https://stat.hi.lt/default.aspx?report_id=168.
38. Higienos institutas. "Sergančių Asmenų Skaičius Pagal Diagnozių Grupes," 2024. https://stat.hi.lt/default.aspx?report_id=168.
39. Horsley, John R., Blagojce Jovcevski, Kate L. Wegener, Jingxian Yu, Tara L. Pukala, and Andrew D. Abell. "Rationally Designed Peptide-Based Inhibitor of A β 42 Fibril Formation and Toxicity: A Potential Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease." *Biochemical Journal* 477, no. 11 (June 12, 2020): 2039–54. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200290>.

40. Irie, Kazuhiro, Kazuma Murakami, Yuichi Masuda, Akira Morimoto, Hajime Ohigashi, Ryutaro Ohashi, Kiyonori Takegoshi, Masaya Nagao, Takahiko Shimizu, and Takuji Shirasawa. "Structure of Beta-Amyloid Fibrils and Its Relevance to Their Neurotoxicity: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, no. 5 (May 2005): 437–47. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.437>.
41. Jonsson, Thorlakur, Jasvinder K. Atwal, Stacy Steinberg, Jon Snaedal, Palmi V. Jonsson, Sigurbjorn Bjornsson, Hreinn Stefansson, et al. "A Mutation in APP Protects against Alzheimer's Disease and Age-Related Cognitive Decline." *Nature* 488, no. 7409 (August 2, 2012): 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature11283>.
42. Jucker, Mathias, and Lary C. Walker. "Propagation and Spread of Pathogenic Protein Assemblies in Neurodegenerative Diseases." *Nature Neuroscience* 21, no. 10 (October 2018): 1341–49. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0238-6>.
43. Karran, Eric, Marc Mercken, and Bart De Strooper. "The Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease: An Appraisal for the Development of Therapeutics." *Nature Reviews Drug Discovery* 10, no. 9 (September 2011): 698–712. <https://doi.org/10.1038/nrd3505>.
44. Khalafi, Mohammad, William J. Dartora, Laura Beth J. McIntire, Tracy A. Butler, Krista M. Wartchow, Seyed Hani Hojjati, Qolamreza R. Razlighi, et al. "Diagnostic Accuracy of Phosphorylated Tau217 in Detecting Alzheimer's Disease Pathology among Cognitively Impaired and Unimpaired: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 21, no. 2 (February 2025): e14458. <https://doi.org/10.1002/alz.14458>.
45. Kim, Bo-Hyun, and Yuri L. Lyubchenko. "Nanoprobng of Misfolding and Interactions of Amyloid β 42 Protein." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10, no. 4 (May 2014): 871–78. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.11.016>.
46. Kim, Bo-Hyun, Nicholas Y. Palermo, Sandor Lovas, Tatiana Zaikova, John F. W. Keana, and Yuri L. Lyubchenko. "Single-Molecule Atomic Force Microscopy Force Spectroscopy Study of A β -40 Interactions." *Biochemistry* 50, no. 23 (June 14, 2011): 5154–62. <https://doi.org/10.1021/bi200147a>.
47. Kimura, Ayano, Saori Hata, and Toshiharu Suzuki. "Alternative Selection of β -Site APP-Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Cleavage Sites in Amyloid β -Protein Precursor (APP) Harboring Protective and Pathogenic Mutations within the A β Sequence." *The Journal of Biological Chemistry* 291, no. 46 (November 11, 2016): 24041–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.744722>.
48. Leisher, Solana, Adriana Bohorquez, Marcus Gay, Victoria Garcia, Renarda Jones, Dobri Baldaranov, and Michael S. Rafii. "Amyloid-Lowering Monoclonal Antibodies for the

- Treatment of Early Alzheimer's Disease." *CNS Drugs* 37, no. 8 (August 1, 2023): 671–77. <https://doi.org/10.1007/s40263-023-01021-8>.
49. Linse, Sara. "Mechanism of Amyloid Protein Aggregation and the Role of Inhibitors." *Pure and Applied Chemistry* 91, no. 2 (February 1, 2019): 211–29. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-1017>.
