



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

Arūnė Jocytė

Farmacinės chemijos studijų programos
Magistro baigiamasis darbas

**TRANSTIRETINO PATOGENINIŲ VARIANTŲ V30M IR A97S
AGREGACIJOS TYRIMAS**

Darbo vadovas
dr. Andrius Sakalauskas

Konsultantė
Rūta Sniečkutė

Vilnius 2026



**VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY**

Arūnė Jocyte
Pharmaceutical Chemistry
Master thesis

**AGGREGATION STUDY OF TRANSTHYRETIN V30M AND
A97S PATHOGENIC VARIANTS**

Scientific adviser
dr. Andrius Sakalauskas

Consultant
Rūta Sniečkutė

Vilnius 2026

TURINYS

TURINYS	3
SANTRUMPOS	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Transtiretinai	8
1.1.1. Funkcijos	8
1.1.2. Struktūra	9
1.2. Transtiretino amiloidozė	9
1.3. Patogeniniai variantai/Transtiretino mutacijos	11
1.4. TTR agregacija	12
1.5. Gydomo būdai	14
1.6. Baltymų terminio stabilumo poslinkio analizė	16
1.7. Atominės jėgos mikroskopija	17
2. MEDŽIAGOS IR ĮRANGA	19
2.1. Reagentai	19
2.2. Konstruktai	19
2.3. Kompetentinės ląstelės	19
2.4. Tirpalai	20
2.5. Mitybinės terpės	21
2.6. Sorbentai	21
2.7. Rinkiniai	21
2.8. Laboratorinė įranga.....	21
3. METODAI.....	22
3.1. GB1 geno sekos pašalinimas (<i>angl. deletion</i>)	22
3.1.1. Plazmidinės DNR dauginimas ir išskyrimas	22
3.1.2. PGR mutagenezė	23
3.1.3. Matricinės DNR karpymas	23
3.1.4. DNR elektroforezė.....	24
3.1.5. Kolonijų PGR ir teigiamų kolonijų atranka.....	24
3.2. Baltymų raiška ir gryninimas	25
3.2.1. Kompetentinių ląstelių transformacija, naktinės bakterijų kultūros paruošimas ir auginimas.....	25
3.2.2. Biomasės auginimas, tikslinio baltymo sintezė ir biomasės ardymas	25

3.2.3. Imobilizuoto metalo jono afininė chromatografija (IMAC).....	25
3.2.4. His-TTR žymės kirpimas naudojant His-TEV protezę bei IMAC	25
3.2.5. Gelfiltracijos chromatografija.....	26
3.2.6. Baltymų elektroforezė	26
3.3. Transtiretino išsivyniojimo temperatūros nustatymas	27
3.3.1. Nano-diferencinio skenavimo fluorimetrija (nano-DSF)	27
3.3.2. Diferencinio skenavimo fluorimetrija (DSF)	27
3.4. Transtiretino agregacijos tyrimas.....	28
3.4.1. Agregacijos sąlygų optimizavimas	28
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	30
4.1. TTR mutagenezė.....	30
4.2. Baltymų raiška ir gryninimas	31
4.2.1. His-TEV proteazės gryninimas.....	31
4.2.2. His-TTR A97S ir His-TTR V30M gryninimas.....	31
4.3. TTR lydymosi temperatūros nustatymas	33
4.3.1. TTR lydymosi temperatūros nustatymas nano-DSF metodu.....	33
4.3.2. TTR lydymosi temperatūros nustatymas DSF metodu.....	35
4.3.3. nano-DSF su sandarintais kapiliaro galais.....	36
4.4. TTR agregacijos tyrimas.....	37
4.4.1. TTR agregacijos sąlygų optimizavimas.....	37
4.4.2. TTR amiloidinių fibrilių vaizdai.....	40
IŠVADOS	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS	44
SANTRAUKA.....	49
SUMMARY	50
PRIEDAI	51

SANTRUMPOS

AJM – atominės jėgos mikroskopas;
Aps./min. – apsisukimai per minutę;
ASOS – priešprasminiai oligonukleotidai (*angl. antisense oligonucleotides*);
Aβ – amiloidas beta;
ATTRv-CM – paveldima TTR amiloidozė su kardiomiopatija (*angl. variant transthyretin amyloidosis with cardiomyopathy*);
ATTRv-LM – paveldima leptomeningealinė TTR amiloidozė (*angl. hereditary leptomeningeal TTR amyloidosis*);
ATTRv-OC – paveldima akių TTR amiloidozė (*angl. hereditary ocular TTR amyloidosis*);
ATTRv-PN – paveldima TTR amiloidozė su polineuropatija (*angl. variant transthyretin amyloidosis with polyneuropathy*);
DSF – diferencinė skenuojamoji fluorimetrija;
dSS – dirbtinis smegenų skystis;
LB – mitybinė terpė (*angl. Luria-Broth*);
nano-DSF – nano diferencinė skenuojamoji fluorimetrija;
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas (*angl. phosphate-buffered saline*);
PGR – polimerazės grandininė reakcija;
pTTRA – paveldima transtiretino amiloidozė;
RSB – retinolį surišantis baltymas;
S.O.C – optimali mitybinė terpė (*angl. super optimal broth with catabolite repression*);
siRNR – maža interferuojanti RNR (*angl. small interfering RNA*);
SS – smegenų skystis;
T4 – tiroksinas;
Tm – lydymosi temperatūra;
TSA – terminio stabilumo poslinkio analizė (*angl. thermal shift assays*);
TTRA – transtiretino amiloidozė;
TTR – transtiretinas;
wtTTRA – laukinio tipo transtiretino amiloidozė.

IVADAS

Amiloidozė – tai patologinių baltymų ligų grupė, kuriai būdingas netaisyklingai susilanksčiusių baltymų kaupimasis amiloidinių fibrilių pavidalu. Žmonėse identifikuojami 42 skirtingi baltymai, kurie yra klasifikuojami kaip amiloidiniai. Šių baltymų sukeltos ligos dažniausiai yra sisteminės ir pažeidžia kelis gyvybiškai svarbius organus bei audinius, tokius kaip inkstai, periferiniai nervai, širdis, virškinimo traktas, akys, oda ar kepenys (Leung & Nasr, 2024; Poli et al., 2023).

Transtiretino amiloidozė (TTRA) yra susijusi su transtiretino (TTR) baltymo struktūriniais pokyčiais. TTR yra tetramerinis transportinis baltymas, aptinkamas kraujo plazmoje ir smegenų skystyje. Fiziologinė jo funkcija – pernešti skydliaukės hormoną tiroksiną (T4) bei retinolį (vitaminą A), susijungusį su retinolį surišančiu baltymu (Liz et al., 2020; J. Magalhães et al., 2021). Patologijos atveju, TTR amiloidinės fibrilės kaupiasi įvairiuose organuose, sukeldamos tokias ligas kaip amiloidinę polineuropatiją ir kardiomiopatiją, kurios gali būti mirtinos. Transtiretino amiloidozė skirstoma į dvi pagrindines formas: paveldimą transtiretino amiloidozę (pTTRA) ir laukinio tipo transtiretino amiloidozę (wtTTRA). Paveldimą formą lemia TTR geno mutacijos, o laukinio tipo forma yra susijusi su senėjimu ir išsivysto dėl laukinio tipo TTR kaupimosi (Hammarström, 2024; J. Magalhães et al., 2021; Ueda, 2022). pTTRA pasižymi didele genetinė ir klinicine įvairove. Jos paplitimas įvairiose pasaulio vietose skiriasi. Dėl destabilizuojančių TTR geno mutacijų vystosi skirtingi ligos variantai. Tarp dažniausiai tiriamų variantų yra V30M, aptinkamas visame pasaulyje, ir A97S, dažniau nustatomas Azijos regionuose (Hsueh et al., 2022). Patogeninių variantų tyrimai padeda geriau suprasti TTR destabilizacijos mechanizmus ir amiloidinių agregatų susidarymą. Agregacijos sąlygų tyrimai ir lydymosi temperatūros (T_m) analizė leidžia įvertinti mutantinių TTR formų stabilumą bei palyginti jų savybes su laukinio tipo TTR. Tokie tyrimai gali padėti identifikuoti junginius, galinčius stabilizuoti TTR tetramerą ir slopinti patologinių fibrilių susidarymą.

Nors TTRA šiuo metu nėra išgydoma, o esami gydymo būdai tik sulėtina ligos progresavimą, svarbu ieškoti naujų junginių, galinčių pagerinti gydymo veiksmingumą. Viena iš perspektyvių junginių grupių yra sulfonamidai. Sulfonamidai – cheminių junginių klasė, turinti $-SO_2N$ grupę savo struktūroje, ir yra plačiai naudojami kaip antimikrobiniai vaistai. Taip pat tiriamas jų potencialas gydant ir kitas ligas, įskaitant diabetą, psichozę, centrinės nervų sistemos sutrikimus bei navikus (Ovung & Bhattacharyya, 2021).

Darbo tikslas:

- Įvertinti transtiretino patogeninių variantų V30M ir A97S išsivyniojimo temperatūrą ir ištirti jų agregacijos sąlygas.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti transtiretino variantų V30M ir A97S bei His-TEV proteazės sintezę *E. coli* ląstelėse ir juos išgryninti.

2. Nustatyti transtiretino mutantų V30M ir A97S išsivyniojimo temperatūrą.
3. Įvertinti atrinktų sulfonamidinių junginių poveikį transtiretino patogeninių variantų V30M ir A97S išsivyniojimo temperatūrai.
4. Nustatyti transtiretino V30M ir A97S formų agregacijos sąlygas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Transtiretinai

Žmogaus transtiretinai (TTR) yra homotetrameriniai baltymai, sudaryti iš keturių identiškų monomerų, kurių kiekvieno molekulinė masė yra apie 14 kDa, o jo tetramero masė yra 55 kDa (Wieczorek & Ożyhar, 2021). TTR daugiausia gaminamas kepenyse, taip pat choroidiniame mezenchiminiame ir tinklainės pigmentiniame epitelio ląstelėse, iš kur išsiskiriamas į kraują, smegenų skystį (SS) bei akies audinius (Liz et al., 2020). Be to, TTR raiška nustatyta Langerhanso salelėse, endotelio ląstelėse, akies ciliarinio pigmento epitelio ląstelėse, žarnyne, embriono trynio maiše ir gana nedideliais kiekiais skrandyje, širdyje, skeleto raumenyse bei blužnyje. Taip pat yra žinoma apie TTR raišką smegenų dangaluose, žmogaus placentoje, Švano ląstelėse, oligodendrocituose bei įvairių tipų neuronuose (J. Magalhães et al., 2021).

1.1.1. Funkcijos

Transtiretinai anksčiau buvo žinomi kaip prealbuminai, nes baltymų elektroforezėje juda greičiau už serumo albuminą. Nustačius, kad jis gali pernešti tiroksiną (T₄), pavadinimas buvo pakeistas į „su tiroksinu besijungiantis prealbuminas“. Vėliau, paaiškėjus, kad šis baltymas taip pat perneša retinolį (vitaminą A) susijungęs su retinoliu surišančiu baltymu (RSB), pavadinimas buvo pakeistas į transtiretiną (Gertz et al., 2025; Sanguinetti et al., 2022).

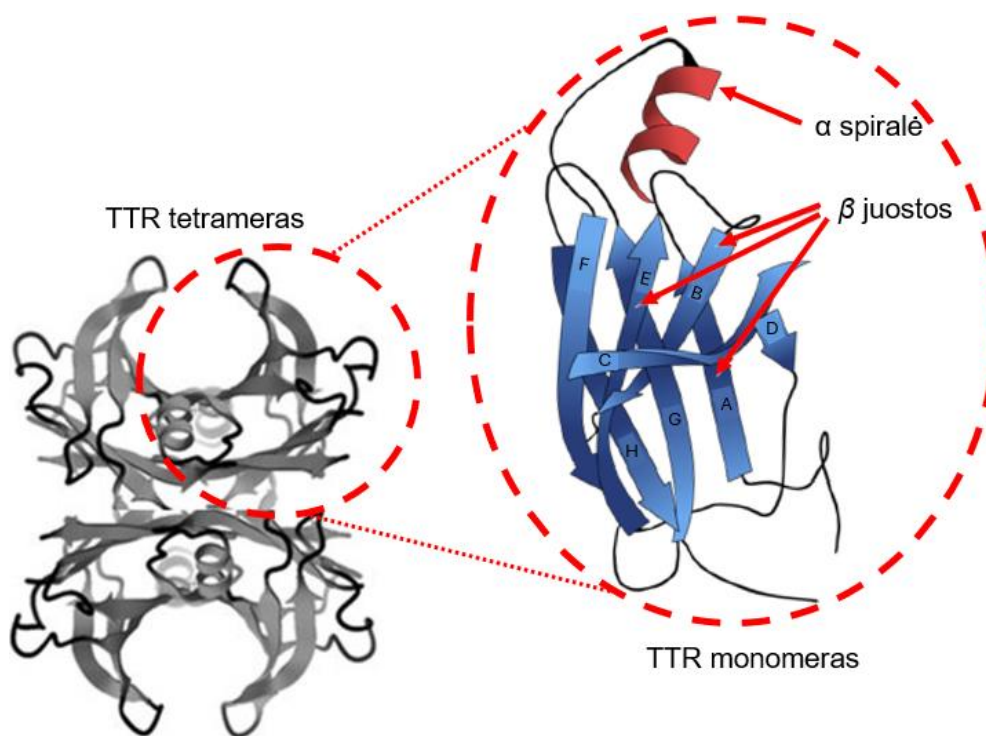
Plazmoje TTR perneša apie 15 % T₄, tuo tarpu SS – apie 80 % šio hormono. Skydliaukės hormonai yra būtini žinduolių augimui, ląstelių diferenciacijai ir medžiagų apykaitos pusiausvyrai palaikyti. Nors T₄ patekimo į audinių ląsteles mechanizmas nėra iki galo aiškus, įrodyta, kad TTR yra ypač svarbus T₄ pernašai per placentą ir jo perdavimui embrionui (Attiah, 2025; Bezerra et al., 2020).

Retinolis plazmoje randamas susijungęs su RSB, kuris didžiąja dalimi (apie 95 %) sudaro kompleksą su TTR. Retinolis ir jo dariniai gaunami su maistu ir organizme oksiduojami iki retinoinės rūgšties, kuri yra būtina vystymuisi, miego ir regos reguliacijai, sinapsių plastiškumui, neuronų augimui ir jų išlikimui (Attiah, 2025; Sanguinetti et al., 2022). TTR netiesiogiai dalyvauja imuninės sistemos reguliavime, nes retinoinė rūgštis skatina mieloidinių ląstelių diferenciaciją kaulų čiulpuose mieloidiniame kompartmente ir taip reguliuoja granulocitų, makrofagų, dendritinių bei putliųjų ląstelių atsaką. Taip pat tiriama ir TTR tiesioginis dalyvavimas imuninės sistemos reguliacijoje, veikiant citokinams panašiu būdu (Attiah, 2025; Gertz et al., 2025).

Be pernašos funkcijos, TTR taip pat dalyvauja nervų sistemos apsauginėse bei reguliacinėse funkcijose. Sąveikaudamas su amiloidu beta (Aβ), TTR slopina jo agregaciją ir skatina tiek tirpių, tiek agreguotų Aβ formų skaidymą. Dėl to prisideda prie apsauginio poveikio nuo neurodegeneracinių procesų Alzheimerio ligos metu (Gertz et al., 2025; Liz et al., 2020). Mažesnė TTR koncentracija nei įprastai, siejama su didesniu mirtingumu vyresnio amžiaus žmonių grupėje, taip pat su įvairiomis onkologinėmis, kvėpavimo, širdies bei kraujagyslių ligomis (Wieczorek & Ożyhar, 2021).

1.1.2. Struktūra

TTR genas koduoja 147 aminorūgščių ilgio polipeptidą, kurio N-galinėje dalyje esančios pirmosios 20 aminorūgščių sudaro signalinį peptidą. Šis peptidas pašalinamas prieš baltymo išskyrimą į ekstraląstelinę erdvę. Subrendęs TTR baltymas susideda iš 127 aminorūgščių ir formuoja homotetramerą (Ueda, 2022). TTR monomeras sudarytas iš aštuonių antiparalelių β juostų (*angl. β strands*) (nuo A iki H išskyrus tarp A ir G). Šios formuoja dvi grupes β klosčių (*angl. β sheets*) (DAGH ir CBEF). Baltymo monomeras turi vieną trumpą α spiralę (*angl. α helix*) sudarytą iš devynių aminorūgščių liekanų jungiančių E ir F grandines (Sanguinetti et al., 2022). TTR dimeras susidaro dėl monomero-monomero vandenilinių ryšių sąveikos tarp F-F' ir H-H' β juostų. Tetrameras susidaro dėl hidrofobinių dimero-dimero sąveikų tarp A-B ir G-H kilpų, leidžiančių formuoti stabilią struktūrą (Gonzalez-Duarte & Ulloa-Aguirre, 2021) (1.1 pav.). TTR tetrameras turi dvi T4 jungimosi vietas ir keturias retinolį surišančio baltymo (RSB) jungimosi vietas (po vieną kiekviename monomere). Dažniausiai, fiziologinėmis sąlygomis prie vieno tetramero prisijungia tik viena T4 molekulė ir dvi RSB molekulės. Manoma, kad taip yra dėl neigiamo kooperatyvumo tarp jungimosi vietų. Be to, RSB jungiasi tik tada, kai TTR jau yra surišęs retinolį (Bezerra et al., 2020).



1.1 pav. TTR struktūra (Gonzalez-Duarte & Ulloa-Aguirre, 2021; Hammarström, 2024).

1.2. Transtiretino amiloidozė

Amiloidozė – tai ligų grupė, kuriai būdingi fibriliniai baltymų agregatai – amiloidai. Jie kaupiasi audiniuose, pažeisdami jų struktūrą ir funkcijas. Iki šiol yra žinoma daugiau nei 42 skirtingi amiloidinius darinius formuojantys baltymai (Leung & Nasr, 2024). Amiloidų kaupimąsi gali lemti

senėjimas, genetiniai pakitimai, uždegimai ar vėžiniai procesai, dėl kurių baltymai yra netinkamai sulankstomi ir/ar sutrinka jų pašalinimas (Ueda, 2022).

Transtiretinas, vienas iš pagrindinių sisteminės amiloidozės baltymų. Nors TTR yra stabilus homotetrameras, jis gali skilti į monomeras, kurie netinkamai susilanksto ir formuoja amiloidines fibriles (Delgado et al., 2025; Liz et al., 2020). Susidarę tarpląsteliniai amiloidiniai dariniai kaupiasi įvairiuose audiniuose ir organuose, tokiuose kaip nervai, širdis, arteriolės, inkstai ir akys (Koiike et al., 2021).

Transtiretino amiloidozė (TTRA) skirstoma į dvi pagrindines formas: paveldimą transtiretino amiloidozę (pTTRA) ir laukinio tipo transtiretino amiloidozę (wtTTRA). Paveldima TTRA, anksčiau vadinta šeimine amiloidine polineuropatija, išsivysto dėl TTR geno mutacijų. Tuo tarpu laukinio tipo TTRA, anksčiau vadinta senatvine sisteminė amiloidoze, yra susijusi su senėjimu ir atsiranda dėl laukinio tipo TTR kaupimosi (P. Magalhães & Lashuel, 2022; Ueda, 2022).

Paveldima TTR amiloidozė atsiranda dėl destabilizuojančių TTR geno mutacijų (Hsueh et al., 2022). Liga pasižymi plačiu klinikinių simptomų spektru, kurie priklauso nuo konkrečios mutacijos. Paveldimos transtiretino amiloidozės atveju dažniausiai pasitaikančios klinikinės formos yra polineuropatija (ATTRv-PN, *angl. variant transthyretin amyloidosis with polyneuropathy*) ir kardiomiopatija (ATTRv-CM, *angl. variant transthyretin amyloidosis with cardiomyopathy*). Be šių pagrindinių formų, išskiriamos ir retesnės, tokios kaip leptomeningealinė amiloidozė (ATTRv-LM, *angl. hereditary leptomeningeal TTR amyloidosis*), akių amiloidozė (ATTRv-OC, *angl. hereditary ocular TTR amyloidosis*), plačiau aprašomos 1.1 lentelėje (Almeida et al., 2024; Hammarström, 2024; Ruberg & Maurer, 2024).

Laukinio tipo transtiretino amiloidozė yra su amžiumi susijusi nepaveldima sisteminės amiloidozės forma, kurios metu laukinio tipo TTR formuoja amiloidines sankaupas įvairiuose audiniuose (Liz et al., 2020). Nors wtTTRA laikoma dažniausiu ligos tipu ir būdinga vyresnio amžiaus žmonėms, šio baltymo disociacijos ir amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmai nėra iki galo išaiškinti (Ruberg & Maurer, 2024). wtTTRA pasireiškia širdies pažeidimais, tačiau taip pat yra glaudžiai susijusi su riešo kanalo sindromu, stuburo kanalo stenoze ir neuropatija pagyvenusiems žmonėms (Delgado et al., 2025; Ueda, 2022). Plati transtiretino amiloidozių fenotipinė įvairovė apsunkina ankstyvą ligos diagnozavimą (Poli et al., 2023).

1.1 Lentelė. Transtiretino amiloidozė apibendrinimas (Almeida et al., 2024; Hammarström, 2024; Ruberg & Maurer, 2024).

Transtiretino amiloidozė	Pagrindiniai paveikti organai ir sistemos	Pagrindiniai simptomai
Laukinio tipo transtiretino amiloidozė (wtTTRA)	Širdis	Širdies pažeidimas dažniausiai pasireiškia dusuliu, kojų tinimu, širdies nepakankamumo požymiais, krūtinės skausmu ir širdies ritmo sutrikimais. Galimi alpimai, galvos svaigimas. Be to, dėl minkštųjų audinių pažeidimo dažniau pasitaiko riešo kanalo sindromas, stuburo kanalo stenozė ar spontaniniai sausgyslių plyšimai.
Paveldima TTR amiloidozė su polineuropatija (ATTRv-PN)	Periferinė nervų sistema	Jutimo ir judėjimo sutrikimai, simetriškai progresuojantys nuo galūnių galų į viršų.
	Autonominė nervų sistema	Ortostatinė hipotenzija, šlapinimosi sutrikimai, lytinių funkcijų sutrikimai.
	Inkstai	Inkstų pažeidimai.
	Virškinimo sistema	Pykinimas, viduriavimas ar vidurių užkietėjimas, svorio pokyčiai.
	Riešai	Riešo kanalo sindromas.
	Skydliaukė	Hipotirozė.
	Širdis, centrinė nervų sistema ir akys	Progresuojanti kardiomiopatija, autonominės nervų sistemos disfunkcija, glaukoma, sausų akių sindromas.
Paveldima TTR amiloidozė su kardiomiopatija (ATTRv-CM)	Širdis	Taip pat kaip wtTTRA atveju.
Paveldima leptomeningealinė TTR amiloidozė (ATTRv-LM)	Centrinė nervų sistema	Demencija, galvos skausmai, svaigimas, vėmimas, koordinacijos sutrikimai, epilepsija, insulto požymiai, paralyžius.
Paveldima akių TTR amiloidozė (ATTRv-OC)	Akys	Glaukoma, akių sausumas, ragenos pažeidimai, lęšiuko ir tinklainės pakitimai, vyzdžio reakcijos sutrikimai ir regos nervo pažeidimas.

1.3. Patogeniniai variantai/Transtiretino mutacijos

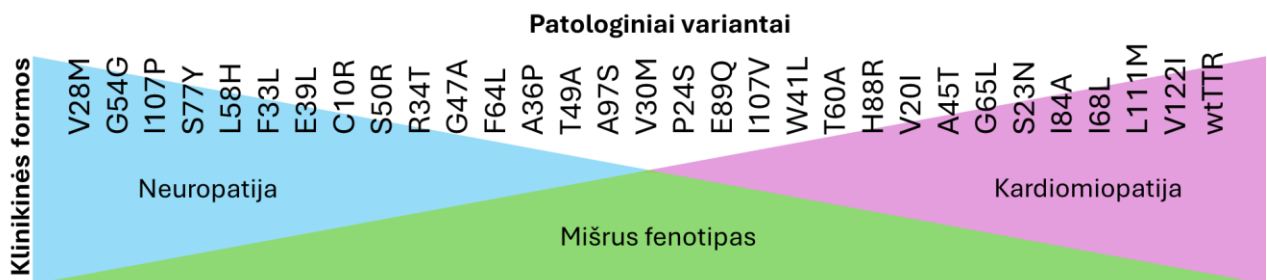
TTR genas yra randamas 18-oje chromosomoje (18q11.2–q12.1) ir jo DNR sekos ilgis yra 7 kilobazių porų. Šią seką sudaro keturios baltymą koduojančios sritys (egzonai) ir trys baltymo nekoduojantys intarpai (intronai) (Almeida et al., 2024; Poli et al., 2023).

TTR mutacijų duomenų bazėje (amyloidosismutations.com), aprašyta daugiau nei 150 TTR geno mutacijų. Dauguma jų yra taškinės ir paveldimos autosominiu dominantiniu būdu (Almeida et al., 2024; Triposkiadis et al., 2025). Vis dėlto nedidelė mutacijų dalis nesukelia amiloidogeninio proceso, o itin reti variantai, tokie kaip T119M atveju, pasižymi apsauginiu poveikiu ir stabilizuoja

TTR baltymo struktūrą taip mažindamos širdies bei kraujagyslių sistemos pažeidimų riziką (Gião et al., 2020; Poli et al., 2023).

Skirtinga TTR geno mutacija gali lemti skirtingą klinikinį fenotipą, kuris pasireiškia įvairaus laipsnio širdies ir nervų sistemos pažeidimais, skirtingu ligos pradžios amžiumi bei progresavimo greičiu (Ueda, 2022). Kai kurios patogeninės mutacijos dažniau siejamos su ATTRv-PN, pavyzdžiui, V28M, C10R ir S50A. Tuo tarpu kitos mutacijos I68L, V122I, T60A ir L111M daugiausia susijusios su ATTRv-CM (Almeida et al., 2024; Carroll et al., 2022). Nepaisant to, dauguma žinomų mutacijų pasireiškia mišriu fenotipu, apimančiu tiek neurologinius, tiek kardiologinius simptomus. Be to, net ir asmenys, turintys tą pačią mutaciją, gali skirtis pagal ligos pradžios amžių, simptomų sunkumą ar net visiškai neturėti klinikinių požymių (Hammarström, 2024; Poli et al., 2023)(1.2 pav.).

V30M variantas buvo vienas iš pirmųjų identifikuotų TTR geno mutacijų (Leung & Nasr, 2024). Pastebėta, kad yra dažniau paveldimas iš motinos ir pasižymi ankstesne ligos pradžia. Kitas dažnas patogeninis pokytis V122I, ypač paplitęs tarp afroamerikiečių (apie 3-4 %) ir Vakarų Afrikos populiacijose, daugiausia lemia širdies pažeidimus su lengvais neurologiniais simptomais (Triposkiadis et al., 2025; Ueda, 2022). Be to, kai kurios TTR geno mutacijos būdingos specifinėms populiacijoms, pavyzdžiui, T60A Šiaurės Airijoje, P64L Sicilijoje, S50A Meksikoje, S77T ir S77P Prancūzijoje bei A97S Taivane (Almeida et al., 2024; Poli et al., 2023).



1.2 pav. Klinikinės formos ir patogeninių variantų koreliacija (Carroll et al., 2022; Poli et al., 2023).

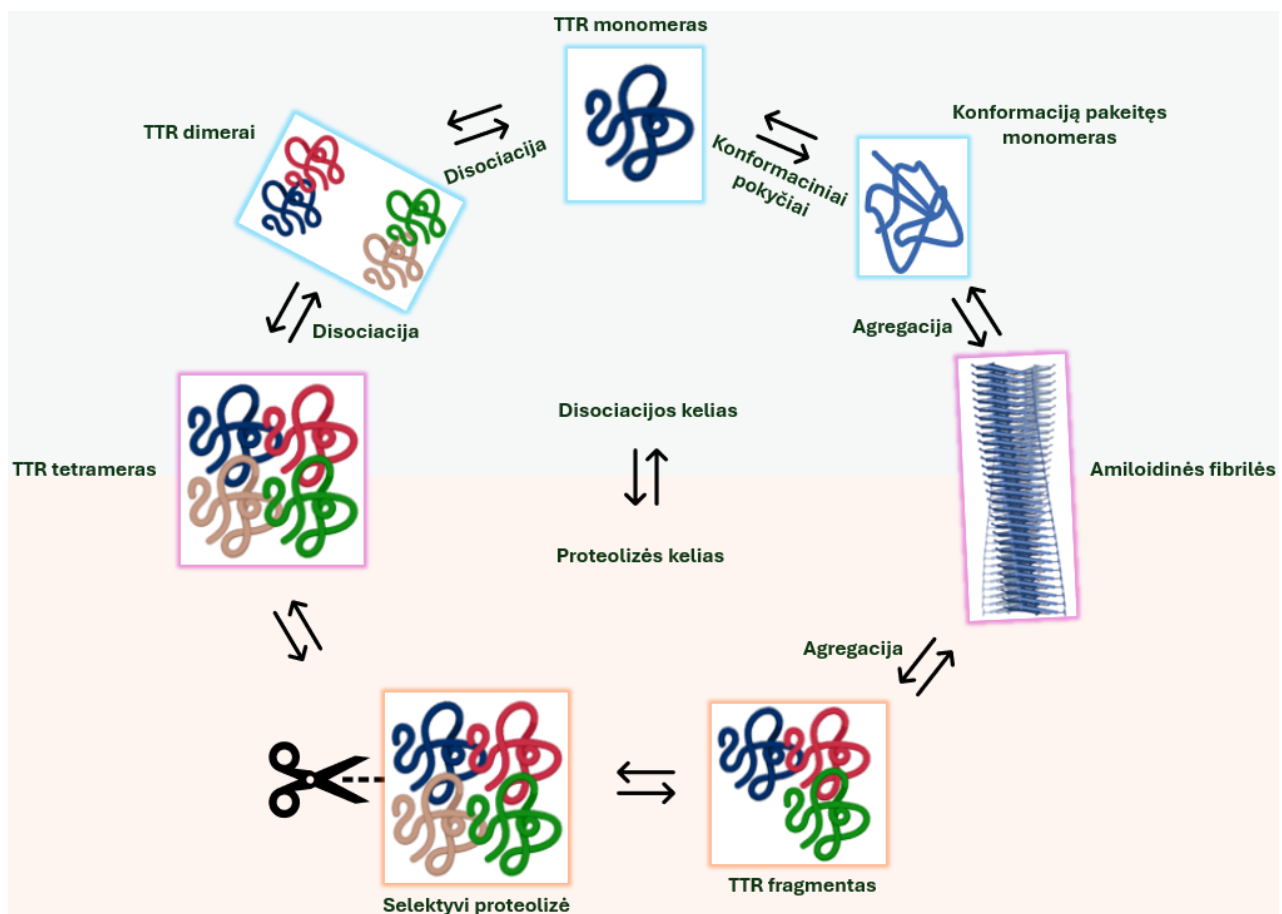
1.4. TTR agregacija

TTR agregacijos mechanizmo supratimas yra itin svarbus kuriant terapines strategijas, skirtas transtiretino amiloidozės gydymui. Per pastaruosius du dešimtmečius susiformavo bendras sutarimas, kad pirmasis TTR agregatų susidarymo etapas yra baltymo tetramero disociacija į monomerus. Natyvus TTR monomeras iš prigimties nėra amiloidogeninis (linkęs agreguoti), todėl, kad galėtų dalyvauti agregacijos procese, jis turi iš dalies išsivynioti (Almeida et al., 2024; Ritsch et al., 2024). Šie konformaciją pakeitę monomerai gali jungtis į tirpius oligomeras, kurie jungiasi tarpusavyje, toliau agreguoja ir galiausiai sudaro amiloidines fibriles (1.3 pav.). TTR amiloidinės fibrilės yra dviejų pagrindinių tipų. A tipo TTRA amiloidinės fibrilės yra trumpos, standžios, netvarkingos struktūros ir dažniausiai randamos pTTRA bei vėlai pasireiškiančios V30M pTTRA atvejais. Tuo tarpu, B tipo amiloidinės fibrilės yra ilgos, tiesios ir lygiagrečios, sudarytos tik iš pilno

ilgio TTR (be TTR fragmentų), aptinkamos wtTTRA bei ankstyvojo tipo V30M pTTRA (Steinebrei et al., 2022; Triposkiadis et al., 2025; Ueda, 2022).

In vitro oligomerizacija vyksta tiek pTTRA, tiek wtTTRA atvejais, tačiau šis procesas yra spartesnis pTTRA atveju, kai TTR tetramero stabilumas yra sumažėjęs dėl genetinių mutacijų. Priežastys, dėl kurių wtTTR, net ir be destabilizuojančių mutacijų, linkęs formuoti amiloidines fibriles, nėra iki galo aiškios (Magalhães et al., 2021; Sanguinetti et al., 2022). Manoma, kad laukinio tipo TTR agregacija *in vivo* gali būti susijusi su vėlyvųjų endosomų ir lizosomų rūgštine aplinka, su amžiumi susijusiais homeostazės sutrikimais, oksidacine žala ar proteolitinio skaidymo (Hammarström, 2024; Ritsch et al., 2024).

Transtiretino tetrameras pasižymi dideliu kinetiniu stabilumu. Jo lydymosi temperatūra (T_m) yra apie 100 °C pH 7,5 (Ritsch et al., 2024). Nors tetrameras yra stabilus neutraliame pH, agregacijos tyrimuose *in vitro* dažniausiai naudojamos rūgštinės sąlygos (pH 4,4), aukšta temperatūra, denatūruojantys reagentai, kurie greitina tiek tetramero disociaciją, tiek monomero konformacinius pokyčius (Ferreira et al., 2021; Hammarström, 2024; Ritsch et al., 2024). *In vitro* sąlygomis agregacija yra energetiškai palanki ir vyksta greitai, palyginti su pradiniu tetramero disociacijos etapu. Todėl manoma, kad TTR tetramero disociacija laboratorinėmis sąlygomis yra esminis greitį ribojantis agregacijos etapas (Coelho et al., 2016; Porcari, 2022). Dėl šios priežasties TTR tetramero stabilumo palaikymas arba jo disociacijos slopinimas laikomas pagrindiniu terapiniu taikiniu, siekiant užkirsti kelią patogeninei TTR agregacijai ir amiloidinių fibrilių formavimuisi (Almeida et al., 2024; Ritsch et al., 2024). Vis dėlto, *in vitro* suformuoti TTR agregatai ne visuomet tiksliai atspindi žmogaus organizme susidarančias amiloidines struktūras. *Ex vivo* tyrimuose nustatytos A tipo ir B tipo amiloidinės fibrilės skiriasi nuo daugelyje *in vitro* modelių gaunamų agregatų, kuriems dažniau būdinga taip vadinamos kirmino formos (*angl. worm-like*) fibrilės pasižymintys lanksčia, netolygia, susiraizgiusia struktūra (Schmidt et al., 2019; Steinebrei et al., 2022). Šie morfologiniai skirtumai gali būti susiję su nevienodu β -klosčių organizacijos laipsniu. Manoma, kad išlinkusiose TTR protofibrilėse β -klostės struktūros formuojasi tik dalinai ir dalis agregato išlieka netvarkingos konformacijos, kas gali lemti lankstesnę ir labiau susiraizgiusią protofibrilių morfologiją. Tuo tarpu brandžioje amiloidinėse fibrilėse β -klostės struktūra tęsiasi per visą fibrilės ilgį ir suteikia jai tiesią bei standžią struktūrą. Šie skirtumai rodo, kad fiziologinėje aplinkoje TTR agregaciją galimai veikia papildomi veiksniai, kurių standartiniuose *in vitro* modeliuose trūksta (Yamamoto et al., 2026).



1.3 pav. TTR amiloidinių fibrilių susidarymo schema (Coelho et al., 2016; Porcari, 2022).

1.5. Gydomo būdai

TTRA gydymas yra nukreiptas į pagrindinius TTR kaupimosi bei amiloidinių sankeupų formavimosi mechanizmus. Išskiriami trys pagrindiniai TTRA gydymo būdai, grindžiami ligos patofiziologija. Pirmasis apima TTR gamybos slopinimą kepenyse, antrasis TTR tetramerų stabilizavimą, o trečias amiloidinių baltymo fibrilių degradaciją (González-López et al., 2017; Grzybowski et al., 2023) (1.2 lentelė.).

1990 m. pirmą kartą buvo atliktas kepenų persodinimas, kuris dešimtmečius buvo vienintelis veiksmingas gydymo būdas, siekiant sumažinti mutavusio TTR susidarymą (Margolin et al., 2025; Poli et al., 2023). Po transplantacijos kepenyse pradedamas gaminti laukinio tipo TTR. Vis dėlto mutavęs TTR, kurį išskiria choroidinis rezginys ir tinklainė, toliau lemia amiloidinių sankeupų formavimąsi centrinėje nervų sistemoje bei akyse (Saelices et al., 2015; Ueda, 2022). Sukauptos klinikinės žinios parodė, kad TTR raiškos slopinimas kepenyse gali sulėtinti ligos progresavimą. Dėl to TTRA gydymui buvo sukurti TTR geno slopikliai, kurių tikslas – blokuoti iRNR sintezę ir taip sumažinti baltymo gamybą. Šios terapijos pagrįstos priešprasminių oligonukleotidų (ASOS, *angl.* antisense oligonucleotides) arba trumpųjų interferuojančių RNR (siRNR, *angl.* small interfering RNA) technologijomis (Kapoor et al., 2019; Margolin et al., 2025; Poli et al., 2023). Be to, šiuo metu

klinikiniuose tyrimuose tiriama TTR geno redagavimo terapiją, naudojant CRISPR-Cas9 sistemą (Ueda, 2022).

TTR tetramerų stabilizavimui tiriami mažos molekulės masės junginiai, kurie jungiasi prie TTR tetramerinės formos ir neleidžia tetramerui disocijuoti į patogeninius amiloidinių fibrilių pirmtakus (Gertz et al., 2025; Tschöpe & Elsanhoury, 2022). Europos Sąjungoje TTRA gydymui patvirtinti du TTR stabilizatoriai – Tafamidis ir Akoramidis. Tafamidis buvo patvirtintas anksčiau ir klinikiniuose tyrimuose parodė gebėjimą lėtinti ligos progresavimą ir yra leidžiamas naudoti tiek pTTRA, tiek wtTTRA gydymui. Tafamidis yra benzoksazolo darinys, kuris jungiasi prie tiroksino prisijungimo vietų TTR molekulėje, stabilizuoja tetramerą ir slopina jo disociaciją į monomerus (Coelho et al., 2016; Koike & Katsuno, 2020). Preparatas vartojamas 61 mg laisvosios rūgšties forma arba 80 mg Tafamidžio meglumino doze, per burną vieną kartą per parą. Tyrimai rodo, kad vaistas yra labai gerai toleruojamas pacientų, o nepageidaujamų reiškinių (urogenitalinių infekcijų, viduriavimo, epigastrinio skausmo) dažnis yra panašus į placebo grupės pacientų (Grzybowski et al., 2023; He et al., 2021).

2025 m. vasario mėnesį Europos Sąjungoje buvo patvirtintas naujesnis TTR stabilizatorius Akoramidis. Panašiai kaip Tafamidis, jis jungiasi prie tiroksino prisijungimo vietų, tačiau pasižymi stipresniu kinetiniu ir termodinaminiu stabilizuojančiu poveikiu (Gonzalez-Lopez et al., 2025; Wanniarachchige et al., 2025). Akoramidis buvo sukurtas naudojant TTR T119M varianto stabilizuojantį poveikį ir *in vitro* modeliuose parodė didesnę nei 90 % tiek laukinio tipo, tiek mutavusio TTR stabilizavimą (Poli et al., 2023; Triposkiadis et al., 2025). Klinikiniai tyrimai parodė, kad gydymas yra gerai toleruojamas ir reikšmingai sumažina mirtingumo bei hospitalizacijų riziką pacientams, sergantiems ATTRv-CM (Gonzalez-Duarte & Ulloa-Aguirre, 2021; Gonzalez-Lopez et al., 2025). Skirtingai nei Tafamidis, Akoramidis nepereina kraujo-smegenų barjero (Wanniarachchige et al., 2025).

Siekiant pašalinti jau susiformavusias amiloidinių fibrilių sankaupas, kuriama TTR amiloidui specifinių antikūnų terapija. Šie terapiniai antikūnai specifiskai prisijungia prie TTR amiloidinių sankaupų ir aktyvina imuninį atsaką (Gertz et al., 2025; Margolin et al., 2025). Taip pat tiriamos mažos molekulės, galinčios ardyti TTR agregatus, tačiau šiuo metu jos yra skirtingose klinikinių tyrimų stadijose (Ruberg et al., 2019; Ueda, 2022).

1.2 Lentelė. TTRA gydymo strategijos (González-López et al., 2017; Triposkiadis et al., 2025).

	Gydymo būdai		
	TTR sintezės slopinimas	TTR stabilizavimas	Amiloidinių sankaupų šalinimas
Veikimas	TTR gamybos mažinimas kepenyse.	Jungimasis prie TTR tetramero ir jo stabilizavimas.	Susiformavusių amiloidinių fibrilių pašalinimą iš audinių.
Privalumai	Reikšmingai sumažina tiek mutavusio, tiek laukinio tipo TTR koncentraciją kraujyje,	Lėtinama patologinė agregacija, patogus vartojimas, maža kaina.	Gali pagerinti organų funkciją pažengusiose ligos stadijose.

	Gydymo būdai		
	TTR sintezės slopinimas	TTR stabilizavimas	Amiloidinių sankaupų šalinimas
	gali sustabdyti arba reikšmingai sulėtinti ligos progresavimą.		
Trūkumai	Reikalingas ilgalaikis gydymas, nepaveikia TTR sintezės CNS ir akyse, didelė terapijos kaina.	Neveikia jau susiformavusių sankaupų, veiksmingumas gali būti ribotas vėlyvose stadijose.	Dauguma terapijų dar klinikinių tyrimų stadijoje, galimos imunologinės reakcijos.
Patvirtintos terapijos	Patisiran, Vutrisira (siRNR), Inotersen, Eplontersen (ASOS).	Tafamidis, Akoramidis.	Šiuo metu nėra.
Tiriamos terapijos	NTLA-2001 (CRISPR-Cas9).	Tolcapone, mds84.	EGCG (epigalokatechino galatas, žaliosios arbatos ekstraktas), PRX004, Coramitug, ALX2220 (monokloniniai antikūniai).

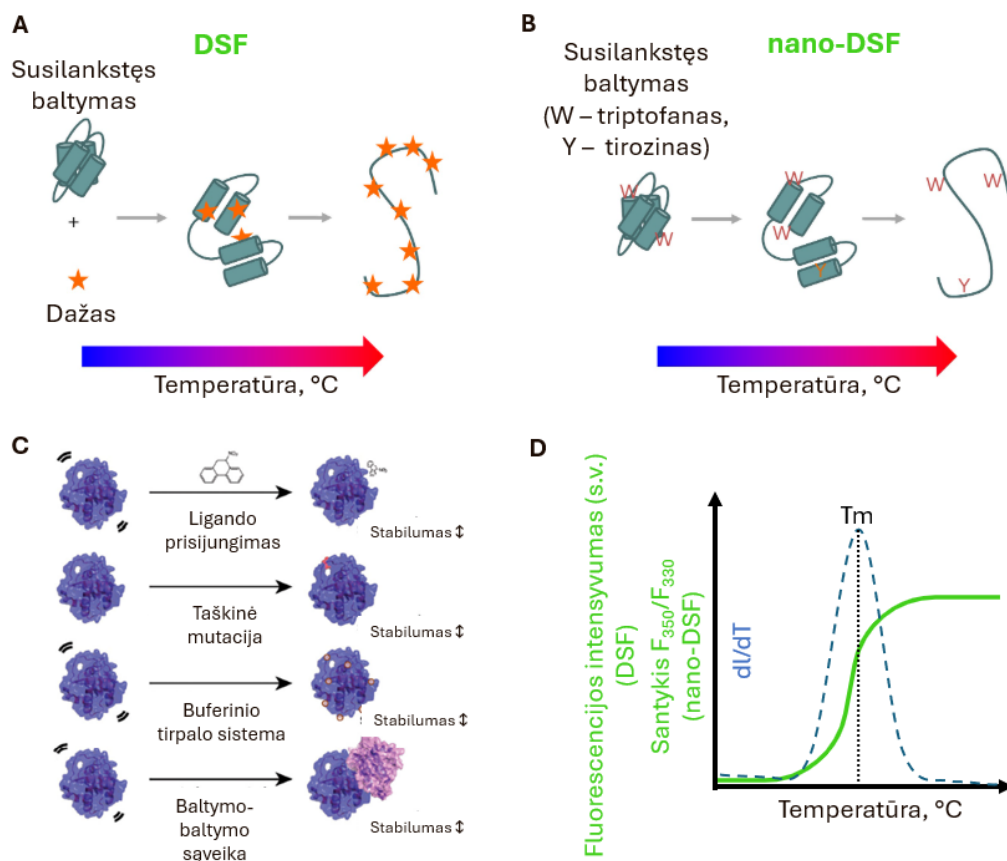
1.6. Baltymų terminio stabilumo poslinkio analizė

Terminio stabilumo poslinkio analizė (TSA, *angl. thermal shift assays*) yra plačiai taikomas biofizikinis metodas, skirtas baltymų stabilumui ir jų sąveikoms su ligandais tirti. Metodas pagrįstas baltymo lydymosi temperatūros (T_m) nustatymu ir jos pokyčio (ΔT_m) analize (Ahmad et al., 2021). TSA ypač svarbus ankstyvuosiuose vaistų kūrimo etapuose, kai siekiama greitai ištirti didelį kiekį potencialių junginių bei nustatyti jų gebėjimą prisijungti prie taikinio baltymo. Be junginių atrankos, šis metodas taip pat taikomas baltymų mutacijų poveikio vertinimui, buferinių tirpalų parinkimui bei pH įtakos tyrimams (Charvat et al., 2025; Kushwah et al., 2024).