 50. Milne, Jacqueline L. S., Mario J. Borgnia, Alberto Bartesaghi, Erin E. H. Tran, Lesley A. Earl, David M. Schauder, Jeffrey Lengyel, Jason Pierson, Ardan Patwardhan, and Sriram Subramaniam. "Cryo-Electron Microscopy: A Primer for the Non-Microscopist." *The FEBS Journal* 280, no. 1 (January 2013): 28–45. <https://doi.org/10.1111/febs.12078>.
 51. Monica, Ciro della, Victoria Revell, Giuseppe Atzori, Rhiannon Laban, Simon S. Skene, Amanda Heslegrave, Hana Hassanin, Ramin Nilforooshan, Henrik Zetterberg, and Derk-Jan Dijk. "P-Tau217 and Other Blood Biomarkers of Dementia: Variation with Time of Day." *Translational Psychiatry* 14, no. 1 (September 13, 2024): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41398-024-03084-7>.
 52. Nordvall, Gunnar, Johan Lundkvist, and Johan Sandin. "Gamma-Secretase Modulators: A Promising Route for the Treatment of Alzheimer's Disease." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 16 (October 16, 2023). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1279740>.
 53. Ohsawa, I., C. Takamura, T. Morimoto, M. Ishiguro, and S. Kohsaka. "Amino-Terminal Region of Secreted Form of Amyloid Precursor Protein Stimulates Proliferation of Neural Stem Cells." *The European Journal of Neuroscience* 11, no. 6 (June 1999): 1907–13. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00601.x>.
 54. Padayachee, E.R., H. Zetterberg, E. Portelius, J. Borén, J.L. Molinuevo, N. Andreasen, R. Cukalevski, S. Linse, K. Blennow, and U. Andreasson. "Cerebrospinal Fluid-Induced Retardation of Amyloid β Aggregation Correlates with Alzheimer's Disease and the APOE E4 Allele." *Brain Research* 1651 (November 15, 2016): 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.022>.
 55. Piaceri, Irene, Benedetta Nacmias, and Sandro Sorbi. "Genetics of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease." *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 5, no. 1 (January 1, 2013): 167–77. <https://doi.org/10.2741/e605>.
 56. Pryor, N. Elizabeth, Melissa A. Moss, and Christa N. Hestekin. "Unraveling the Early Events of Amyloid- β Protein (A β) Aggregation: Techniques for the Determination of A β Aggregate Size." *International Journal of Molecular Sciences* 13, no. 3 (March 7, 2012): 3038–72. <https://doi.org/10.3390/ijms13033038>.
 57. PubChem. "Benzenesulfonamide." Accessed May 4, 2025. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7370>.

58. Qiu, Tian, Qian Liu, Yong-Xiang Chen, Yu-Fen Zhao, and Yan-Mei Li. "A β 42 and A β 40: Similarities and Differences." *Journal of Peptide Science* 21, no. 7 (July 2015): 522–29. <https://doi.org/10.1002/psc.2789>.
59. Rakow, Tobias, Sami El Deeb, Thomas Hahne, Deia Abd El-Hady, Hassan M. AlBishri, and Hermann Wätzig. "Investigating Effects of Sample Pretreatment on Protein Stability Using Size-Exclusion Chromatography and High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry." *Journal of Separation Science* 37, no. 18 (September 2014): 2583–90. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400189>.
60. Robinson, Stephen R., and Glenda M. Bishop. "A β as a Bioflocculant: Implications for the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 23, no. 6 (November 1, 2002): 1051–72. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00342-6](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00342-6).
61. Rohan de Silva, H. A., A. Jen, C. Wickenden, L. S. Jen, S. L. Wilkinson, and A. J. Patel. "Cell-Specific Expression of Beta-Amyloid Precursor Protein Isoform mRNAs and Proteins in Neurons and Astrocytes." *Brain Research. Molecular Brain Research* 47, no. 1–2 (July 1997): 147–56. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(97)00045-4).
62. Roy, Rimil Guha, Pravat K Mandal, and Joseph C. Maroon. "Oxidative Stress Occurs Prior to Amyloid A β Plaque Formation and Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease: Role of Glutathione and Metal Ions." *ACS Chemical Neuroscience* 14, no. 17 (September 6, 2023): 2944–54. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00486>.
63. Sakalauskas, Andrius, Mantas Ziaunys, Ruta Snieckute, Agne Janoniene, Dominykas Veiveris, Mantas Zvirblis, Virginija Dudutiene, and Vytautas Smirnovas. "The Major Components of Cerebrospinal Fluid Dictate the Characteristics of Inhibitors against Amyloid-Beta Aggregation." *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 6 (March 22, 2023): 5991. <https://doi.org/10.3390/ijms24065991>.