Vienas dažniausiai taikomų TSA metodų yra diferencinė skenuojamoji fluorimetrija (DSF), dar vadinama fluorescencine terminio poslinkio analize. Šis metodas pagrįstas fluorescencinių dažų (anilino-naftaleno-8-sulfoninė rūgštis (ANS), SYPRO Orange ir kt.) savybėmis, kurie silpnai fluorescuoja hidrofilinėje aplinkoje, tačiau intensyviai hidrofobinėje aplinkoje (Charvat et al., 2025; Kim et al., 2021). Kaitinant baltymą, jis palaipsniui išsivynioja, o jo hidrofobinės aminorūgščių liekanos tampa prieinamos dažui, dėl to staigiai padidėja fluorescencijos signalas (Gooran & Kopra, 2024). Registruojant fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo temperatūros gaunama sigmoidinės formos kreivė, iš kurios apskaičiuojama T_m reikšmė (Charvat et al., 2025). Pagrindiniai DSF privalumai yra mažas mėginio tūris, didelis našumas ir greita analizė, tačiau dažai gali sąveikauti su buferinio tirpalo komponentais, sukeldami artefaktus (Khan et al., 2024).

Alternatyva klasikinei DSF yra nano diferencinė skenuojamoji fluorimetrija (nano-DSF), kurioje dažai ar žymenys nenaudojami. Metodas pagrįstas baltymo triptofano ir tirozino liekanų fluorescencijos pokyčiais. Didinant temperatūrą, matuojamas fluorescencijos intensyvumo santykis ties 330 ir 350 nm (F350/F330) bangos ilgiais (Kushwah et al., 2024). Šio santykio kitimas atspindi baltymo konformacinius pokyčius ir leidžia tiksliai nustatyti T_m (Kim et al., 2021) (1.4 pav.).

Lyginant su kitais baltymų stabilumo tyrimo metodais, tokiais kaip diferencine skenuojamąja kalorimetrija (DSC) ar izotermine titravimo kalorimetrija (ITC), TSA metodai yra greitesni, pigesni ir labiau pritaikyti didelio našumo analizei (Gooran & Kopra, 2024). Dėl šių savybių tai yra svarbus įrankis ankstyvuosiuose vaistų kūrimo etapuose, tiek optimizuojant baltymų laikymo, tiek buferinių tirpalų sąlygas (Khan et al., 2024; Kushwah et al., 2024).



1.4 pav. Baltymų terminio stabilumo poslinkio analizė; A – DSF metodas; B – nano-DSF metodas; C – TSA taikymas stabilumo nustatymui; D – teorinis TSA eksperimento grafikas (Charvat et al., 2025; Khan et al., 2024).

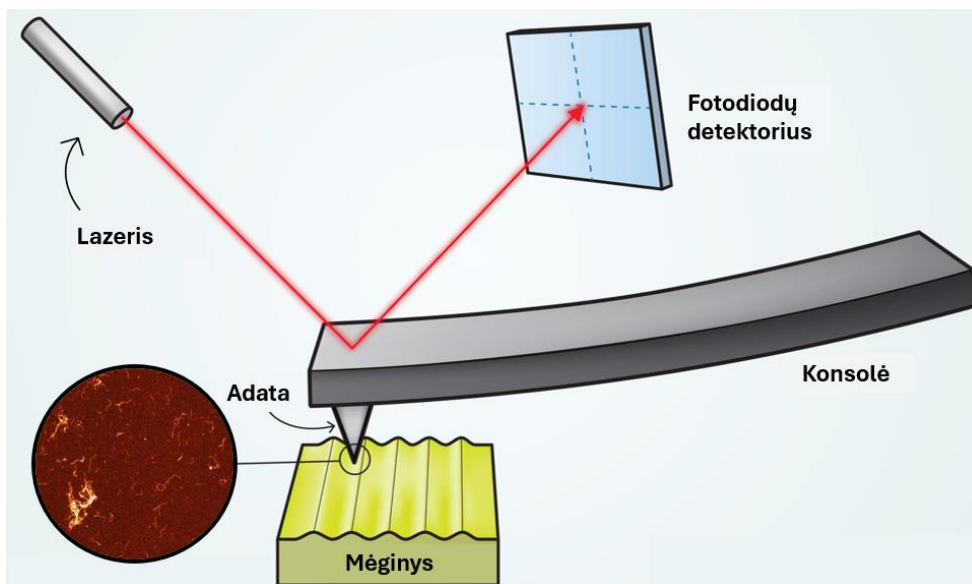
1.7. Atominės jėgos mikroskopija

Atominės jėgos mikroskopija (AJM) – tai didelės skiriamosios gebos skenuojantis zondinis mikroskopas, leidžiantis tirti paviršius nanoskalėje be papildomo dažymo ar žymėjimo (Main et al., 2021). Skirtingai nuo optinių ar elektroninių mikroskopų, AJM vaizdą formuoja ne šviesos ar elektronų pluoštas, bet itin aštrus zondas (adata), pritvirtintas prie elastingos konsolės, kuris mechanškai sąveikauja su tiriamo mėginio paviršiumi (Müller et al., 2021; Ruggeri, 2019) (1.5 pav.).

Reljefo vaizdas sudaromas adatai judant virš mėginio paviršiaus. Konsolės deformacijos registruojamos fokusuotu lazerio spinduliu, kuris atspindi nuo jos paviršiaus į fotodetektorių. Fotodetektorius sugeria šviesos energiją ir ją konvertuoja į elektros signalą. Šie signalai apdorojami ir paverčiami trimatės topografijos vaizdu (Gerdes et al., 2020; Hughes & Dougan, 2016; Main et

al., 2021). AJM gali veikti kontaktiniu, pusiau kontaktiniu arba nekontaktiniu režimu. Biologiniams mėginiais dažnai naudojamas švelnesnis pusiau kontaktinis režimas, siekiant sumažinti mėginio pažeidimus (Dufrêne et al., 2017).

Biologiniuose tyrimuose AJM naudojamas tiriant įvairius mėginius, įskaitant membranas, audinių, gyvų ląstelių, nukleorūgščių molekulių ar atskirų baltymų mėginius (Main et al., 2021). Šio metodo taikymas turi didelę reikšmę neteisingai susilanksčiusių baltymų tyrimuose. Analizuojant amiloidinių fibrilių vaizdus galima nustatyti jų ilgį, plotį, aukštį. Taip pat įvertinti fibrilių pasiskirstymą mėginyje bei identifikuoti skirtingus agregatų tipus (Adamcik & Mezzenga, 2012; Iadanza et al., 2018).



1.5 pav. AJM schema (Dufrêne et al., 2017).

2. MEDŽIAGOS IR ĮRANGA

2.1. Reagentai

Acros Organics: natrio hidroksidas (NaOH), kalio hidroksidas (KOH), vandenilio chloridas (HCl), anilino-naftaleno-8-sulfoninė rūgštis (ANS), karbamidas ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), dinatrio vandenilio fosfatas (Na_2HPO_4), acto rūgštis (CH_3COOH), natrio sulfato (Na_2SO_4), amonio chloridas (NH_4Cl).

Fisher Scientific: magnio chloridas (MgCl_2), natrio chloridas (NaCl), vitaminas C, 3-aminopropil(trietoksisilanas) (APTES), Tafamidis, Luria-Bertani (LB) terpė, agarozė dimetilsulfoksidas (DMSO), tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris), 1,4-ditiotreitolis (DTT), etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), imidazolas, baltymų molekulinės masės žymuo „PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder“, mielių ekstraktas, „SYBR™ Safe“ dažas, dikalio vandenilio fosfatas (K_2HPO_4), DNR molekulinis žymuo „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“, glicerolis, dažo buferinis tirpalas „Orange DNA Loading Dye“, dekstrozę, „GelCode™ Blue Stain Reagent“ dažas, laktozę, restrikcijos endonukleazė DpnI, kanamicino sulfatas, kalio chloridas (KCl), DNR polimerazės „Phusion“ ir „Taq“, N,N,N',N'-tetrametiletildiaminas (TEMED), natrio deodecilsulfatas (NDS), amonio persulfatas (APS), akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (AA/BAA) 40 % tirpalas, 3-[4-(2-hidroksietil)piperazino-1-il]propano-1-sulfoninė rūgštis (EPPS).

Honeywell: etanolis $\geq 99,8$ %.

Roth: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis (HEPES), kalcio chloridas (CaCl_2), guanidino hidrochloridas (GdnHCl), natrio divandenilio fosfatas (NaH_2PO_4), enilmetilsulfonilfluoridas (PMSF), triptonas, magnio sulfatas (MgSO_4), ampicilinas.

Sigma - Aldrich: cholesterolis, žmogaus serumo albuminas, natrio laktatas, alanil-glutaminas, vištos kiaušinio baltymas lizocimas.

TCI: kreatininas.

Tyrimams naudoti sulfonamidiniai junginiai (1 priedas.) gauti iš Vilniaus universiteto, gyvybės mokslų centro, biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriaus, Manto Žvirblio.

2.2. Konstruktai

- pET21b-GB1-TTR_A97S
- pET21b-GB1-TTR_V30M
- His-TEV

Konstruktai gauti iš „Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica“.

2.3. Kompetentinės ląstelės

- *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) (Thermo Scientific).
- *E. coli* One Shot™ Mach1™ (Thermo Scientific).

2.4. Tirpalai

TTR ir His-TEV proteazės gryninimui:

Lizės buferinis tirpalas: 0,3 M NaCl, 0,02 M Tris, 0,001 M DTT, 0,2 mg/mL Lizocimo. Į His-TEV proteazės lizės buferinį tirpalą papildomai dėta 0,001 M PMSF, 20 µg/mL Dnazės. Ištirpinama dH₂O, tirpalo pH koreguojamas su NaOH arba HCl tirpalu iki pH 8,0 ir filtruojamas per 0,45 µm dydžio porų filtrą.

Atplovimo buferinis tirpalas: 1 M NaCl, 0,02 M Tris, 0,001 M DTT, 0,01 M imidazolo. Ištirpinama dH₂O, tirpalo pH koreguojamas su su NaOH arba HCl tirpalu iki pH 8,0 ir filtruojamas per 0,45 µm dydžio porų filtrą.

Eliucijos buferinis tirpalas: 0,3 M NaCl, 0,02 M Tris, 0,001 M DTT, 0,5 M imidazolo. Ištirpinama dH₂O, tirpalo pH koreguojamas su su NaOH arba HCl tirpalu iki pH 8,0 ir filtruojamas per 0,45 µm dydžio porų filtrą.

Dializės buferinis tirpalas: 0,05 M NaCl, 0,02 M Tris, 0,001 M DTT, 0,001 M EDTA. Ištirpinama dH₂O, tirpalo pH koreguojamas su su NaOH arba HCl tirpalu iki pH 7,5.

Gelfiltracijos buferinis tirpalas: 0,05 M NaCl, 0,02 M Tris. Ištirpinama dH₂O, tirpalo pH koreguojamas su su NaOH arba HCl tirpalu iki pH 7,0 ir filtruojamas per 0,45 µm dydžio porų filtrą.

Lydimosi temperatūros (T_m) ir agregacijos tyrimams:

A1: 6 M GdnHCl, 20 mM NaCl, 10 mM PO₄³⁻, pH 7,4.

A2: 6 M karbamidas, 20 mM NaCl, 10 mM PO₄³⁻, pH 7,4.

A3: 8 M karbamidas, 20mM NaCl, 10 mM PO₄³⁻, pH 7,4.

A4: 20 mM NaCl, 10 mM PO₄³⁻, pH 7,4.

B1: 50 mM NaOAc (gautas maišant NaOH ir CH₃COOH), 100 mM KCl, pH 4,4.

B2: 200 mM NaOAc (gautas maišant NaOH ir CH₃COOH), 100 mM NaCl, pH 4,4.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM NaH₂PO₄, pH 7,4.

dSS (dirbtinis smegenų skystis): 50 mM HEPES, 132,6 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,4 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 2,4 mM natrio laktatas, 6,5 mM karbamidas, 0,11 mM kreatininas, 0,0061 mM žmogaus serumo albuminas, 0,00091 mM TTR, 0,7 mM alanilglutaminas, 0,3 mM vitaminas C, 0,078 mM cholesterolis, pH 7,3.

Kiti buferiniai tirpalai:

50× TAE elektroforezės buferinis tirpalas: 20,81 g EDTA, 242 g Tris-HCl, 57,1 mL ledinės acto rūgšties, pilama dH₂O iki 1 L.

1 % agarozės tirpalas: 2 g agarozės tirpinama 200 mL 1× TAE buferiniame tirpale. Pakaitinama iki kol agarozė ištirpsta.

10× baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 63,05 g EPPS, 60,57 g Tris-HCl, 0,5 % NDS, 1,5 g EDTA ištirpinama 1 L dH₂O.

6× NDS-PAGE dažo tirpalas: 1,5 g NDS, 3,75 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1,2 mL 0,1% bromfenolio mėlynojo dažo, 1 mL 10 mM DTT, 4 mL glicerolio ir užpilama H₂O iki 20 mL.

2.5. Mitybinės terpės

Agarizuota LB terpė: 25 g sausos LB mitybinės terpės ir 15 g agarų užpilama 1 L dH₂O. Autoklavuojama 20 min., 121 °C temperatūroje. Terpei atvėsus, įpilama kanamicino (galutinė konc. 50 µg/mL) arba ampicilino (galutinė konc. 100 µg/mL). Terpė išpilstoma į Petri lėkštes ir laikoma 4 °C temperatūroje.

LB terpė: 25 g sausos LB terpės ištirpinama 1 L dH₂O ir autoklavuojama 121 °C, 20 min.

ZYM-5052 auto-induktyvi mitybinė terpė: 18 g triptono, 9 g mielių ekstrakto, 6,39 g Na₂HPO₄, 6,12 g KH₂PO₄, 4,8 g NH₄Cl, 1,26 g Na₂SO₄, 0,885 g MgSO₄ ir ištirpinama 1,5 L dH₂O. Atskirai atsveriami 9 g glicerolio, 0,9 g dekstrozės bei 3,6 g laktozės ir ištirpinama 300 mL dH₂O. Abi terpės autoklavuojamos atskirai, 20 min., 121 °C. Abu tirpalai steriliai sumaišomi. Įdedama 100 µg/mL ampicilino arba kanamicino (galutinė konc. 50 µg/mL).

S.O.C. terpė: ištirpinama 1 g mielių ekstrakto, 4 g triptono, 0,1 g NaCl. Dedama 2 mL 250 mM KCl, pilama dH₂O iki 200 mL. Terpė autoklavuojama 20 min, 121 °C temperatūroje. Tada įpilama 1 mL 2 M MgCl₂ ir 3,6 mL 20 % gliukozės tirpalo.

2.6. Sorbentai

- „Ni Sepharose™ 6Fast Flow“ (Cytiva).
- „Superdex™ 75“ (Cytiva).

2.7. Rinkiniai

Plazmidės išskyrimo rinkinys: „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific).

2.8. Laboratorinė įranga

Atominės jėgos mikroskopas: „Dimension Icon“ (Bruker).

Chromatografinės sistemos: „ÄKTA Start“ (Cytiva).

Centrifugos: „LMC-4200R“ (Biosan), „5810/5810 R“ (Eppendorf).

AJM metaliniai diskai: „AFM Metallscheiben, 12 mm“ (Plano).

Elektroforezės aparatas: PowerEase Touch 120W Power Supply“, „Biometra Minigel-Twin“ (Thermo Scientific).

Nano-diferencinio skenavimo fluorimetras: „Prometheus NT.48“ (Nano-Temper Technologies).

Filtravimo membrana: „MF-MC-047-045“ (maišytas celiuliozės esteris, diametras – 47 mm, porų dydis 0,45 µm) (Kinesis).

Kapiliarinis vamzdelis: „BB31695-PE/2“ (0,38 mm × 1,09 mm) (Scientific Commodities).
Kapiliarų sandarinimo rinkinys: „Capillary Sealing Paste“, „Capillary Sealing Applicators“ (Nano-Temper Technologies).

Koncentratorius: „Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 10 kDa MWCO“ (Merck).

Laminarinė traukos spinta: „Telstar Bio II Advance“.

Inkubatorius: „IB-15G“ (Thermo Scientific).

Magnetinės maišyklės: „RT Touch-22“, „Isotemp Hot Plate Stirrer Model“ (Thermo Scientific).

Mėgintuvėliai: „Axygen“ (Corning), „Fisherbrand“, „Eppendorf“ (Thermo Scientific).

pH-metras: „Orion Dual Star“ (Thermo Scientific).

Stiklo rutuliukai: „Glass beads 3 mm“ (Sigma Aldrich), „RETSCH Glass Beads for Mills“ (nuo 0,75 iki 1 mm) (Thermo Scientific).

Svarstyklės: „PCB 1000-2“ (Kern), „TP-214“ (Denver Instrument).

Termostatas: „Digital Heating Shaking Drybath“, „Medline Scientific“ (Thermo Scientific).

Termocikleriai: „Rotor-Gene Q“ (QIAGEN), „Mastercycler PCR“ (Eppendorf).

Vandens valymo sistema: „Simplicity UV system“ (Merck).

Vakuumine filtravimo iranga: „Sigma-Aldrich“.

Spektrofotometrai: „NanoDrop™ 2000/2000C Spectrophotometer“ (Thermo Scientific), „UV-1800 UV-VIS“ (Shimadzu).

Žèrutis: „SiO₂ Substrates“ (Ted Pella, INC.).

Ultragarso aparatas: „Sonopuls HD 3100“, sonotrodas „Sonopuls VS 70 T“ (Bandelin).

3. METODAI

3.1. GB1 geno sekos pašalinimas (*angl. deletion*)

3.1.1. Plazmidinės DNR dauginimas ir išskyrimas

Pirmiausia, norint pasidauginti turimas plazmides su GB1 geno seka (pET21b-GB1-TTR_A97S ir pET21b-GB1-TTR_V30M), buvo atliekama kompetentinių ląstelių transformacija. Į

200 μL *E. coli* One Shot™ Mach1™ kompetentines ląstelės įpilama 2 μL plazmidinės DNR ir inkubuojama ant ledo 30 min. Atliekamas karščio šokas 42 °C, 90 s. Po to ląstelės 2 min. padedamos į ledą. Į mišinį įpilama 300 μL S.O.C. terpės ir inkubuojamos termostatinėje purtyklėje 37 °C temperatūroje, 30 min., 220 aps./min. Po inkubacijos ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu ir inkubuojama 37 °C temperatūroje per naktį.

Po inkubacijos parenkama viena kolonija, kuri perkeliama į 15 mL skystą LB terpę su 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicilinu ir auginama per naktį 37 °C, 220 aps./min. Po inkubacijos ląstelės centrifuguojamos 10 min., 3160 $\times$ g, o plazmidė išskiriama naudojant „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Galutinė plazmidės koncentracija nustatoma „NanoDrop™ 2000/2000C“ spektrofotometru.

3.1.2. PGR mutagenezė

Siekiant pašalinti GB1 koduojančią seką, buvo naudojami specifiniai PGR pradmenys (3.1 Lentelė). PGR mišinio sudėtis ir sąlygos nurodytos 3.1 ir 3.2 lentelėse.

3.1 Lentelė. Naudotos pradmenų sekos.

	Pradmens seka	Ilgis, nt
Tiesioginis pradmuo	5' GATATACATATGCACCATCACCATCACCATCAC 3'	33
Atvirkštinis pradmuo	5' GTGATGGTGCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC 3'	39

3.2 lentelė. PGR mišinio sudėtis.

Reagentai	Tūris, μL
dH ₂ O	33
Buferinis tirpalas 5 $\times$	10
Tiesioginis pradmuo	2,5
Atvirkštinis pradmuo	2,5
Matricinė DNR	0,5
dNTPs	1
Phusion polimerazė	0.5

3.3 lentelė. PGR sąlygos.

Ciklas	T, °C	Trukmė	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	95 °C	3 min.	1
Denatūracija	95 °C	30 s	30
Pradmenų prilipimas	58 °C	30 s	
Elongacija	72 °C	3 min.	
Galutinė elongacija	72 °C	5 min.	1

3.1.3. Matricinės DNR karpymas

Norint pašalinti matricinę DNR iš PGR mišinio, po PGR į reakcijos mišinį buvo įdedama 2 μL 10x Tango buferio tirpalo ir 0,5 μL restrikcijos endonukleazės fermento DpnI. Paruoštas mišinys inkubuotas 1 val., 37 °C temperatūroje. Šis fermentas selektyviai skaido metilintą matricinę DNR.

Po inkubacijos fermentinė reakcija buvo stabdoma 10 min. kaitinant mėginį 80 °C temperatūroje. Gautas mišinys analizuojamas DNR elektroforezės gelyje.

3.1.4. DNR elektroforezė

1 % agarozės gelio tirpalas kaitinamas, kol agarozė ištirpsta. Tirpalui atvėsus įpilama „SYBR™ Safe“ DNA dažo ir atsargiai sumaišoma. Paruoštas agarozės tirpalas supilamas į gelio formą, įstatomos šukos ir paliekama sustingti. Geliui sustingus, forma perkeliama į elektroforezės aparatą ir užpilama TAE buferiniu tirpalu. Mėginiai ruošiami 5 µL DNR mėginio maišant su 1 µL 6x DNR dažo buferiniu tirpalu „Orange DNA Loading Dye“. DNR fragmentų dydžiui nustatyti naudojamas DNR molekulinis žymuo „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“. Elektroforezė atliekama 80 V įtampa ir 100 mA srove 60 min.

3.1.5. Kolonijų PGR ir teigiamų kolonijų atranka

Išanalizavus PGR mišinį DNR elektroforezės būdu, atliekama kompetentinių ląstelių transformacija, pagal 3.1.1 skyrelyje aprašytą metodiką. Siekiant nustatyti, ar išaugusios bakterijų kolonijos turi tikslinę plazmidę, be GB1 fragmento, atliekama kolonijų PGR (3.4 lentelė. ir 3.5 lentelė.). PGR metu naudojami T7 pradmenys, kurie turėtų padauginti vektoriaus regioną be GB1 sekos, todėl pagal fragmento dydį būtų galima nustatyti teigiamas kolonijas. Kolonijų PGR metu, vietoj plazmidinės DNR įnešama vienos kolonijos biomasės dalis. Pirmiausia, pasirinkta kolonija pernešama ant naujos Petri lėkštelės su kieta LB terpe ir ampicilinu, o nedidelė jos dalis įdedama į paruoštą PGR reakcijos mišinį. Po PGR atliekama DNR elektroforezė ir pagal gautų fragmentų dydžius nustatomos teigiamos kolonijos. Pasirinkta teigiama kolonija padauginama ir išskiriama pagal 3.1.1 skyrelyje aprašytą metodiką. Galutinė plazmidės kokybė ir koncentracija nustatoma „NanoDrop™ 2000/2000C“ spektrofotometru. Siekiant įvertinti GB1 fragmento pašalinimą ir mutacijų nebuvimą, atliekama plazmidės DNR sekoskaita Sangerio metodu (sekoskaitą atliko Genewiz).

3.4 lentelė. PGR mišinio sudėtis.

Reagentai	Tūris, µL
dH ₂ O	20,9
Buferinis tirpalas 10x	2,75
Tiesioginis pradmuo T7	1,375
Atvirkštinis pradmuo T7	1,375
dNTPs	0,55
Taq polimerazė	0,5

3.5 lentelė. PGR sąlygos.

Ciklas	T, °C	Trukmė	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	95 °C	3 min.	1
Denatūracija	95 °C	30 s	25
Pradmenų prilipimas	48 °C	30 s	
Elongacija	72 °C	3 min.	
Galutinė elongacija	72 °C	5 min.	1

3.2. Baltymų raiška ir gryninimas

3.2.1. Kompetentinių ląstelių transformacija, naktinės bakterijų kultūros paruošimas ir auginimas

Į 200 µL *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) kompetentines ląsteles dedama 2 µL plazmidinės DNR ir atliekama transformacija pagal prieš tai aprašytus žingsnius. Konstruktui koduojančiam His-TEV proteazės geną naudojamas kanamicinas (galutinė konc. 50 µg/mL), o transtiretino – ampicilinas (galutinė konc. 100 µg/mL).

Į 30 mL autoklavuotą skystą LB terpę dedama atitinkamai kanamicino (galutinė konc. 50 µg/mL) arba ampicilino (galutinė konc. 100 µg/mL). Įdedama viena, ant Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, išaugusi kolonija. Bakterijos auginamos purtyklėje 37 °C, 200 aps./min. iki 0,5 - 0,7 optinio tankio.

3.2.2. Biomasės auginimas, tikslinio baltymo sintezė ir biomasės ardymas

Į 6 kolbas su 300 mL auto-induktyvia ZYM-5052 mitybine terpe įpilama po 3 mL naktinės kultūros. Ląstelės auginamos 37 °C, 220 aps./min., 6 val. optiniam tankiui pasiekus 0,6, baltymų sintezė vykdoma 20 °C, 220 aps./min., per naktį. Po auginimo biomasė centrifuguojama 30 min., 4000 × g, 4 °C.

Po centrifugavimo supernatantas nupilamas, o ląstelių nuosėdos tirpinamos lizės buferiniame tirpale. Mišinys homogenizuojamas ir ardomas ultragarsu 15 min., 40 % amplitudė, 5 s veikimo ir 20 s poilsio režimu ant ledo. Suardyta biomasė centrifuguojama 4 °C, 30 min. Supernatantas nupilamas ir filtruojamas per 0,45 µm dydžio filtrą.

3.2.3. Imobilizuoto metalo jono afininė chromatografija (IMAC)

IMAC chromatografijai naudojama kolonėlė su „Ni Sepharose™ 6Fast Flow“ sorbentu. Kolona prijungiama prie AKTA chromatografinės sistemos ir nulygsvarinama su atplovimo buferiniu tirpalu. Tikslinis baltymas užnešamas ir atplaunamas leidžiant imidazolo koncentracijos laiptinį gradientą. Renkamos frakcijos, kurios analizuojamos baltymų elektroforezės gelyje (3.2.9 skyrelis). Surinktos frakcijos su tiksliniu baltymu supilamos į dializės žarną, kuri dedamas į buferinį tirpalą ir dializuojama 12 val. šaldytuve. Gauti baltymai koncentruojami iki reikiamos koncentracijos ir saugomi -20 °C (His-TTR A97S ir His-TTR V30M) ir -80 °C (His-TEV proteazė).

3.2.4. His-TTR žymės kirpimas naudojant His-TEV protezę bei IMAC

Norint surasti geriausias sąlygas His-TTR žymės nukirpimui buvo pasirinkta paimti mažą kiekį tikslinio baltymo ir proteazės (galutinio reakcijos mišinio tūris 350 µL). Optimizavimas buvo atliktas keičiant His-TEV proteazės:baltymo santykį (1:5, 1:10, 1:20, 1:50), laiką (24 val. ir 48 val.), DTT koncentraciją (0 mM, 1 mM, 5 mM), temperatūrą (4 °C ir 20 °C) bei vartant mėgintuvėlius 10 aps./min. ir nevartant. Karpymo efektyvumas vertinamas baltymų elektroforezės gelyje (3.2.9 skyrelis).

Tolimesnis karpymas atliktas optimaliausiomis sąlygomis: 20 °C, 5 mM DTT, 1:10 santykiu, 48 val. Antrosios afininės chromatografijos metu baltymas su nukirpta 7xHis žyme surenkamas pratekėjusioje frakcijoje, o likęs nenukirptas pakartotinai karpomas ir atliekama IMAC pagal 3.2.3 skyrelyje aprašytą metodiką. Gauti rezultatai analizuojami baltymų elektroforezės gelio nuotraukose (3.2.9 skyrelis), o gautas baltymas sukonzentruotas, matuojant „NanoDrop™ 2000/2000C“ spektrofotometrą.

3.2.5. Gelfiltracijos chromatografija

Gelfiltracijos chromatografijai naudojama kolonėlė HiLoad 26/600, pakrauta sorbentu Superdex 75 ir prijungiama prie AKTA chromatografinės sistemos. Kolona užpildyta gelfiltracijos buferiniu tirpalu. Mėginys užnešamas ir registruojama UV absorbcija. Pastebėjus UV sugerties pakilimą surenkamos frakcijos. Surinkti mėginiai analizuojami baltymų elektroforezės gelyje (3.2.9 skyrelis). Tikslinės frakcijos apjungiamos ir koncentracija nustatoma „NanoDrop™ 2000/2000C“ prietaisu.

3.2.6. Baltymų elektroforezė

Baltymų analizei buvo atlikta natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė (NDS-PAGE). Elektroforezei ruošiami du geliai: apatinis skiriamasis (10 %) ir viršutinis koncentruojamasis (4 %). Pirmiausia paruoštas skiriamąjo gelio mišinys buvo supiltas tarp dviejų stiklo plokštelių, o ant jo paviršiaus užpiltas distiliuotas vanduo. Gelis paliktas polimerizuotis apie 30 min. Sustingus skiriamajam geliui, vanduo nupilamas ir užpilamas koncentruojamojo gelio mišinys, įstatomos šukos šulinėliams suformuoti. Po maždaug 30 min., geliui pilnai sukietėjus, plokštelės perkeliama į elektroforezės aparatą, kurio talpyklos užpildomos elektroforezės buferiniu tirpalu.

Baltymų mėginiai paruošiami juos sumaišant su 6x NDS-PAGE dažo tirpalu ir kaitinant 10 min., 95 °C temperatūroje. Išėmus šukas, į pirmą šulinėlį įpilama 5 µL baltymų molekulinės masės žymens, o į kitus po 5 µL paruoštų mėginių. Elektroforezė vykdoma palaikant 200 V įtampą apie 40 min., kol dažas pasiekia skiriamąjo gelio apačią.

Pasibaigus elektroforezei, gelis išimamas iš stiklo plokštelių, nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir dažomas Kumasi mėlynuoju dažu. Po to dažas pašalinamas gelį blukinant vandeniu.

3.6 lentelė. NDS-PAGE gelio sudėtis.

Apatinis skiriamasis gelis 10 %		Viršutinis koncentruojamasis gelis 4 %	
dH ₂ O	2,86 mL	dH ₂ O	1,27 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,53 mL	1 M Tris-HCl pH 6,8	500 µL
40 % AA/BAA	1,53 mL	40 % AA/BAA	201 µL
10 % NDS	61 µL	10 % NDS	20 µL
10 % APS	30,5 µL	10 % APS	20 µL
TEMED	3,65 µL	TEMED	2 µL

3.3. Transtiretino išsivyniojimo temperatūros nustatymas

3.3.1. Nano-diferencinio skenavimo fluorimetrija (nano-DSF)

Transtiretino baltymo išsivyniojimo temperatūrai nustatyti buvo naudojamas Prometheus NT.48 (Nano-Temper Technologies) fluorimetras. Į kapiliarus (NanoTemper) pritraukiama tiriamojo baltymo tirpalo. Temperatūros intervalas 20-99 °C, temperatūros pokytis 1 °C/min. Optimalios baltymų išsivyniojimo temperatūros sąlygų nustatymui buvo atliktos šešios analizės:

1. Skirtingos guanidino hidroklorido (GdnHCl) koncentracijos (0,5-2 M) buvo gautos į reakcijos mišinį įdedant skirtingus kiekius A1 ir A4 tirpalų. Atitinkamai, skirtingos karbamido koncentracijos (0,5-6 M) buvo paruoštos maišant A2/A3 ir A4 buferinius tirpalus. Į kiekvieną reakcijos mišinį įdėta TTR V30M baltymo (74,5 µM baltymo tirpalas), kurio koncentracija galutiniame tirpale 18,2 µM (1 mg/mL).
2. 4 M karbamido tirpalas buvo paruoštas maišant A3 ir A4 tirpalus. Į reakcijos mišinį įdedant TTR V30M baltymo (galutinė koncentracija mėginyje 20 µM) ir po vieną iš junginių, kurių galutinė koncentracija tirpale 100 µM (MZ22-23, MZ21-10, MZ22-55 MZ23-04, Tafamidis), 20 µM Tafamidžio (10 mM junginio ištirpinta DMSO) (1 Priedas.).
3. 0,5-4 M karbamido tirpalai buvo gauti maišant A3 ir A4 tirpalus. Į reakcijos mišinius įdedant TTR V30M baltymo ir Tafamidžio, kurių galutinė koncentracija atitinkamai 10 µM ir 50 µM.
4. TTR V30M baltymo tirpalas skiedžiamas iki 10 µM, o Tafamidžio iki 50 µM su B1 ir B2 tirpalais.
5. TTR V30M baltymo tirpalas skiedžiamas iki 10 µM, o Tafamidžio skiedžiamas iki penkių skirtingų koncentracijų (5, 10, 25, 50, 100 µM) naudojant B1 tirpalą.

Šeštos analizės metu matuojamos temperatūros intervalas buvo padidintas 20-110 °C (temperatūros pokytis 1 °C/min). Kapiliarų galai, po tirpalo pritraukimo, buvo užsandarinami specialia sandarinimo pasta, siekiant išvengti mėginių išgaravimo. Baltymo išsivyniojimo temperatūrai nustatyti pirmiausia 100 µM junginio (ištirpinti DMSO, galutiniame tirpale DMSO sudarė 5 %) inkubuojama 30 min. su 10 µM TTR, po to įpilamas PBS buferinis tirpalas ir inkubuojama 30 min. Kontroliniai mėginiai buvo paruošti naudojant tik TTR baltymą PBS tirpale bei papildomai įdėjus 5 % DMSO. Matavimai atlikti 3-4 kartus.

Duomenų analizė buvo atlikta naudojant MoltenProt programa (Kotov et al., 2020). Transtiretino baltymo išsivyniojimo temperatūra (T_m) gaunama iš duomenų pirminės išvestinės.

3.3.2. Diferencinio skenavimo fluorimetrija (DSF)

Baltymų išsivyniojimo temperatūrai stebėti naudojamas Rotor-Gene Q (QIAGEN) termocikleris. Į tiriamus mėgintuvėlius buvo išpilstoma po 20 µL reakcijos mišinio. Temperatūros intervalas 25-99 °C, temperatūros pokytis 1 °C/min. Fluorescencijos sužadinimas: 365 ± 20 nm,

emisija: 460 ± 20 nm. Duomenų apdorojimui naudojama MoltenProt programa (Kotov et al., 2020). Matavimai atlikti:

1. 8 mėginiuose po 100 μ L su 10 μ M TTR V30M baltymo tirpalo, naudojant B1 tirpalą. Kiekviename mėginyje buvo naudojamos skirtingos ANS dažo koncentracijos (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 μ M).
2. 8 mėginiuose po 100 μ L reakcijos mišinio su 10 μ M TTR ir 100 μ M Tafamidžio buvo inkubuojamas 30 min., du mėginiai paruošti naudojant B1 tirpalą, kiti du naudojant A1 tirpalą. Naudojamos skirtingos 50 ir 100 μ M ANS dažo koncentracijos ir inkubuojama dar 90 min.

3.4. Transtiretino agregacijos tyrimas

3.4.1. Agregacijos sąlygų optimizavimas

Pirmiausia TTR baltymo agregacijos tyrimas buvo atliktas remiantis literatūros duomenimis, rūgštinėmis sąlygomis (pH 4,4), naudojant buferinius tirpalus B1 ir B2 (Ferreira et al., 2021; Ritsch et al., 2024). Tyrimas buvo vykdomas penkias dienas, inkubuojant reakcijos mišinį su 10 μ M TTR, 37 °C temperatūroje.

Antrajame agregacijos tyrime buvo naudojamas PBS buferinis tirpalas su 0 M, 1 M ir 2 M GdnHCl koncentracijomis. Baltymo koncentracija galutiniame reakcijos mišinyje 10 μ M. Mėginiai buvo inkubuojami tiek be purtymo, tiek su purtymu (700 aps./min.) penkių dienų laikotarpyje. Purtymo sąlygomis eksperimentas buvo atliekamas dviem būdais: į mėgintuvėlį įdėjus du didesnius stiklo rutuliukus (3 mm) ir be stiklo rutuliukų. Į mėgintuvėlius, sąlygoms be purtymo, buvo įdėti ± 106 vnt. (0.13 ± 0.0005 g) mažesni (nuo 0,75 iki 1 mm) stiklo rutuliukai arba iš viso nedėti. Tyrimai buvo atlikti dviejose temperatūrose 37 °C ir 60 °C (3.7 Lentelė.).

Trečiasis agregacijos tyrimas buvo atliekamas remiantis antrojo agregacijos tyrimo rezultatais. Tyrimai vykdyti 1x PBS buferiniame tirpale su 1 M GdnHCl, praskiedžiant baltymą iki 10 μ M koncentracijos, 60 °C temperatūroje. Mėginiai iš reakcijos mišinio buvo imami po dviejų ir po penkių dienų laikymo. TTR V30M variantui naudotos sąlygos be purtymo, o TTR A97S – su 700 aps./min. purtymu. Taip pat buvo pasirinktos papildomos sąlygos, į vieną mėgintuvėlį su PBS tirpalu įdėta 100 μ M TTR stabilizatoriaus Tafamidžio, o kitame vietoj PBS buferinio tirpalo buvo naudotas dSS. Šiuose mėginiuose taip pat naudota 1 M GdnHCl koncentracija.

Siekiant sumažinti mėginių išgaravimą bei temperatūrų svyravimus, visi mėgintuvėliai buvo sandariai uždengti „Parafilm M“ plėvele.

3.7 Lentelė. Agregacijos sąlygos.

Buferinis tirpalas	Temperatūra, °C	Purtymas	Rutuliukai
PBS	37	Be purtymo	Be rutuliukų ± 106 vnt. (0,75 iki 1 mm)
		700 aps./min.	Be rutuliukų 2 vnt. (3 mm)
	60	Be purtymo	Be rutuliukų ± 106 vnt. (0,75 iki 1 mm)
		700 aps./min.	Be rutuliukų 2 vnt. (3 mm)
PBS + 1 M GndHCl	37	Be purtymo	Be rutuliukų ± 106 vnt. (0,75 iki 1 mm)
		700 aps./min.	Be rutuliukų 2 vnt. (3 mm)
	60	Be purtymo	Be rutuliukų ± 106 vnt. (0,75 iki 1 mm)
		700 aps./min.	Be rutuliukų 2 vnt. (3 mm)
PBS + 2 M GndHCl	37	Be purtymo	Be rutuliukų ± 106 vnt. (0,75 iki 1 mm)
		700 aps./min.	Be rutuliukų 2 vnt. (3 mm)
	60	Be purtymo	Be rutuliukų ± 106 vnt. (0,75 iki 1 mm)
		700 aps./min.	Be rutuliukų 2 vnt. (3 mm)

3.4.2. Atominės jėgos mikroskopija (AJM)

AJM metu buvo analizuojami agregacijos tyrimo mėginiai. Pirmiausia su lipnia juostele naujai nulupamas žėrutis. Ant žėručio užnešama 50 µL 0,5 % APTES ir inkubuojama 5 min. Tuomet, paviršius nuplaunamas 2 mL dH₂O ir nudžiovinamas švelnia oro srove. Po to 50 µL baltymo mėginio užnešama ant žėručio ir inkubuojama 5 min. Žėrutis nuplaunamas 2 mL dH₂O ir nudžiovinamas švelnia oro srove.

Visi paruošti mėginiai yra matuojami naudojant atominės jėgos mikroskopą. Naudojami parametrai: aukšta rezoliucija (1024 × 1024 pikselių), 10 µm plotas, matavimo greitis 0,857 Hz. Vaizdiniai yra analizuojami programine įranga „Gwyddion“ (Nečas & Klapetek, 2012).

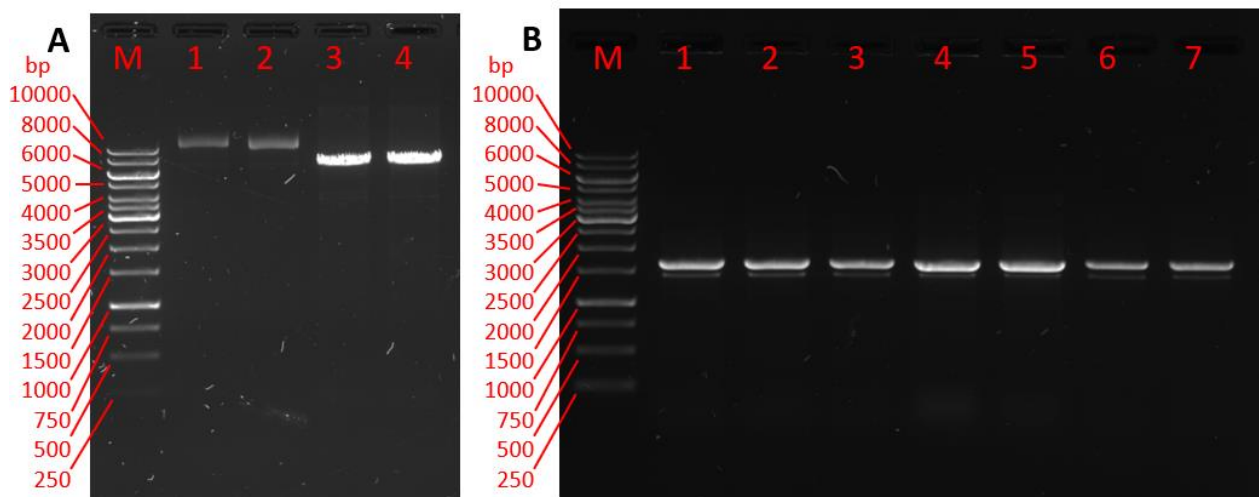
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Turimos plazmidės turėjo GB1 domeno geno seką, kuri nėra natūrali transtiretino (TTR) baltymo dalis, tačiau yra naudojama baltymo tirpumui ir stabilumui pagerinti (Song et al., 2022). Vis dėlto laboratorinėje praktikoje nustatyta, kad His-GB1 fragmento pašalinimas po baltymo raiškos yra neefektyvus, todėl, siekiant gauti struktūriškai artimesnį natūraliam TTR variantą ir pagerinti baltymo gamybos efektyvumą, ši seka buvo pašalinta PGR mutagenezės būdu (Cheng & Patel, 2004). Toliau atlikta baltymų raiška ir gryninimas naudojant imobilizuoto metalo jonų afininę chromatografiją (IMAC). Po pirminio TTR A97S ir TTR V30M gryninimo buvo pašalinta His žymė, pasitelkiant IMAC išgrynintą His-TEV proteazę. Siekiant pašalinti priemaišas ir pakeisti buferinį tirpalą į tinkamesnį tolimesniems tyrimams, atlikta gelfiltracijos chromatografija. Išgryninus dvi transtiretino formas (TTR V30M ir TTR A97S), buvo siekiama įvertinti, ar tiriami sulfonamidiniai junginiai gali stabilizuoti baltymo tetramerinę struktūrą. Tam buvo nustatoma baltymo lydymosi temperatūra (T_m), naudojant nano-DSF ir DSF metodus. Galiausiai buvo ieškoma optimaliausių fibrilių susidarymo sąlygų, keičiant agregacijos parametrus. Gauti rezultatai analizuoti pasitelkus atominės jėgos mikroskopiją.

4.1. TTR mutagenėzė

PGR mutagenezės metu, iš turimų konstruktyvų, sėkmingai pašalinta GB1 geno seka (4.1 pav. A Dalis.). Po reakcijos, matricinė plazmidinė DNR buvo suardyta naudojant DpnI restrikcijos endonukleazę ir atlikta kompetentinių ląstelių transformacija.

Atrinktos bakterijų kolonijos buvo patikrintos kolonijų PGR metodu, identifikuojant teigiamas kolonijas, turinčias konstruktyvą be GB1 sekos (4.1 pav. B dalis). Sekoskaitos metu patikrintos iš teigiamų kolonijų išskirtos plazmidės, kurios vėliau buvo naudojamos baltymų raiškai.