64. Sathya, M., P. Premkumar, C. Karthick, P. Moorthi, K. S. Jayachandran, and M. Anusuyadevi. "BACE1 in Alzheimer's Disease." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 414 (December 24, 2012): 171–78. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.08.013>.
65. Savva, Christos. "A Beginner's Guide to Cryogenic Electron Microscopy." *The Biochemist* 41, no. 2 (April 1, 2019): 46–52. <https://doi.org/10.1042/BIO04102046>.
66. Selim, Adli A., Tamer M. Sakr, Basma M. Essa, Galal H. Sayed, and Kurl E. Anwer. "99mTc-Labeled Benzenesulfonamide Derivative-Entrapped Gold Citrate Nanoparticles as an Auspicious Tumour Targeting." *Scientific Reports* 15, no. 1 (February 8, 2025): 4687. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88862-z>.

67. Sisodia, S S. “Beta-Amyloid Precursor Protein Cleavage by a Membrane-Bound Protease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, no. 13 (July 1992): 6075–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6075>.
68. Smith, Danielle G., Roberto Cappai, and Kevin J. Barnham. “The Redox Chemistry of the Alzheimer’s Disease Amyloid β Peptide.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Amyloidogenic Protein–Membrane Interaction*, 1768, no. 8 (August 1, 2007): 1976–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.02.002>.
69. Socher, Eileen, Heinrich Sticht, and Anselm H. C. Horn. “The Conformational Stability of Nonfibrillar Amyloid- β Peptide Oligomers Critically Depends on the C-Terminal Peptide Length.” *ACS Chemical Neuroscience* 5, no. 3 (March 19, 2014): 161–67. <https://doi.org/10.1021/cn400208r>.
70. Tampi, Rajesh R, Brent P Forester, and Marc Agronin. “Aducanumab: Evidence from Clinical Trial Data and Controversies.” *Drugs in Context* 10 (October 4, 2021): 2021-7–3. <https://doi.org/10.7573/dic.2021-7-3>.
71. Telano, Lauren N., and Stephen Baker. “Physiology, Cerebral Spinal Fluid.” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519007/>.
72. Tillett, Khalilia C., and Juan R. Del Valle. “N -Amino Peptide Scanning Reveals Inhibitors of A β ₄₂ Aggregation.” *RSC Advances* 10, no. 24 (2020): 14331–36. <https://doi.org/10.1039/D0RA02009E>.
73. Tiwari, Prince, Pallavi Kaila, and Purnananda Guptasarma. “Understanding Anomalous Mobility of Proteins on SDS-PAGE with Special Reference to the Highly Acidic Extracellular Domains of Human E- and N-cadherins.” *ELECTROPHORESIS* 40, no. 9 (May 2019): 1273–81. <https://doi.org/10.1002/elps.201800219>.
74. Tycko, Robert. “Amyloid Polymorphism: Structural Basis and Neurobiological Relevance.” *Neuron* 86, no. 3 (May 6, 2015): 632–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.017>.
75. UniProt. “UniProt.” Accessed May 4, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P63165/entry#P63165-1>.
76. Vadukul, Devkee M., Mahmoud Maina, Hannah Franklin, Astrid Nardecchia, Louise C. Serpell, and Karen E. Marshall. “Internalisation and Toxicity of Amyloid- β 1-42 Are Influenced by Its Conformation and Assembly State Rather than Size.” *FEBS Letters* 594, no. 21 (November 2020): 3490–3503. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13919>.
77. Vadukul, Devkee M., Oyinkansola Gbajumo, Karen E. Marshall, and Louise C. Serpell. “Amyloidogenicity and Toxicity of the Reverse and Scrambled Variants of Amyloid- β 1-

- 42.” *Febs Letters* 591, no. 5 (March 2017): 822–30. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12590>.
78. Vassar, R., B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, et al. “Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer’s Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE.” *Science (New York, N.Y.)* 286, no. 5440 (October 22, 1999): 735–41. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>.