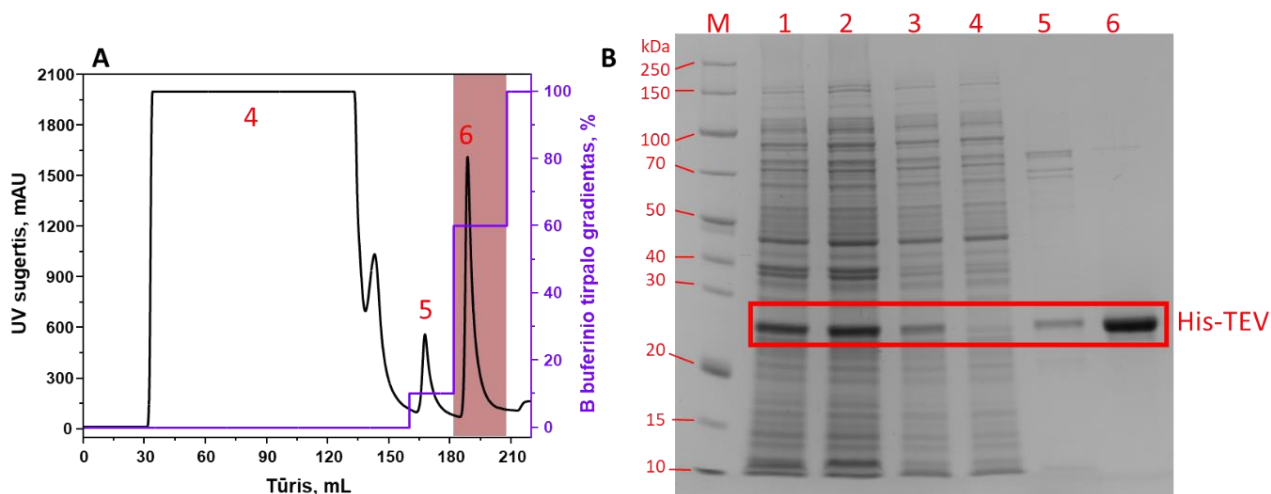
4.1 pav. A Dalis. PGR mutagenezės mėginių elektroforezės gelio nuotrauka: M – molekulinis žymuo, 1 – pET21b-GB1-TTR_A97S, 2 – pET21b-GB1-TTR_V30M, 3 – pET21b-GB1-TTR_A97S po PGR, 4 – pET21b-GB1-TTR_V30M po PGR; **B Dalis.** Kolonijų PGR mėginių elektroforezės gelio nuotrauka: M – molekulinis žymuo, nuo 1 iki 4 TTR V30M teigiamos kolonijos, nuo 5 iki 7 TTR A97S teigiamos kolonijos.

4.2. Baltymų raiška ir gryninimas

4.2.1. His-TEV proteazės gryninimas

Plazmidė, koduojanti His-TEV proteazę, buvo transformuota į *E. coli* BL21 Star™ (DE3) ląsteles. Po biomasės išauginimo ląstelės buvo suardytos, o tikslinis baltymas išgrynintas IMAC chromatografijos būdu (4.2 pav. A dalis).

Gryninimo metu surinkti mėginiai iš frakcijų analizuoti baltymų elektroforezės gelyje (4.2 pav. B Dalis.). Nustatytas, kad baltymas eliuavo prie 60 proc. elucijos buferinio tirpalo. Po to buvo atlikta tikslinės frakcijos dializė, po kurios baltymas sukonzentruotas ir užšaldytas.

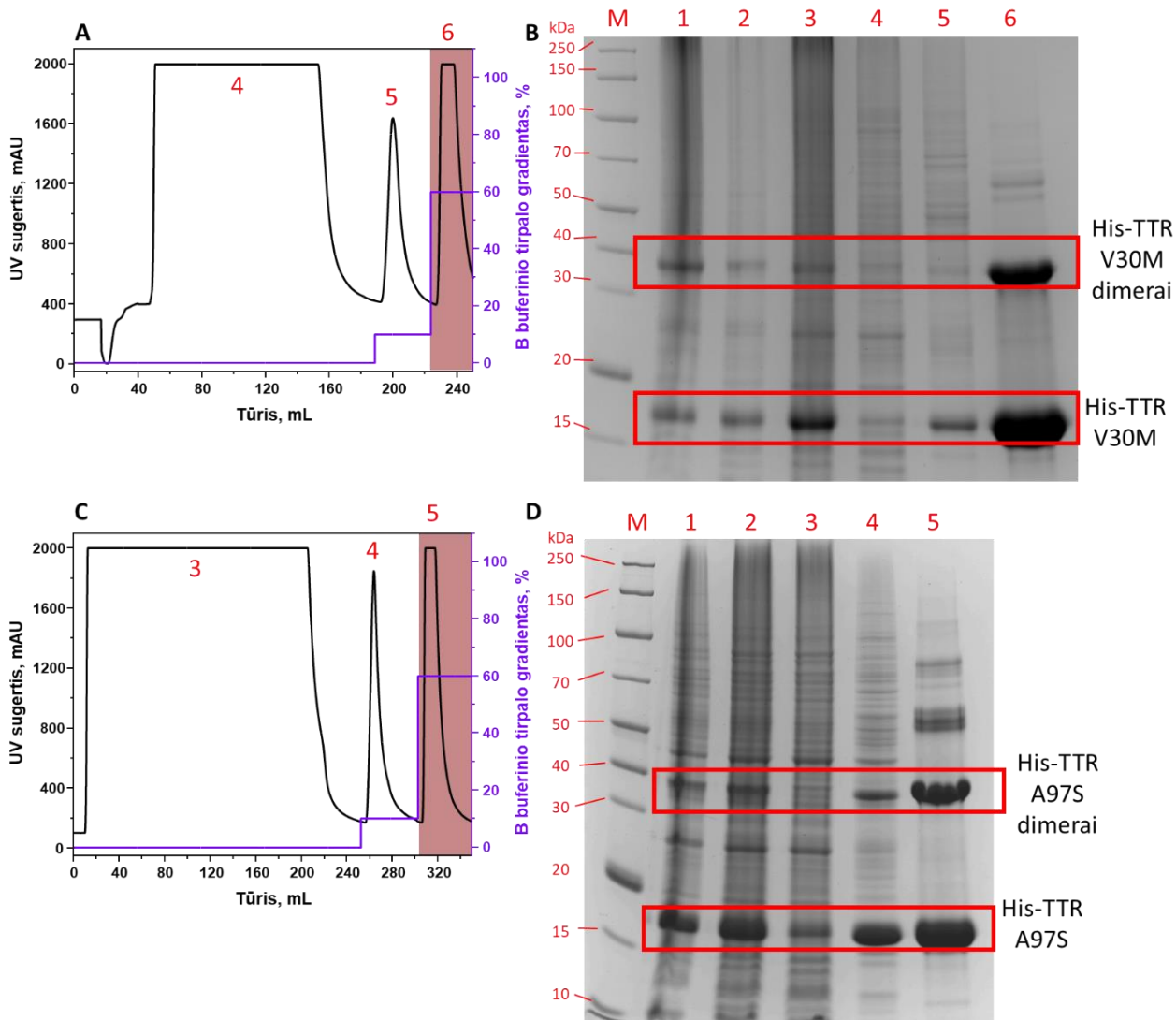


4.2 pav. A Dalis. His-TEV proteazės IMAC chromatograma; **B Dalis.** Baltymų elektroforezės gelio nuotrauka: M – molekulinis žymuo, 1 – biomasės mėginys, 2 – supernatanto mėginys po pirmo centrifugavimo, 3 – užnešimo ant kolonos mėginys, 4 – pratekėjusių (neprisijungusių) baltymų frakcija, 5 – 10 % B buferinio tirpalo frakcijos mėginys, 6 – 60 % B buferinio tirpalo frakcijos mėginys.

4.2.2. His-TTR A97S ir His-TTR V30M gryninimas

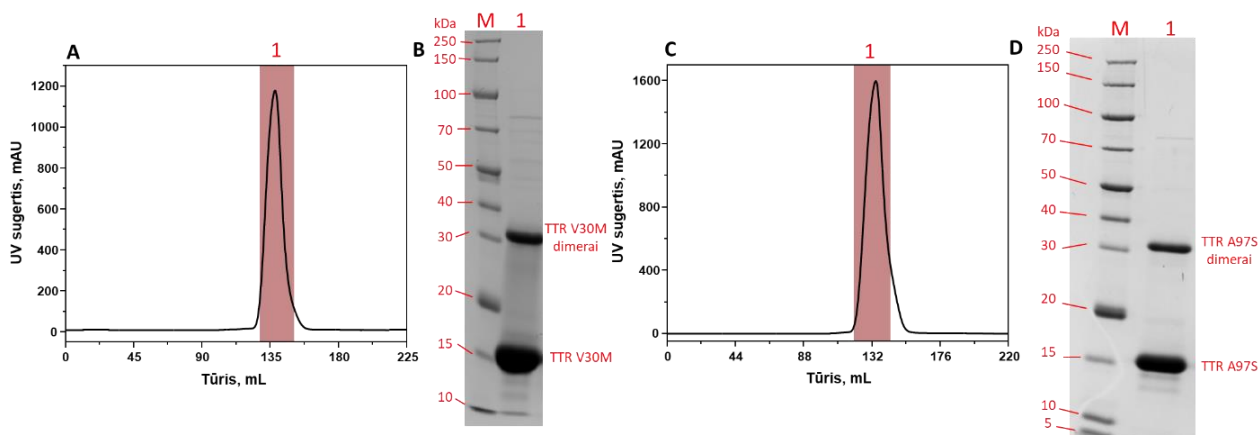
Kompetentinės *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) ląstelės buvo transformuotos su His-TTR A97S ir His-TTR V30M baltymų genų sekas koduojančiomis plazmidėmis. Užauginus bakterijų biomasę, atliekamas biomasės ardymas. Toliau afininės chromatografijos metu baltymas gryninamas didinant imidazolo koncentraciją. Pirmojo gryninimo metu 7xHis žymę turintis baltymas eliuojamas prie 60 proc. elucijos buferinio tirpalo (4.3 pav. A Dalis. ir C Dalis.). Gryninimo metu paimti mėginiai analizuoti NDS-PAGE būdu (4.3 pav. B Dalis. ir D Dalis.). Po tikslinės baltymo frakcijos dializės buvo atliktas 7xHis žymės nukirpimo optimizavimas. 350 μL reakcijos mišinyje, keičiant tokius parametrus kaip His-TEV proteazės ir baltymo santykį, laiką, DTT koncentraciją, temperatūrą bei vartant mėgintuvėlius 10 aps./min. ir nevartant, buvo atrinktos optimaliausios sąlygos: 20 °C, 5 mM DTT, 1:10 santykiu, 48 val.

Pasirinkus optimaliausias sąlygas iš tirtųjų ir nukirpus 7xHis žymę buvo atliekamas antrasis gryninimas. Antrosios afininės chromatografijos metu baltymas nesąveikauja su sorbentu, todėl yra randamas pratekėjusioje frakcijoje. Taip pat 60 proc. eliucijos buferinio tirpalo koncentracijos surinktas baltymas su nenukirpta 7xHis žyme dar kartą kerpamas ir kartojama afininė chromatografija.



4.3 pav. A Dalis. His-TTR V30M IMAC chromatograma; **B Dalis.** Baltymų elektroforezės gelio nuotrauka po His-TTR V30M gryninimo: M – molekulinis žymuo, 1 – biomasės mėginys, 2 – supernatanto mėginys po pirmo centrifugavimo, 3 – užnešimo ant kolonos mėginys, 4 – pratekėjusių (neprisijungusių) baltymų frakcija, pratekėjusių (neprisijungusių) baltymų frakcija, 5 – 10 % B buferinio tirpalo frakcijos mėginys, 6 – 60 % B buferinio tirpalo frakcijos mėginys; **C Dalis.** His-TTR A97S IMAC chromatograma; **D Dalis.** Baltymų elektroforezės gelio nuotrauka po His-TTR A97S gryninimo: M – molekulinis žymuo, 1 – supernatanto mėginys po pirmo centrifugavimo, 2 – užnešimo ant kolonos mėginys, 3 – pratekėjusių (neprisijungusių) baltymų frakcija, 4 – 10 % B buferinio tirpalo frakcijos mėginys, 5 – 60 % B buferinio tirpalo frakcijos mėginys.

Apjungus ir sukonzentravus surinktas tikslines frakcijas atliekama gelfiltracijos chromatografija (4.4 pav. A Dalis. ir C Dalis.). Chromatografijos metu atskirtos likusios priemonės bei pakeistas buferinis tirpalas į tinkamesnį saugojimui bei tolimesniems tyrimams. Gelfiltracijos metu surinkti mėginiai analizuoti baltymų elektroforezės gelyje. Baltymo frakcija surinkta ir sukonzentravus užšaldyta (4.4 pav. B Dalis. ir D Dalis.).



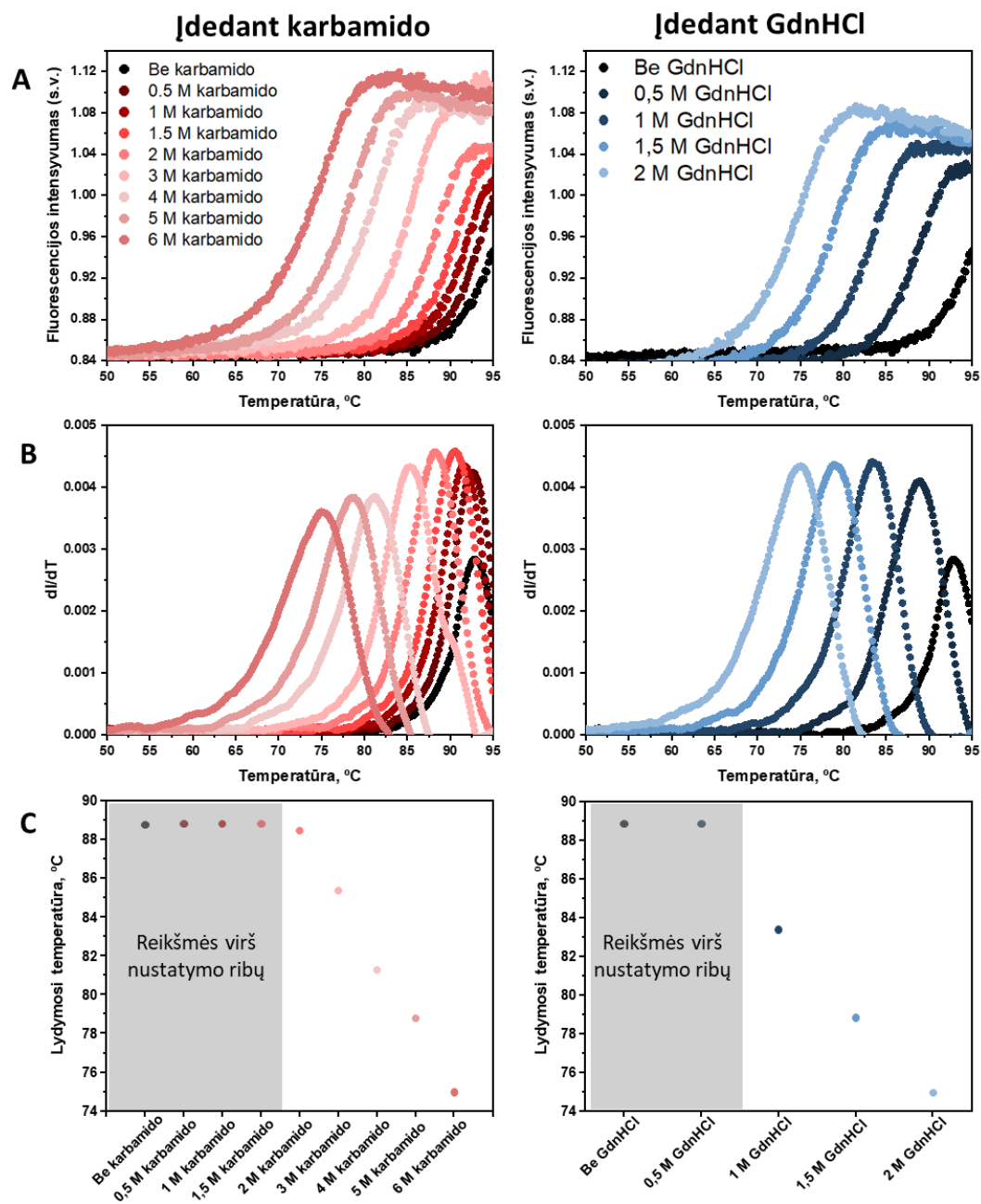
4.4 pav. A Dalis. TTR V30M gelfiltracijos chromatograma; **B Dalis.** Baltymų elektroforezės gelio nuotrauka tikslios baltymo frakcijos po gelfiltracijos: M – molekulinis žymuo, 1 – tikslinė baltymo frakcija; **C Dalis.** TTR A97S gelfiltracijos chromatograma; **D Dalis.** Baltymų elektroforezės gelio nuotrauka tikslios baltymo frakcijos po gelfiltracijos: M – molekulinis žymuo, 1 – tikslinė baltymo frakcija.

4.3. TTR lydymosi temperatūros nustatymas

4.3.1. TTR lydymosi temperatūros nustatymas nano-DSF metodu

Nano-diferencinio skenavimo fluorimetrija (nano-DSF) buvo atlikta siekiant įvertinti transtiretino baltymo išsivyniojimo temperatūrą (T_m). Nano-DSF metu yra matuojamas aminorūgščių triptofano ir tirozino fluorescencijos emisijos intensyvumas (4.5 pav. A Dalis). Kai baltymas išsivynioja, šios aromatinės aminorūgštys tampa prieinamos, o jų emisija pasikeičia iš 330 nm į 350 nm. Pamatavus santykį tarp šių emisijų bei suskaičiavus duomenų pirminę išvestinę yra gaunama baltymo išsivyniojimo temperatūra (išvestinės maksimumas) (4.5 pav. B Dalis ir C Dalis). TTR V30M baltymo T_m pradinėmis sąlygomis nustatyti nepavyko, kadangi ji buvo didesnė už nustatymo ribą ($>95\text{ }^{\circ}\text{C}$), ko ir buvo tikėtasi pagal literatūros duomenis (Hammarström, 2024).

Siekiant sumažinti baltymo T_m , eksperimentas buvo atliktas įdedant nuo 0,5 iki 2 M guanidino hidrochlorido (GdnHCl) ir nuo 0,5 iki 6 M karbamido, kurie veikia baltymus kaip denatūrantai. Iš fluorescencijos intensyvumo pirminių išvestinių kreivių maksimumų gautos lydymosi temperatūros rodo, kad didėjant GdnHCl koncentracijai T_m mažėja Tuo tarpu karbamido poveikis pastebimas tik esant ≥ 2 M koncentracijai, kas rodo silpnesnį jo denatūruojantį poveikį (4.5 pav.).



4.5 pav. A Dalis. Fluorescencijos intensyvumo pokytis, didinant temperatūrą; **B Dalis.** Fluorescencijos intensyvumo pokyčio išvestinė, didinant temperatūrą; **C Dalis.** TTR V30M baltymo išsivyniojimo temperatūros (T_m) priklausomybė nuo guanidino hidrochlorido (nuo 0,5 iki 2 M) ir karbamido koncentracijos (nuo 0,5 iki 6 M).

Norint įvertinti sulfonamidinių junginių poveikį TTR V30M lydymosi temperatūrai, pirmiausia buvo atlikta junginių atranka. Iš junginių bibliotekos, kurių slopinantis baltymo A β agregacijos poveikis jau buvo nustatytas, atrinkti potencialūs sulfonamidiniai junginiai, taikant kompiuterinę baltymo-ligando sąveikos modeliavimo analizę (Žvirblis et al., 2024). Atrinkti junginiai pagal kompiuterinę analizę jungėsi panašiai kaip žinomas stabilizatorius Tafamidis. Taip pat buvo atsižvelgta į tai, kad TTR gali sąveikauti su A β , todėl šie junginiai galėtų turėti dvejopą

poveikį – ne tik slopinti A β agregaciją, bet ir stabilizuoti TTR tetramerą. Atrinkus junginius, kurie galėtų stabilizuoti baltymą (padidinti baltymo T_m) prisijungiant į jo aktyvųjį centrą, buvo atliktas tyrimas denatūruojančiomis sąlygomis (4 M karbamido tirpale) (1 priedas). Kaip kontrolė naudotas žinomas transtiretino stabilizatorius Tafamidis, kuris turėtų didinti baltymo lydymosi temperatūrą. Vis dėlto Tafamidis reikšmingos įtakos T_m neturėjo. Toks rezultatas galėjo būti dėl netinkamai pasirinktų tyrimo sąlygų ir naudota karbamido koncentracija galėjo sutrikdyti baltymo-ligando sąveiką (2 priedas).

Ieškant sąlygų, kuriomis Tafamidis stabilizuotą transtiretiną buvo matuojama lydymosi temperatūra, reakcijos mišinyje su Tafamidžiu ir be jo. Tyrimas buvo atliktas naudojant skirtingas karbamido koncentracijas. Didinant karbamido koncentraciją, lydymosi temperatūra mažėjo, nepaisant to ar buvo įdėtas Tafamidis ar ne, todėl buvo nuspręsta ieškoti kitų lydymosi temperatūros nustatymo sąlygų (3 priedas).

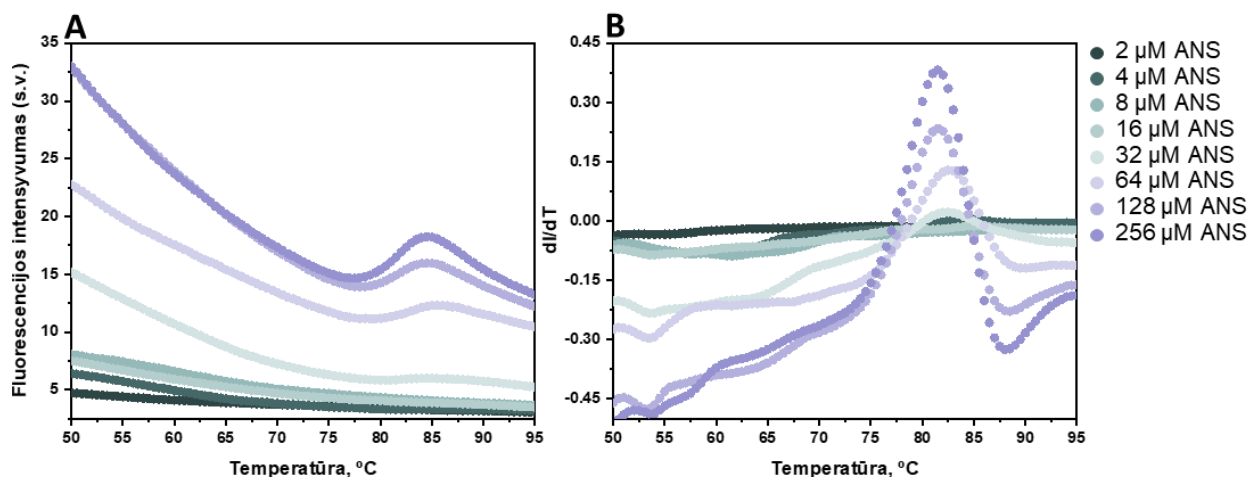
Neradus tinkamų sąlygų, lydymosi temperatūros pokyčius nustatyti naudojant denatūrantus, remiantis literatūros duomenimis, buvo pasirinkta, lydymosi temperatūros matavimus atlikti rūgštinėmis sąlygomis (pH 4,4). Kadangi tokiomis sąlygomis baltymas yra monomerinės formos, jo išsivyniojimo procesas reakcijos mišinyje be Tafamidžio nevyko, todėl lydymosi temperatūros (T_m) nustatyti nepavyko (Lim et al., 2013). Į reakcijos mišinį įdėjus Tafamidžio, baltymas, tikėtina, sudaro tetramerinę struktūrą, todėl pavyko nustatyti T_m apie 88 °C (4 priedas).

Toliau buvo bandoma optimizuoti TTR:Tafamidžio santykį. Atsižvelgiant į literatūros duomenis, ankstesni tyrimai buvo atlikti naudojant 1:5 (TTR:Tafamidžio) santykį. Siekiant įvertinti Tafamidžio koncentracijos poveikį, buvo atliktas lydymosi temperatūros nustatymas, keičiant Tafamidžio koncentraciją tirpale. Nustatyta, kad šiuo atveju skirtinga Tafamidžio koncentracija tirpale reikšmingos įtakos T_m neturėjo (5 priedas).

4.3.2. TTR lydymosi temperatūros nustatymas DSF metodu

Kadangi nano-DSF metodu nepavyko patikimai įvertinti TTR baltymo lydymosi temperatūros (T_m) priklausomybės nuo sulfonamidinių junginių poveikio, buvo atlikta diferencinio skenavimo fluorimetrija (DSF). Matavimo metu buvo naudojamas ANS dažas, kuris jungiasi prie baltymų hidrofobinių aminorūgščių liekanų, kurios tampa prieinamos baltymo išsivyniojimo metu.

Optimizuojant matavimo sąlygas, buvo pasirinktos tirti skirtingos ANS dažo koncentracijos tirpale (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 μ M). Gauti rezultatai parodė, kad rūgštinėse sąlygose TTR V30M T_m yra apie 85 °C, tai yra žemesnė vertė nei nustatyta nano-DSF metodu tomis pačiomis sąlygomis. Baltymo lydymosi temperatūrą galime tiksliau matyti nuo 64 μ M ANS dažo koncentracijos (4.6 pav.).

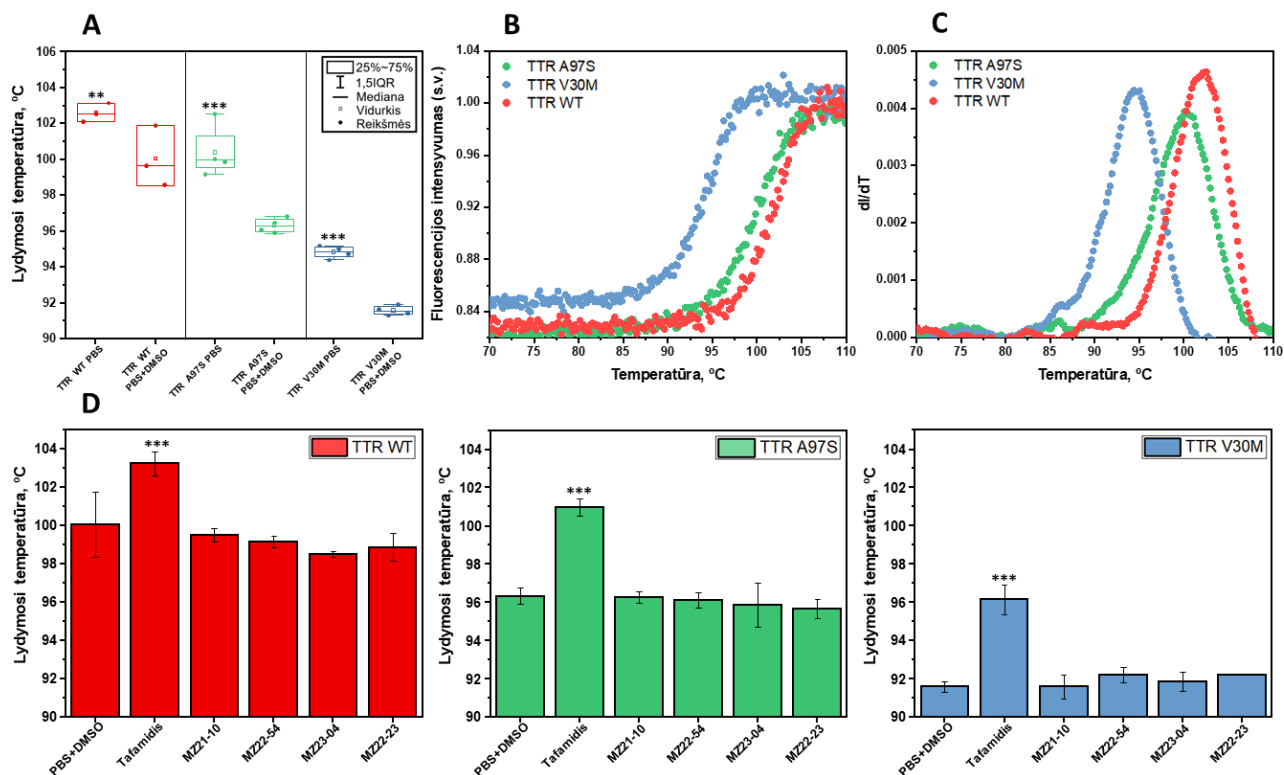


4.6 pav. A Dalis. ANS dažo fluorescencijos intensyvumo duomenys; **B Dalis.** Fluorescencijos intensyvumo pirminės išvestinės, matuojant TTR V30M baltymo stabilumą su skirtingomis ANS koncentracijomis (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 μM) rūgštinėmis, pH 4,4.

Siekiant įvertinti Tafamidžio poveikį TTR V30M lydymosi temperatūrai, buvo pasirinkta naudoti santykį 1:10 (TTR:Tafamidžio), 50 ir 100 μM ANS dažo koncentracijas reakcijos mišinyje bei dvi pH reikšmes 4,4 ir 7,4. Reikšmingo skirtumo tarp lydymosi temperatūros mėginiuose nebuvo pastebėta (6 priedas).

4.3.3. nano-DSF su sandarintais kapiliaro galais

Siekiant išplėsti temperatūros matavimo ribas, nano-DSF analizė buvo atlikta naudojant užsandarintus kapiliarų galus, kas leistų pakelti temperatūrą iki 110 $^{\circ}\text{C}$ laipsnių. Šio tyrimo metu PBS tirpale nustatyta transtiretino V30M ir A97S išsivyniojimo temperatūra yra $94,8 \pm 0,3$ $^{\circ}\text{C}$ ir $100,4 \pm 1,5$ $^{\circ}\text{C}$, kai TTR WT $102,6 \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$ (4.7 pav. B ir C dalis). Kaip ir tikėtasi, stabiliausia baltymo forma buvo laukinio tipo, o nestabiliausia – turinti mutacija V30M. Lyginant TTR lydymosi temperatūrą PBS ir PBS su DMSO tirpale (sulfonamidiniai junginiai buvo tirpinti DMSO tirpale), nustatyta, kad visoms tirtoms TTR formoms, DMSO esant tirpale, lydymosi temperatūra buvo reikšminai mažesnė (4.7 pav. A dalis). Tafamidis didino lydymosi temperatūrą, tačiau kiti junginiai reikšmingos įtakos neturėjo (4.7 pav. D dalis). Gauti rezultatai iš dalies atitinka literatūroje randamus duomenis. Tyrimo metu PBS tirpale nustatytos transtiretino variantų išsivyniojimo temperatūros yra šiek tiek didesnės. Literatūroje TTR V30M $92,8 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$, TTR A97S $98,5 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$, o TTR WT $101,1 \pm 0,3$ $^{\circ}\text{C}$. Vis dėlto bendra tendencija sutampa, stabiliausia forma yra TTR WT, o mažiausiai stabili – TTR V30M. Taip pat DMSO sumažina visų TTR formų lydymosi temperatūrą, o Tafamidis ją padidina (Liu et al., 2019).



4.7 pav. A Dalis. TTR baltymų lydymosi temperatūros (T_m) nustatytos nano-DSF (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA (Bonferroni); **B Dalis.** Fluorescencijos intensyvumo pokytis, didinant temperatūrą (PBS tirpalas); **C Dalis.** Fluorescencijos intensyvumo pokyčio išvestinė, didinant temperatūrą (PBS tirpalas); **D Dalis.** TTR baltymų lydymosi temperatūros (T_m) nustatytos nano-DSF (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA (Bonferroni), lyginant su PBS+DMSO).

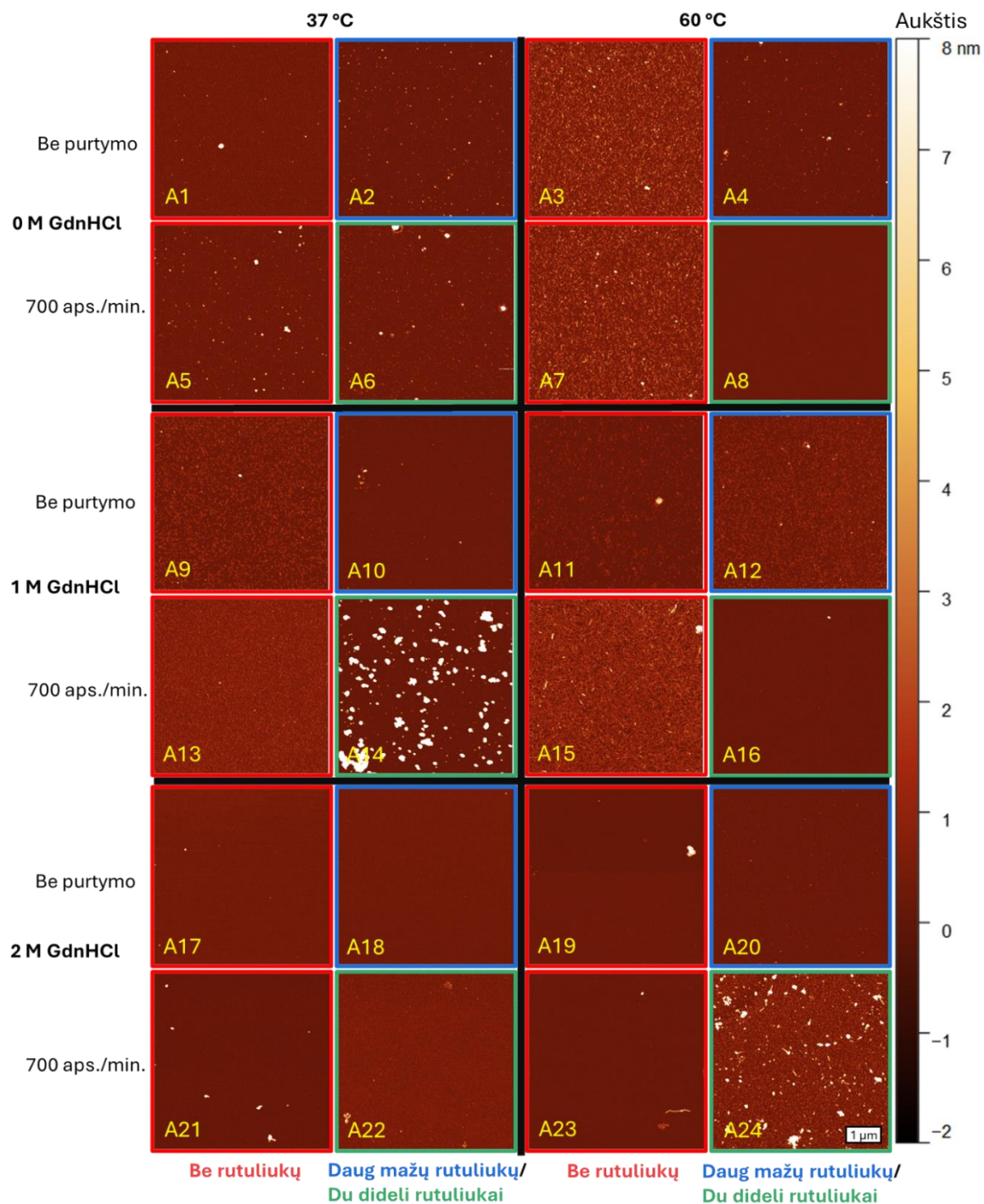
4.4. TTR agregacijos tyrimas

4.4.1. TTR agregacijos sąlygų optimizavimas

Norint gauti TTR amiloidines fibriles ir ištirti potencialių slopiklių poveikį agregacijos mechanizmui, pirmiausia buvo atlikta literatūros analizė, siekiant nustatyti tinkamas TTR agregacijos sąlygas. Remiantis literatūra, TTR agregacija dažniausiai atliekama rūgštinėmis sąlygomis (pH 4,4) 37 °C temperatūroje (Ferreira et al., 2021; Ritsch et al., 2024).

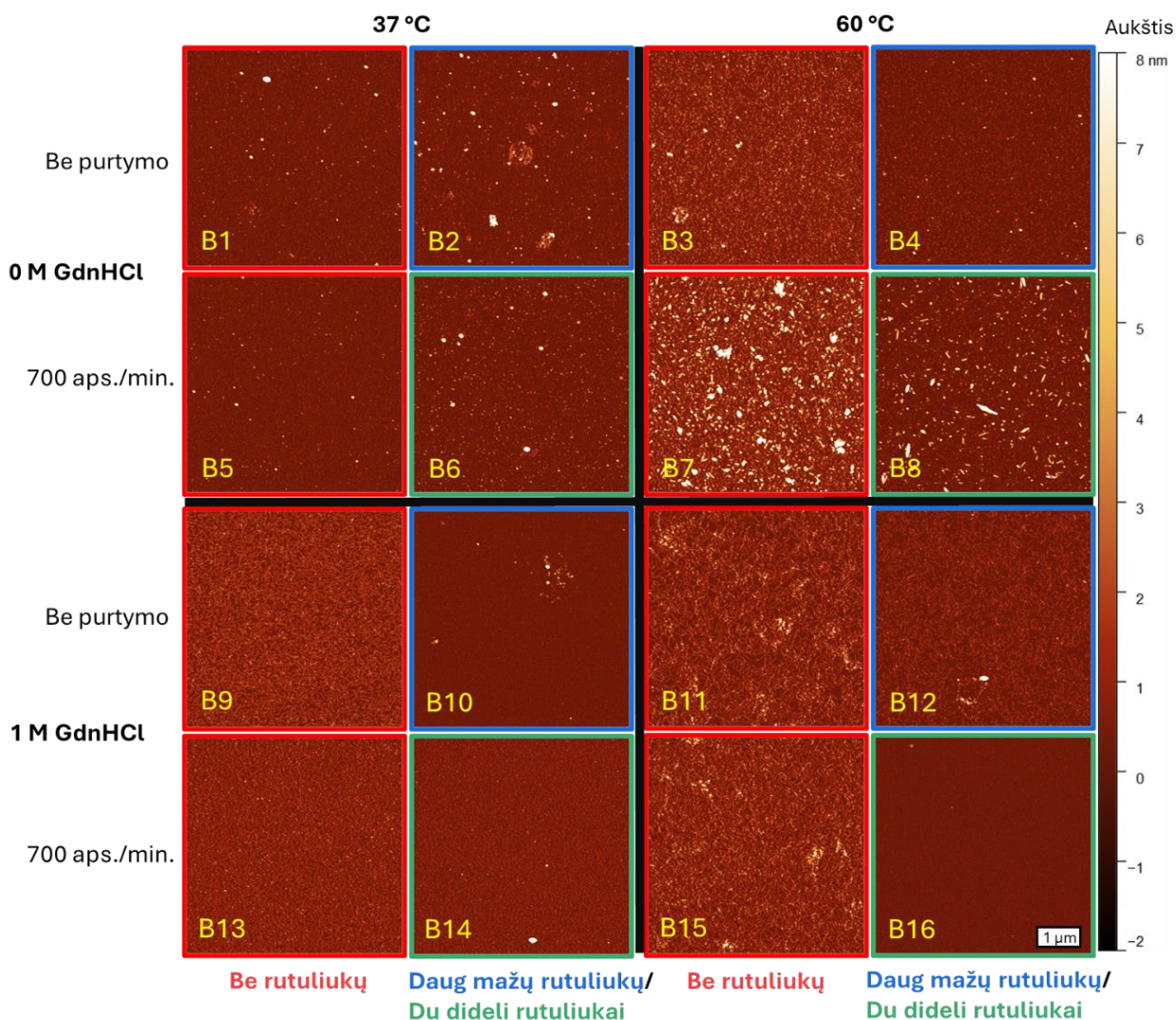
Pakartojus literatūroje aprašytus metodus ir negavus amiloidinių TTR baltymo fibrilių, buvo nuspręsta optimizuoti agregacijos sąlygas, naudojant transtiretino patogeninį variantą TTR A97S. Šiuo tikslu agregacija buvo atlikta 24 skirtingomis sąlygomis (3.7 Lentelė.). Vizualiai vertinant atominės jėgos mikroskopu gautas nuotraukas, matyti, kad 37 °C temperatūroje, fosfatiniame buferiniame tirpale be GdnHCl, daugiausia stebimi dariniai panašūs į oligomerus (4.8 pav. A1, A2, A5, A6). Trumpi fibriliai dariniai ryškiausiai matomi esant 60 °C temperatūrai, fosfatiniame tirpale su 1 M GdnHCl be rutuliukų (4.8 pav. A3, A7, A11, A15). Esant 1 M GdnHCl, stebima didžiausia morfologinė įvairovė (4.8 pav. A9-A16). Mažiausiai darinių matoma fosfatiniame buferiniame tirpale su 2 M GdnHCl po 2 dienų (4.8 pav. A17-A23). Vis dėlto, po 5 dienų esant 2 M GdnHCl ir 60 °C temperatūroje be rutuliukų, paviršius nebuvo padengtas monomerais ar oligomerinėmis

sankaupomis, tačiau matoma viena tiesi fibrilė, primenanti randamas *ex vivo* (Schmidt et al., 2019). Tai gali parodyti, kad dalis agregatų yra sulipę ir pasiskirstę netolygiai, kas galėjo apsunkinti jų identifikavimą (4.8 pav. A23). Panašios tiesios fibrilės taip pat stebėtos ir mėginyje su rutuliukais (4.8 pav. A24).



4.8 pav. TTR A97S agregatų vaizdiniai gauti atominės jėgos mikroskopu 24 skirtingomis sąlygomis.

Tos pačios sąlygos buvo pakartotos su TTR V30M forma, tačiau buvo pasirinkta nenaudoti 2 M GdnHCl, kadangi tomis sąlygomis buvo matomas mažiausias, susidariusių agregatų kiekis. Kaip ir TTR A97S atveju, matyti, kad 37 °C temperatūroje, fosfatiniame buferiniame tirpale be GdnHCl, daugiausia stebimi į oligomerus panašūs dariniai (4.9 pav. B1, B2, B5, B6). Po penkių dienų 60 °C temperatūroje stebimos agregatų sankaupos (4.9 pav. B7, B8). Taip pat 60 °C temperatūroje, fosfatiniame tirpale be GdnHCl ir be rutuliukų, matomi trumpi fibriliniai dariniai, tačiau tomis pačiomis sąlygomis tik su 1 M GdnHCl stebimi ilgesni fibriliniai dariniai (4.9 pav. B3, B7, B11, B15). TTR V30M mėginių vaizdiniuose galime matyti daugiau ilgesnių fibrilinių darinių ir kitomis šio tyrimo sąlygomis. Toks skirtumas galėjo būti dėl baltymo mažesnio stabilumo, ką patvirtina 4.3.3 skyriuje gauti rezultatai ir literatūra.



4.9 pav. TTR V30M agregatų vaizdiniai gauti atominės jėgos mikroskopu 16 skirtingų sąlygų.

TTR agregacijos procesą lemia aplinkos sąlygos, kurios keičia agregacijos kinetiką, todėl susidaro skirtingos morfologinės struktūros. Esant 0 M GdnHCl ir 37 °C, baltymas išlieka artimas

natyviai būsenai, todėl agregacija vyksta lėtai ir dominuoja oligomerai. Padidinus temperatūrą iki 60 °C, spartėja molekulių judėjimas ir mažėja energijos barjeras, todėl lengviau formuojasi fibrilės (Almeida & Brito, 2020). Tuo tarpu 1 M GdnHCl sukelia dalinę denatūraciją, atveria hidrofobinius regionus ir sudaro palankias sąlygas agregacijai, todėl stebima morfologinė įvairovė. Esant 2 M GdnHCl, baltymas yra denatūruotas (praradęs natyvią konformaciją ir išsilankstęs (*angl. unfolded*)), todėl nesusidaro dariniai ir agregacija slopinama (Acharya & Chaudhuri, 2021). Papildomas mechaninis poveikis (purtymas ir rutuliukai) skatina fragmentaciją taip didindamas fibrilių kiekį bei trumpindamas jų ilgį (You et al., 2025).