79. Viet, Man Hoang, and Mai Suan Li. “Amyloid Peptide A β 40 Inhibits Aggregation of A β 42: Evidence from Molecular Dynamics Simulations.” *The Journal of Chemical Physics* 136, no. 24 (June 28, 2012): 245105. <https://doi.org/10.1063/1.4730410>.
80. Villegas, Sandra. “Alzheimer’s Disease: New Therapeutic Strategies.” *Medicina Clínica (English Edition)* 145, no. 2 (July 20, 2015): 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2014.05.012>.
81. Watanabe-Nakayama, Takahiro, Kenjiro Ono, Masahiro Itami, Ryoichi Takahashi, David B. Teplow, and Masahito Yamada. “High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Structural Dynamics of Amyloid β_{1-42} Aggregates.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, no. 21 (May 24, 2016): 5835–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524807113>.
82. Wille, Holger, and Jesús R. Requena. “The Structure of PrPSc Prions.” *Pathogens* 7, no. 1 (February 7, 2018): 20. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010020>.
83. World Health Organization. “Dementia.” Accessed May 5, 2025. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
84. Xue, Wei-Feng, Andrew L Hellewell, Eric W Hewitt, and Sheena E Radford. “Fibril Fragmentation in Amyloid Assembly and Cytotoxicity.” *Prion* 4, no. 1 (2010): 20–25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2850416/>.
85. Yan, R., M. J. Bienkowski, M. E. Shuck, H. Miao, M. C. Tory, A. M. Pauley, J. R. Brashier, et al. “Membrane-Anchored Aspartyl Protease with Alzheimer’s Disease Beta-Secretase Activity.” *Nature* 402, no. 6761 (December 2, 1999): 533–37. <https://doi.org/10.1038/990107>.
86. Yang, Hyun Duk, Do Han Kim, Sang Bong Lee, and Linn Derg Young. “History of Alzheimer’s Disease.” *Dementia and Neurocognitive Disorders* 15, no. 4 (December 2016): 115–21. <https://doi.org/10.12779/dnd.2016.15.4.115>.
87. Yang, Yang, Diana Arseni, Wenjuan Zhang, Melissa Huang, Sofia Lövestam, Manuel Schweighauser, Abhay Kotecha, et al. “Cryo-EM Structures of Amyloid- β 42 Filaments from Human Brain.” *Science (New York, N.Y.)* 375, no. 6577 (January 14, 2022): 167–72. <https://doi.org/10.1126/science.abm7285>.

88. Zhaliazka, Kiryl, and Dmitry Kurouski. "Nanoscale Characterization of Parallel and Antiparallel β -Sheet Amyloid Beta 1–42 Aggregates." *ACS Chemical Neuroscience* 13, no. 19 (October 5, 2022): 2813–20. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.2c00180>.
89. Zhang, Huiqin, Wei Wei, Ming Zhao, Lina Ma, Xuefan Jiang, Hui Pei, Yu Cao, and Hao Li. "Interaction between A β and Tau in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease." *International Journal of Biological Sciences* 17, no. 9 (May 27, 2021): 2181–92. <https://doi.org/10.7150/ijbs.57078>.
90. Zhang, Yun-wu, Robert Thompson, Han Zhang, and Huaxi Xu. "APP Processing in Alzheimer's Disease." *Molecular Brain* 4, no. 1 (January 7, 2011): 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>.
91. Zhao, Guojun, Jianxin Tan, Guozhang Mao, Mei-Zhen Cui, and Xuemin Xu. "The Same Gamma-Secretase Accounts for the Multiple Intramembrane Cleavages of APP." *Journal of Neurochemistry* 100, no. 5 (March 2007): 1234–46. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04302.x>.
92. Zheng, Hui, and Edward H. Koo. "The Amyloid Precursor Protein: Beyond Amyloid." *Molecular Neurodegeneration* 1, no. 1 (July 3, 2006): 5. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-5>.
93. Žvirblis, Mantas, Andrius Sakalauskas, Saeid Hadi Ali Janvand, Virginija Dudutienė, Mantas Žiaunys, Rūta Sniečkutė, Daniel E. Otzen, Vytautas Smirnovas, and Daumantas Matulis. "Structure-Activity Relationship of Fluorinated Benzenesulfonamides as Inhibitors of Amyloid- β Aggregation." *Chemistry – A European Journal* 30, no. 58 (October 17, 2024): e202402330. <https://doi.org/10.1002/chem.202402330>.