4.4.2. TTR amiloidinių fibrilių vaizdiniai

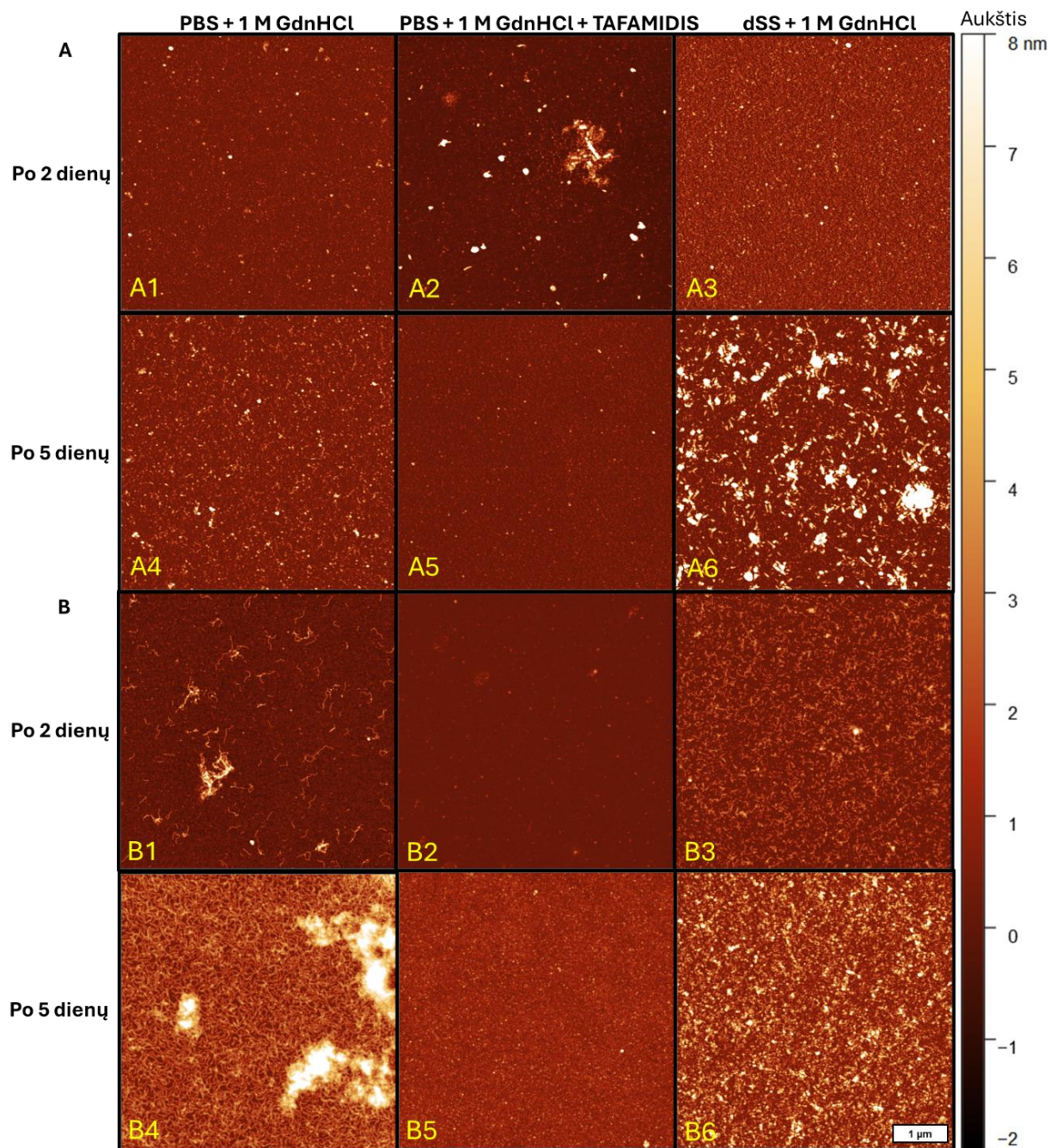
Norint įvertinti, kaip keičiasi susidariusių agregatų morfologija į reakcijos mišinį įdėjus Tafamidžio bei vietoj PBS tirpalo nadojant dSS tirpalą, agregacijos tyrimai buvo atliekami pagal ankstesnio tyrimo metu atrinktas sąlygas (tirpalas su 1 M GdnHCl, baltymą praskiedžiant iki 10 µM koncentracijos ir inkubuojant 60 °C temperatūroje, TTR V30M variantui naudotos sąlygos be purtymo, o TTR A97S su 700 aps./min. purtymu). Šį kartą mėginiai buvo analizuojami ne tik po 5, bet ir po 2 dienų. Dviejų dienų pakako, kad būtų stebimos TTR V30M mutanto fibrilės, tuo tarpu TTR A97S fibrilės matomos tik po penkių dienų (4.10 pav. A4, B1, B4). Tai sutampa su anksčiau gautais duomenimis, rodančiais, kad TTR V30M variantas yra mažiau stabilus nei TTR A97S.

Į reakcijos mišinį įdėjus Tafamidžio, abiejų transtiretino variantų mėginiuose fibrilių susidarymas nebuvo stebėtas, tačiau matomos apvalios struktūros primenančios oligomerinius darinius (4.10 pav. A2, A5, B2, B5). Kadangi yra žinoma, jog Tafamidis jungiasi į TTR tiroksino prisijungimo vietą ir stabilizuoja tetramerinę baltymo formą, monomerų susidarymas yra slopinamas (Gertz et al., 2025; Tschöpe & Elsanhoury, 2022). Salygose, kai į reakcijos mišinį įdėtas Tafamidis TTR A97S, po 2 dienų, be oligomerinių darinių, matomos kelios kirmino formos (*angl. worm-like*) struktūros. Po 5 dienų tose pašiose sąlygose jų nebuvo matyti. Tai gali rodyti, kad dalis agregatų yra sulipę ir pasiskirstę netolygiai, kas galėjo apsunkinti jų identifikavimą (4.10 pav. A2, A5). Tuo tarpu dSS tirpale susidariusios fibrilės buvo trumpesnės nei PBS tirpale (4.10 pav. A4, A6, B1, B4, B6). Tai gali būti susiję su dSS sudėtyje esančių metalų jonų, baltymų ir kitų molekulių poveikiu. Šie veiksniai gali keisti agregacijos mechanizmą, susidarantių agregatų morfologiją bei slopiklių poveikį (Sakalauskas et al., 2023).

Lyginant gautus vaizdinius su literatūroje randamais duomenimis, PBS su 1 M GdnHCl sąlygomis matomos TTR fibrilės primena taip vadinamas kirmino formos (*angl. worm-like*) fibriles, kurios yra plonos, susiraizgiusios ir skirtingo ilgio. Jos yra morfologiškai panašesnės į *ex vivo* randamas B tipo fibriles, kurios yra ilgesnės, storesnės ir sudaro pluoštus (4.10 pav. A4, B1, B4) (Saelices et al., 2018).

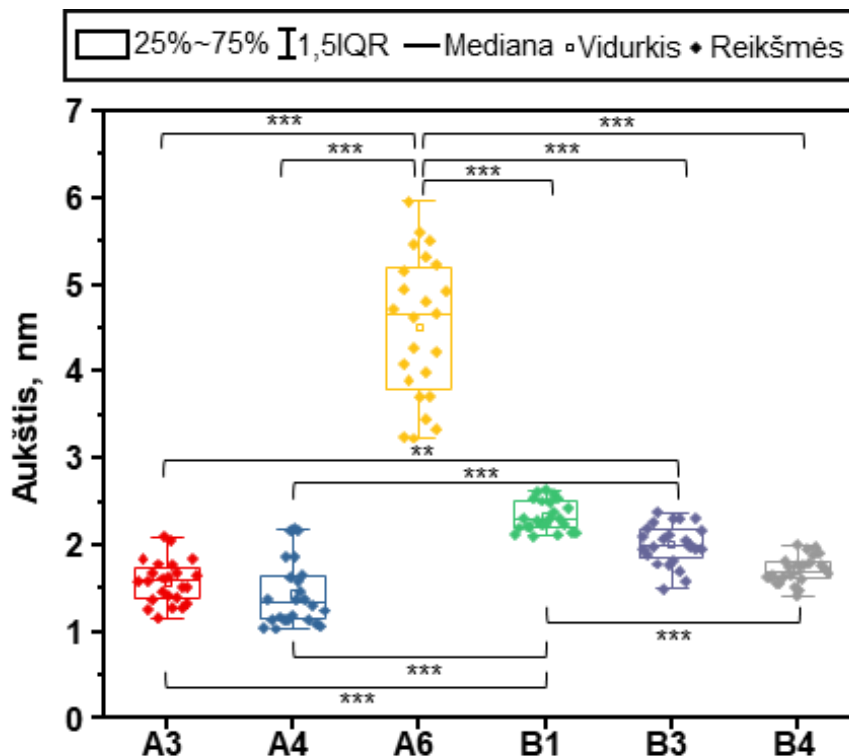
Tuo tarpu dSS su 1 M GdnHCl terpėje matomos TTR V30M fibrilės panašios į taip vadinamas A tipo fibriles, nustatytas *ex vivo* sąlygomis. Jos yra trumpesnės, heterogeniškos, dažnai fragmentuotos, išsidėsčiusios chaotiškai (4.10 pav. B3, B6) (Nguyen et al., 2024; Schmidt et al., 2019). Po 5 dienų matomi TTR A97S heterogeniški agregatai, kuriuose stebimos trumpos

sustorėjusios fibrilės bei amorfiškesni dariniai (4.10 pav. A6). Šie rezultatai rodo, kad tirpalo sudėtis gali reikšmingai paveikti TTR agregacijos mechanizmą ir susidarančių darinių morfologiją. Fiziologiškai artimesnėmis sąlygomis formuojasi agregatai, labiau panašūs į *ex vivo* aptinkamas TTR amiloidines fibriles. Tuo tarpu standartiniuose *in vitro* modeliuose dažnai trūksta fiziologinėje aplinkoje esančių komponentų, todėl tokiose sąlygose gali vyrauti lankstesnės, kirmino formos (angl. worm-like) fibrilės.



4.10 pav. A Dalis. TTR A97S agregatų vaizdiniai gauti atominės jėgos mikroskopu; **B Dalis.** TTR V30M agregatų vaizdiniai gauti atominės jėgos mikroskopu.

Norint palyginti susidariusių fibrilių aukštį skirtingomis sąlygomis, buvo atrinktos 4.10 pav. pateiktų mėginių nuotraukos, kuriose aiškiai identifikuojamos fibrilės: A3, A4, A6, B1, B3 ir B4. Kadangi analizuotose nuotraukose fibrilių tankis buvo didelis, kiekviename mėginyje buvo pamatuoti 25 fibrilių aukščiai. Analizuojant gautus duomenis nustatyta, kad A6 nuotraukoje stebimų fibrilių aukštis buvo reikšmingai didesnis nei kitomis sąlygomis susidariusių fibrilių, taip pat turėjo didžiausią aukščių pasiskirstymą. Tuo tarpu kitose sąlygose fibrilių aukščiai buvo mažesni ir tarpusavyje panašesni. Visose tirtose sąlygose nustatyti fibrilių aukščiai buvo nuo 1 iki 6 nm (4.11 pav.).



4.11 pav. TTR fibrilių aukščių pasiskirstymas iš 4.10 pav. (n = 25, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ANOVA (Bonferroni)).

Nors TTR agregacija yra plačiai tiriama, šio baltymo agregacijos mechanizmai *in vitro* sąlygomis vis dar nėra iki galo išaiškinti. TTR svarbus ne tik TTR sukeltų amiloidozių patogenezėje, bet ir sąveikoje su kitais linkusiais agreguoti baltymais, pavyzdžiui, amiloidu beta (Aβ), siejamu su Alzheimerio liga (Du & Murphy, 2010). Dėl šios priežasties svarbu ne tik identifikuoti TTR agregacijai palankias sąlygas, bet ir suprasti, kaip skirtingi aplinkos veiksniai keičia šio proceso eigą.

Šiame darbe pavyko atkurti TTR agregacijos procesą skirtingomis *in vitro* sąlygomis ir nustatyti, kad agregatų morfologija priklauso nuo tirpalo sudėties. Gauti rezultatai leis detaliau tirti agregacijos mechanizmus bei susidariusių struktūrų poveikį kitiems baltymams, *in vivo* artimesnėmis sąlygomis. Taip pat dSS terpėje stebėtų agregatų morfologija parodė, kad sudėtyje esančios komponentės gali reikšmingai paveikti susidarančių agregatų struktūrą. Tai parodo fiziologinių sąlygų svarbą *in vitro* tyrimuose.

IŠVADOS

1. Buvo gauta apie ~82 mg V30M, apie ~134 mg A97S transtiretino bei apie ~123 mg His-TEV proteazės.
2. Nustatyta, kad PBS tirpale transtiretino V30M ir A97S išsivyniojimo temperatūra yra atitinkamai $94,8 \pm 0,3$ °C ir $100,4 \pm 1,5$ °C, kai TTR WT $102,6 \pm 0,5$ °C.
3. Atrinkti sulfonamidiniai junginiai transtiretino patogeninių variantų V30M ir A97S išsivyniojimo temperatūrai reikšmingos įtakos neturėjo.
4. Nustatytos bendros agregacijos sąlygos (10 µM TTR, PBS su 1 M GdnHCl, 60 °C temperatūra), kuriose TTR V30M ir TTR A97S per 5 dienas suformuoja fibrilinius agregatus.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Acharya, V. V., & Chaudhuri, P. (2021). Modalities of Protein Denaturation and Nature of Denaturants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 69(2). <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v69i02.002>
2. Adamcik, J., & Mezzenga, R. (2012). Study of amyloid fibrils via atomic force microscopy. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(6), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.08.001>
3. Ahmad, M. U. D., Fish, A., Molenaar, J., Sreeramulu, S., Richter, C., Altincekic, N., Schwalbe, H., Wienk, H., & Perrakis, A. (2021). Nano-Differential Scanning Fluorimetry for Screening in Fragment-based Lead Discovery. *Journal of Visualized Experiments*, (171), 62469. <https://doi.org/10.3791/62469>
4. Almeida, Z. L., & Brito, R. M. M. (2020). Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules*, 25(5), 1195. <https://doi.org/10.3390/molecules25051195>
5. Almeida, Z. L., Vaz, D. C., & Brito, R. M. M. (2024). Transthyretin mutagenesis: Impact on amyloidogenesis and disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 61(7), 616–640. <https://doi.org/10.1080/10408363.2024.2350379>
6. Attiyah, S. (n.d.). *Transthyretin: Molecular Functions, Immunological Roles and Its Involvement in Amyloidogenesis*.
7. Bezerra, F., Saraiva, M. J., & Almeida, M. R. (2020). Modulation of the Mechanisms Driving Transthyretin Amyloidosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 592644. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.592644>
8. Carroll, A., Dyck, P. J., De Carvalho, M., Kennerson, M., Reilly, M. M., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2022). Novel approaches to diagnosis and management of hereditary transthyretin amyloidosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 93(6), 668–678. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-327909>
9. Charvat, A. F., Mason-Chalmers, K., & Gestwicki, J. E. (2025). A beginner's guide to differential scanning fluorimetry. *The Biochemist*, 47(2), 11–15. https://doi.org/10.1042/bio_2024_921
10. Cheng, Y., & Patel, D. J. (2004). An efficient system for small protein expression and refolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(2), 401–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.068>
11. Coelho, T., Merlini, G., Bulawa, C. E., Fleming, J. A., Judge, D. P., Kelly, J. W., Maurer, M. S., Planté-Bordeneuve, V., Labaudinière, R., Mundayat, R., Riley, S., Lombardo, I., & Huertas, P. (2016). Mechanism of Action and Clinical Application of Tafamidis in Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurology and Therapy*, 5(1), 1–25. <https://doi.org/10.1007/s40120-016-0040-x>
12. Delgado, D., Dabbous, F., Shivappa, N., Mazhar, F., Wittbrodt, E., Shridharmurthy, D., & Järbrink, K. (2025). Epidemiology of transthyretin (ATTR) amyloidosis: A systematic literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 20(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13023-025-03547-0>
13. Du, J., & Murphy, R. M. (2010). Characterization of the Interaction of β -Amyloid with Transthyretin Monomers and Tetramers. *Biochemistry*, 49(38), 8276–8289. <https://doi.org/10.1021/bi101280t>
14. Dufrène, Y. F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., Gerber, C., & Müller, D. J. (2017). Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, 12(4), 295–307. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>

15. Ferreira, E., Almeida, Z. L., Cruz, P. F., Silva E Sousa, M., Veríssimo, P., & Brito, R. M. M. (2021). Searching for the Best Transthyretin Aggregation Protocol to Study Amyloid Fibril Disruption. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 391. <https://doi.org/10.3390/ijms23010391>
16. Gerdes, C., Waal, N., Offner, T., Fornasiero, E. F., Wender, N., Verbarq, H., Manzini, I., Trenkwalder, C., Mollenhauer, B., Strohäker, T., Zweckstetter, M., Becker, S., Rizzoli, S. O., Basmanav, F. B., & Opazo, F. (2020). A nanobody-based fluorescent reporter reveals human α -synuclein in the cell cytosol. *Nature Communications*, 11(1), 2729. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16575-0>
17. Gertz, M. A., Aras, M. A., Bart, N., Brannagan, T. H., Griffin, J. M., Kontorovich, A. R., & Rosen, A. M. (2025). Unravelling the myriad physiologic roles of transthyretin: Critical considerations for treating transthyretin amyloidosis. *Annals of Medicine*, 57(1), 2536755. <https://doi.org/10.1080/07853890.2025.2536755>
18. Gião, T., Saavedra, J., Cotrina, E., Quintana, J., Llop, J., Arsequell, G., & Cardoso, I. (2020). Undiscovered Roles for Transthyretin: From a Transporter Protein to a New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2075. <https://doi.org/10.3390/ijms21062075>
19. Gonzalez-Duarte, A., & Ulloa-Aguirre, A. (2021). A Brief Journey through Protein Misfolding in Transthyretin Amyloidosis (ATTR Amyloidosis). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13158. <https://doi.org/10.3390/ijms222313158>
20. González-López, E., López-Sainz, Á., & Garcia-Pavia, P. (2017). Diagnosis and Treatment of Transthyretin Cardiac Amyloidosis. Progress and Hope. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 70(11), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.05.036>
21. Gonzalez-Lopez, E., Maurer, M. S., & Garcia-Pavia, P. (2025). Transthyretin amyloid cardiomyopathy: A paradigm for advancing precision medicine. *European Heart Journal*, 46(11), 999–1013. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehae811>
22. Gooran, N., & Kopra, K. (2024). Fluorescence-Based Protein Stability Monitoring—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1764. <https://doi.org/10.3390/ijms25031764>
23. Grzybowski, J., Podolec, P., Holcman, K., Gawor-Prokopczyk, M., Jankowska, E., Kostkiewicz, M., Dąbrowska-Kugacka, A., Lipowska, M., Mazurkiewicz, Ł., Rajtar-Salwa, R., Rubiś, P., Straburzyńska-Migaj, E., Szczygiel, J., & Mitkowski, P. (2023). Diagnosis and treatment of transthyretin amyloidosis cardiomyopathy: A position statement of the Polish Cardiac Society. *Kardiologia Polska*, 81(11), 1167–1185. <https://doi.org/10.33963/v.kp.97648>
24. Hammarström, P. (2024). The Transthyretin Protein and Amyloidosis – An Extraordinary Chemical Biology Platform. *Israel Journal of Chemistry*, 64(12), e202300164. <https://doi.org/10.1002/ijch.202300164>
25. He, S., He, X., Liu, L., Zhang, W., Yu, L., Deng, Z., Feiyi, Z., Mo, S., Fan, Y., Zhao, X., Wang, L., Wang, C., & Zhang, S. (2021). The Structural Understanding of Transthyretin Misfolding and the Inspired Drug Approaches for the Treatment of Heart Failure Associated With Transthyretin Amyloidosis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 628184. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628184>
26. Hsueh, H.-W., Chao, C.-C., Chang, K., Jeng, Y.-M., Katsuno, M., Koike, H., & Hsieh, S.-T. (2022). Unique Phenotypes With Corresponding Pathology in Late-Onset Hereditary Transthyretin Amyloidosis of A97S vs. V30M. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 786322. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.786322>

27. Hughes, M. L., & Dougan, L. (2016). The physics of pulling polypeptides: A review of single molecule force spectroscopy using the AFM to study protein unfolding. *Reports on Progress in Physics*, 79(7), 076601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/79/7/076601>
28. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., & Radford, S. E. (2018). A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(12), 755–773. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0060-8>
29. Kapoor, M., Rossor, A. M., Laura, M., & Reilly, M. M. (2019). Clinical Presentation, Diagnosis and Treatment of TTR Amyloidosis. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 6(2), 189–199. <https://doi.org/10.3233/JND-180371>
30. Khan, M. F., Rahman, M. M., Xin, Y., Mustafa, A., Smith, B. J., Ottemann, K. M., & Roujeinikova, A. (2024). Determination of Protein–Ligand Binding Affinities by Thermal Shift Assay. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 7(10), 3096–3107. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.4c00293>
31. Kim, S. H., Yoo, H. J., Park, E. J., & Na, D. H. (2021). Nano Differential Scanning Fluorimetry-Based Thermal Stability Screening and Optimal Buffer Selection for Immunoglobulin G. *Pharmaceuticals*, 15(1), 29. <https://doi.org/10.3390/ph15010029>
32. Koike, H., & Katsuno, M. (2020). Transthyretin Amyloidosis: Update on the Clinical Spectrum, Pathogenesis, and Disease-Modifying Therapies. *Neurology and Therapy*, 9(2), 317–333. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00210-7>
33. Koike, H., Okumura, T., Murohara, T., & Katsuno, M. (2021). Multidisciplinary Approaches for Transthyretin Amyloidosis. *Cardiology and Therapy*, 10(2), 289–311. <https://doi.org/10.1007/s40119-021-00222-w>
34. Kushwah, V. C., Chauhan, R., & Dhaked, R. K. (2024). Fluorescence Thermal Shift Assay based High Through-put Screening in Small Molecule Drug Discovery: A Brief Overview. *Journal of Modern Biology and Drug Discovery*, 3, 3. <https://doi.org/10.53964/jmbdd.2024003>
35. Leung, N., & Nasr, S. H. (2024). 2024 Update on Classification, Etiology, and Typing of Renal Amyloidosis: A Review. *American Journal of Kidney Diseases*, 84(3), 361–373. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2024.01.530>
36. Lim, K. H., Dyson, H. J., Kelly, J. W., & Wright, P. E. (2013). Localized Structural Fluctuations Promote Amyloidogenic Conformations in Transthyretin. *Journal of Molecular Biology*, 425(6), 977–988. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.008>
37. Liu, Y., Yen, Y., Ricardo, F., Chang, Y., Wu, P., Huang, S., Lin, K., & Yu, T. (2019). Biophysical characterization and modulation of Transthyretin Ala97Ser. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 6(10), 1961–1970. <https://doi.org/10.1002/acn3.50887>
38. Liz, M. A., Coelho, T., Bellotti, V., Fernandez-Arias, M. I., Mallaina, P., & Obici, L. (2020). A Narrative Review of the Role of Transthyretin in Health and Disease. *Neurology and Therapy*, 9(2), 395–402. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00217-0>
39. Magalhães, J., Eira, J., & Liz, M. A. (2021). The role of transthyretin in cell biology: Impact on human pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(17–18), 6105–6117. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03899-3>
40. Magalhães, P., & Lashuel, H. A. (2022). Opportunities and challenges of alpha-synuclein as a potential biomarker for Parkinson’s disease and other synucleinopathies. *Npj Parkinson’s Disease*, 8(1), 93. <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00357-0>
41. Main, K. H. S., Provan, J. I., Haynes, P. J., Wells, G., Hartley, J. A., & Pyne, A. L. B. (2021). Atomic force microscopy—A tool for structural and translational DNA research. *APL Bioengineering*, 5(3), 031504. <https://doi.org/10.1063/5.0054294>

42. Margolin, E., Stern, L. K., Argiro, A., Rosenthal, J. L., Urey, M. A., & Alexander, K. M. (2025). Current and Future Treatment Landscape of Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *Cardiology and Therapy*, 14(3), 385–401. <https://doi.org/10.1007/s40119-025-00424-6>
43. Müller, D. J., Dumitru, A. C., Lo Giudice, C., Gaub, H. E., Hinterdorfer, P., Hummer, G., De Yoreo, J. J., Dufrêne, Y. F., & Alsteens, D. (2021). Atomic Force Microscopy-Based Force Spectroscopy and Multiparametric Imaging of Biomolecular and Cellular Systems. *Chemical Reviews*, 121(19), 11701–11725. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00617>
44. Nečas, D., & Klapetek, P. (2012). Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. *Open Physics*, 10(1). <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2>
45. Nguyen, B. A., Afrin, S., Yakubovska, A., Singh, V., Pedretti, R., Bassett, P., Pekala, M., Alicea, J. V., Kunach, P., Wang, L., Lemoff, A., Kluve-Beckerman, B., & Saelices, L. (2024). ATTRv-V30M amyloid fibrils from heart and nerves exhibit structural homogeneity. *Structure*, 32(12), 2244–2250.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2024.09.021>
46. Ovung, A., & Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: Structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*, 13(2), 259–272. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>
47. Poli, L., Labella, B., Cotti Piccinelli, S., Caria, F., Risi, B., Damioli, S., Padovani, A., & Filosto, M. (2023). Hereditary transthyretin amyloidosis: A comprehensive review with a focus on peripheral neuropathy. *Frontiers in Neurology*, 14, 1242815. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1242815>
48. Porcari, A. (n.d.). *Transthyretin cardiac amyloidosis*.
49. *Protein Science—2020—Kotov—In-depth interrogation of protein thermal unfolding data with MoltenProt.pdf*. (n.d.).
50. Ritsch, I., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2024). *Aggregation of Transthyretin by Fluid Agitation*. <https://doi.org/10.1101/2024.11.08.622726>
51. Ruberg, F. L., Grogan, M., Hanna, M., Kelly, J. W., & Maurer, M. S. (2019). Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(22), 2872–2891. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.04.003>
52. Ruberg, F. L., & Maurer, M. S. (2024). Cardiac Amyloidosis Due to Transthyretin Protein: A Review. *JAMA*, 331(9), 778. <https://doi.org/10.1001/jama.2024.0442>
53. Ruggeri, F. S. (2019). Atomic force microscopy for single molecule characterisation of protein aggregation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
54. Saelices, L., Chung, K., Lee, J. H., Cohn, W., Whitelegge, J. P., Benson, M. D., & Eisenberg, D. S. (2018). Amyloid seeding of transthyretin by ex vivo cardiac fibrils and its inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1805131115>
55. Saelices, L., Johnson, L. M., Liang, W. Y., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ruchala, P., Whitelegge, J., Jiang, L., Riek, R., & Eisenberg, D. S. (2015). Uncovering the Mechanism of Aggregation of Human Transthyretin. *Journal of Biological Chemistry*, 290(48), 28932–28943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659912>
56. Sakalauskas, A., Ziaunys, M., Snieckute, R., Janonienė, A., Veiveris, D., Zvirblis, M., Dudutiene, V., & Smirnovas, V. (2023). The Major Components of Cerebrospinal Fluid Dictate the Characteristics of Inhibitors against Amyloid-Beta Aggregation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5991. <https://doi.org/10.3390/ijms24065991>
57. Sanguinetti, C., Minniti, M., Susini, V., Caponi, L., Panichella, G., Castiglione, V., Aimo, A., Emdin, M., Vergaro, G., & Franzini, M. (2022). The Journey of Human Transthyretin:

- Synthesis, Structure Stability, and Catabolism. *Biomedicines*, *10*(8), 1906. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081906>
58. Schmidt, M., Wiese, S., Adak, V., Engler, J., Agarwal, S., Fritz, G., Westermarck, P., Zacharias, M., & Fändrich, M. (2019). Cryo-EM structure of a transthyretin-derived amyloid fibril from a patient with hereditary ATTR amyloidosis. *Nature Communications*, *10*(1), 5008. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13038-z>
 59. Song, S.-J., Diao, H.-P., Moon, B., Yun, A., & Hwang, I. (2022). The B1 Domain of Streptococcal Protein G Serves as a Multi-Functional Tag for Recombinant Protein Production in Plants. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 878677. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.878677>
 60. Steinebrei, M., Gottwald, J., Baur, J., Röcken, C., Hegenbart, U., Schönland, S., & Schmidt, M. (2022). Cryo-EM structure of an ATTRwt amyloid fibril from systemic non-hereditary transthyretin amyloidosis. *Nature Communications*, *13*(1), 6398. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33591-4>
 61. Triposkiadis, F., Briasoulis, A., Starling, R. C., Magouliotis, D. E., Kourek, C., Zakynthinos, G. E., Iliodromitis, E. K., Paraskevaidis, I., & Xanthopoulos, A. (2025). Hereditary transthyretin amyloidosis (ATTRv). *Current Problems in Cardiology*, *50*(4), 103019. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2025.103019>
 62. Tschöpe, C., & Elsanhoury, A. (2022). Treatment of Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy: The Current Options, the Future, and the Challenges. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(8), 2148. <https://doi.org/10.3390/jcm11082148>
 63. Ueda, M. (2022). Transthyretin: Its function and amyloid formation. *Neurochemistry International*, *155*, 105313. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105313>
 64. Wanniarachchige, D., Khan, S., & Pan, S. (2025). Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy Treatment: An Updated Review. *Journal of Clinical Medicine*, *14*(17), 6089. <https://doi.org/10.3390/jcm14176089>
 65. Wiczorek, E., & Ożyhar, A. (2021). Transthyretin: From Structural Stability to Osteoarticular and Cardiovascular Diseases. *Cells*, *10*(7), 1768. <https://doi.org/10.3390/cells10071768>
 66. Yamamoto, N., Morishima, K., Inoue, R., Sugiyama, M., & Chatani, E. (2026). Cryo-EM visualization of partial β -sheet formation in curved transthyretin protofibrils resistant to amyloid fibril formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1874*(4), 141143. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2026.141143>
 67. You, M., Zhang, X., Zhang, Y., Sun, J., Sha, Q., Wang, M., Zhang, H., Shen, D., Zhang, Y., Wang, N., Liu, Y., & Liu, Y. (2025). Impact of mechanical stress on human transthyretin protein amyloid formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *318*, 145291. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145291>
 68. Žvirblis, M., Sakalauskas, A., Ali Janvand, S. H., Dudutienė, V., Žiaunys, M., Sniečkutė, R., Otzen, D. E., Smirnovas, V., & Matulis, D. (2024). Structure-Activity Relationship of Fluorinated Benzenesulfonamides as Inhibitors of Amyloid- β Aggregation. *Chemistry – A European Journal*, *30*(58), e202402330. <https://doi.org/10.1002/chem.202402330>

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS

CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

ARŪNĖ JOCYTĖ

Transtiretino patogeninių variantų V30M ir A97S agregacijos tyrimas

Transtiretinas (TTR) yra tetramerinis transportinis baltymas, randamas kraujo plazmoje ir smegenų skystyje. Jis daugiausia sintetinamas kepenyse, taip pat gyslainės rezginyje ir tinklainės pigmentiniame epitelyje. TTR perneša skydliaukės hormoną tiroksiną (T4) bei retinolį (vitaminą A), susijungusį su retinolį surišančiu baltymu.

Transtiretino amiloidozės (TTRA) metu TTR amiloidės fibrilės kaupiasi įvairiuose organuose ir audiniuose, sukeldamos ligas (dažniausiai amiloidinę polineuropatiją ir kardiomiopatiją) ir pacientų mirtį. Transtiretino amiloidozė skirstoma į dvi pagrindines formas: paveldimą transtiretino amiloidozę (pTTRA) ir laukinio tipo transtiretino amiloidozę (wtTTRA). Paveldimą formą lemia TTR geno mutacijos, o laukinio tipo forma yra susijusi su senėjimu ir išsivysto dėl laukinio tipo TTR kaupimosi.

Šiame darbe siekiama įvertinti transtiretino patogeninių variantų V30M ir A97S išsivyniojimo temperatūrą bei ištirti jų agregacijos sąlygas. Kadangi transtiretino amiloidozė šiuo metu yra neišgydoma, o taikomi gydymo metodai tik lėtina ligos progresavimą, svarbu ieškoti naujų junginių, galinčių padidinti gydymo veiksmingumą.

Tyrimo metu TTR variantai V30M ir A97S buvo išgryninti taikant imobilizuotų metalo jonų afininės bei gelfiltracijos chromatografijos metodus. Baltymų stabilumas vertintas nustatant jų išsivyniojimo temperatūrą, taikant nano diferencinio skenavimo fluorimetrijos metodą. Nustatyta, kad TTR A97S variantas pasižymi didesniu stabilumu nei TTR V30M. Taip pat ištirta, jog atrinkti sulfonamidiniai junginiai neturėjo reikšmingos įtakos TTR variantų stabilumui. Be to, keičiant agregacijos sąlygas, atominės jėgos mikroskopu išrinktos agregacijos sąlygos.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY

FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

ARŪNĖ JOCYTĖ

Aggregation Study of Transthyretin Pathogenic Variants V30M and A97S

Transthyretin (TTR) is a tetrameric transport protein found in blood plasma and cerebrospinal fluid. It is primarily synthesized in the liver, as well as in the choroid plexus and the retinal pigment epithelium. TTR transports the thyroid hormone thyroxine (T₄) and retinol (vitamin A) bound to retinol-binding protein.

In transthyretin amyloidosis (TTRA), TTR amyloid fibrils accumulate in various organs and tissues, causing disease (most commonly amyloid polyneuropathy and cardiomyopathy) and death in patients. Transthyretin amyloidosis is classified into two main forms: hereditary transthyretin amyloidosis (pTTRA) and wild-type transthyretin amyloidosis (wtTTRA). The hereditary form is caused by mutations in the TTR gene, while the wild-type form is associated with aging and develops due to the accumulation of wild-type TTR.

This study aims to evaluate the melting temperatures of the transthyretin pathogenic variants V30M and A97S to investigate their aggregation conditions. Since transthyretin amyloidosis is currently incurable and existing treatments only slow the progression of the disease, it is important to search for new compounds that could increase the effectiveness of treatment.

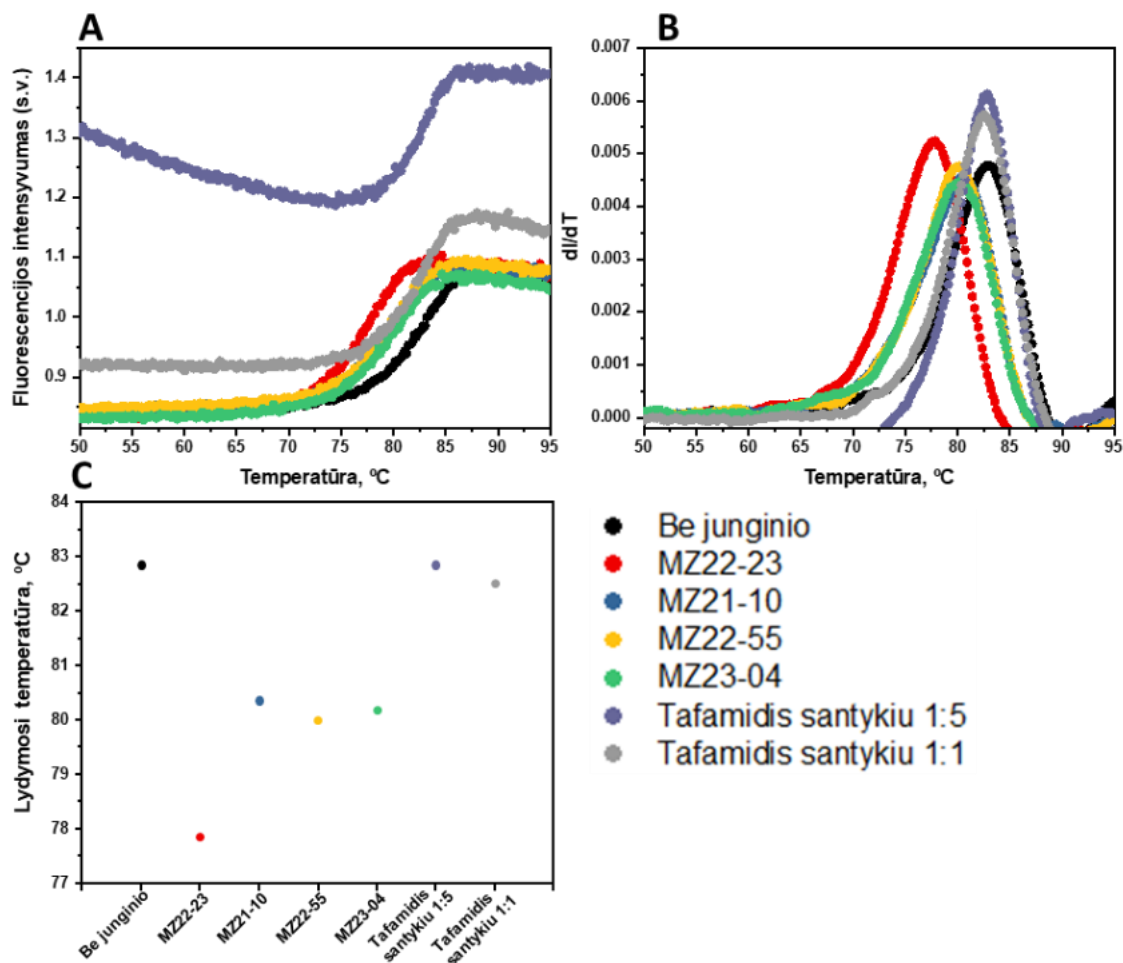
During the study, the TTR variants V30M and A97S were purified using immobilized metal ion affinity and gel filtration chromatography. Protein stability was assessed by determining their melting temperatures using nano-differential scanning fluorimetry. It was found that the TTR A97S variant exhibits greater stability than TTR V30M. It was also found that the selected sulfonamide compounds had no significant effect on the stability of the TTR variants. Furthermore, by varying the aggregation conditions, the aggregation conditions were identified using an atomic force microscopy.

PRIEDAI

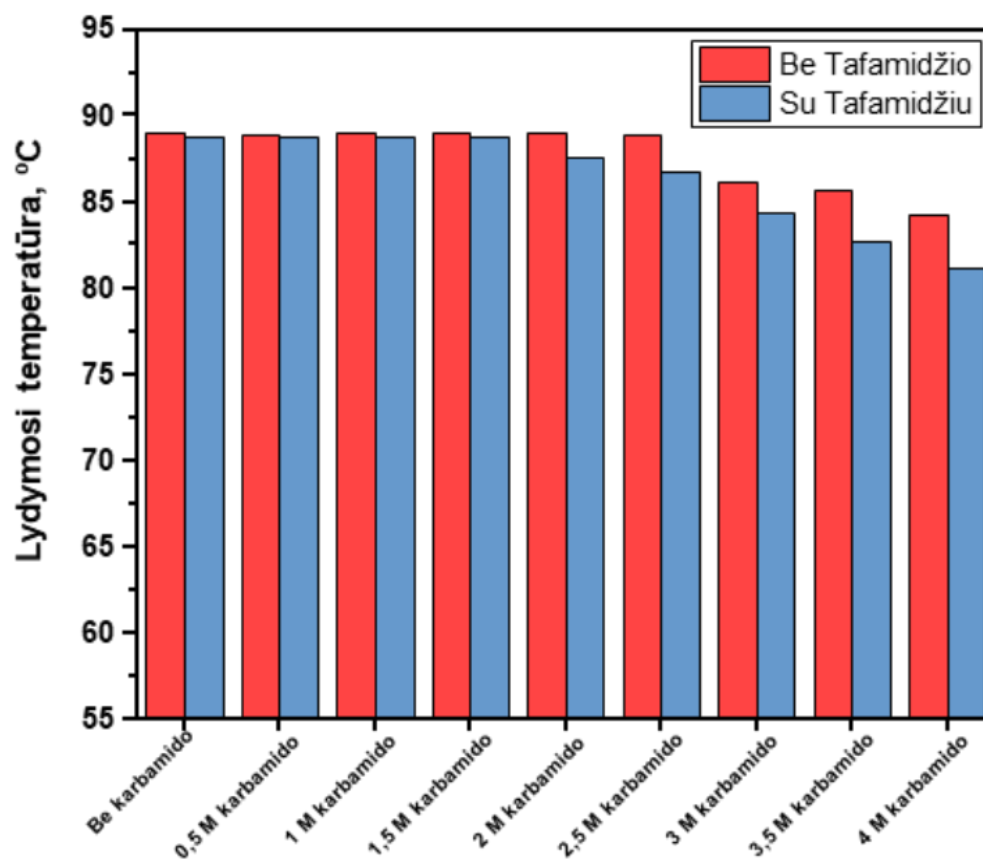
1 priedas. Atrinkti sulfonamidiniai junginiai.

Junginio trumpinys	Cheminė formulė
MZ22-23	
MZ21-10	
MZ22-55	
MZ23-04	

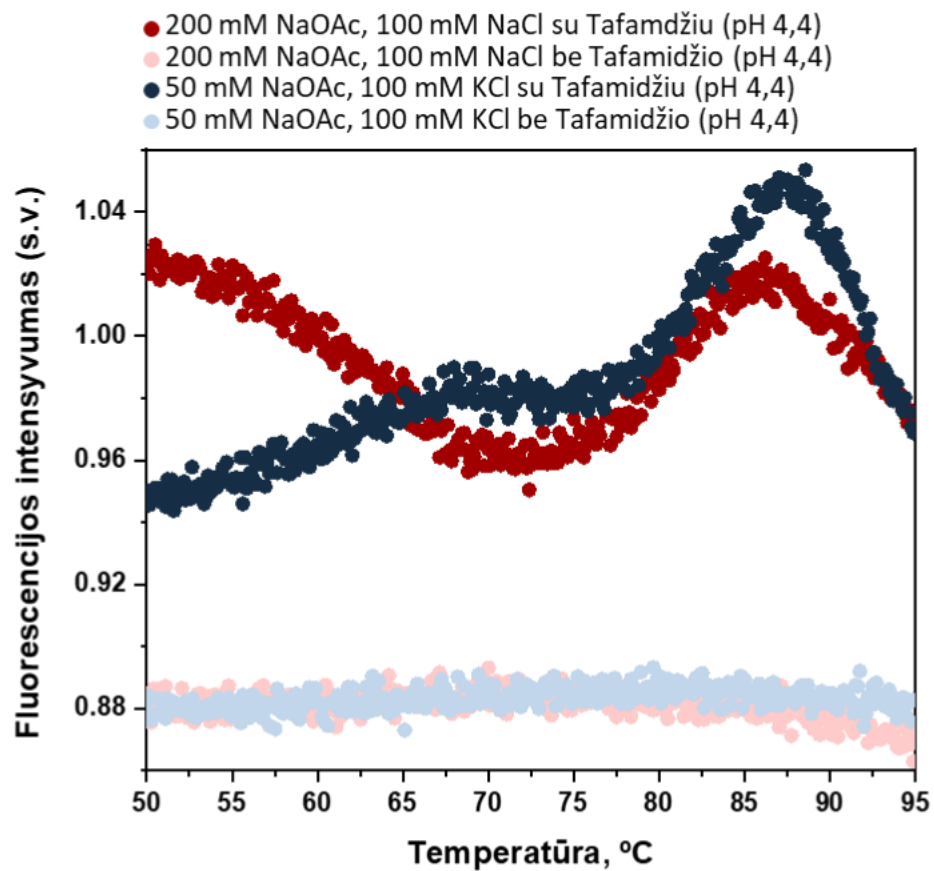
2 priedas. A dalis. Fluorescencijos intensyvumo pokytis, didinat temperatūrą; **B dalis.** Fluorescencijos intensyvumo pokyčio išvestinė, didinat temperatūrą; **C Dalis.** TTR V30M baltymo išsivyniojimo temperatūros (T_m) priklausomybė nuo sulfonamidinių junginių poveikio (4 M karbamido sąlygose).



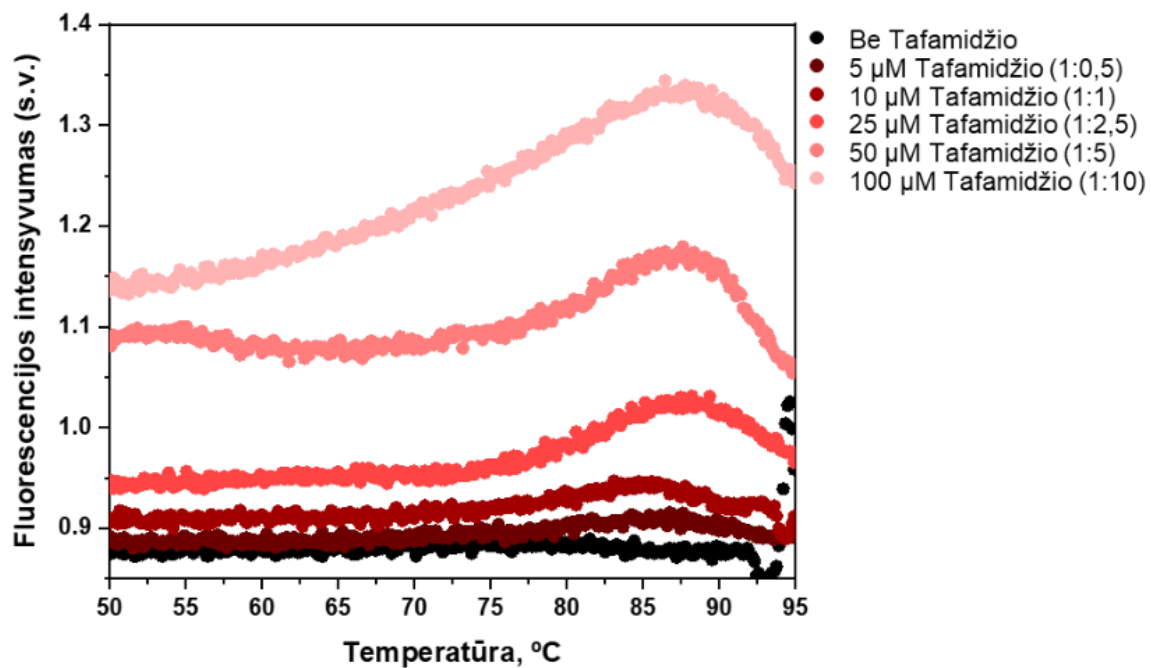
3 priedas. TTR V30M baltymo išsivyniojimo temperatūros (T_m) priklausomybė nuo karbamido koncentracijos (nuo 0,5 iki 4 M).



4 priedas. TTR V30M baltymo išsivyniojimo temperatūros (T_m) priklausomybė nuo skirtingų tirpalų (B1 ir B2 tirpalai) su ir be Tafamidžio pH 4,4.



5 priedas. TTR V30M baltymo išsivyniojimo temperatūros (T_m) priklausomybė nuo Tafamidžio koncentracijos (naudojamas B1 tirpalas).



6 priedas. A Dalis. ANS dažo fluorescencijos intensyvumo duomenys; **B Dalis.** Fluorescencijos intensyvumo pokyčio pirminės išvestinės, matuojant TTR V30M baltymo stabilumą su skirtingomis ANS koncentracijomis (50, 100 μM), pH 4,4 ir 7,4 bei su ir be Tafamidžio.

