Vilniaus universitetas
Chemijos ir geomokslų fakultetas

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė

Greta Musteikytė

Rekombinantinės žmogaus superoksido dismutazės I gryninimas ir agregacijos tyrimai

Bakalauro darbas

Darbo vadovas:
Dr. Vytautas Smirnovas

Konsultantas:
Tomas Šneideris

Vilnius, 2017

Bakalauro darbas

Rekombinantinės žmogaus superoksido dismutazės I gryninimas ir agregacijos tyrimai

Darbas paruoštas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Studentas:

Greta Musteikytė _____

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas Smirnovas _____

Konsultantas:

Tomas Šneideris _____

Vilnius, 2017

Turinys

Santrumpos **3**

Įvadas **4**

1. Literatūros apžvalga **5**
1.1. Neurodegeneracinės ligos . . . 5
1.2. Amiotrofinė lateralinė sklerozė . . . 5
1.2.1. Požymiai . . . 6
1.2.2. Priežastys . . . 6
1.2.3. Rizikos veiksniai . . . 7
1.3. Superoksido dismutazės . . . 8
1.3.1. *Mn ir Fe* SOD . . . 9
1.3.2. *Ni* SOD . . . 9
1.3.3. *Cu, Zn* SOD . . . 9
1.4. Amiloidinių baltymų agregacijos mechanizmai . . . 10
1.4.1. Bendras agregacijos mechanizmas . . . 12
1.4.2. SOD1 mutantų ir agregatų toksiškumas . . . 14
1.5. Agregacijos slopikliai . . . 16
1.6. Amiloidinių baltymų funkcijos . . . 18

2. Medžiagos ir metodai **20**
2.1. Medžiagos ir laboratorinė įranga . . . 20
2.1.1. Medžiagos . . . 20
2.1.2. Laboratorinė įranga . . . 20
2.1.3. Konstruktas . . . 21
2.1.4. Kompetentinės ląstelės . . . 21
2.1.5. Mitybinės terpės . . . 22
2.1.6. Tirpalai . . . 22
2.2. Metodai . . . 22
2.2.1. Plazmidinės DNR transformacija . . . 22
2.2.2. Tikslinio baltymo sintezė . . . 23
2.2.3. Baltymų elektroforezė . . . 23
2.2.4. Baltymo gryninimas . . . 23
2.2.5. Baltymo koncentracijos nustatymas . . . 24
2.2.6. Baltymo lydymosi temperatūros nustatymas . . . 24
2.2.7. Amiloidinių fibrilių gamyba . . . 25
2.2.8. Agregacijos kinetikos tyrimai . . . 25
2.2.9. Atominės jėgos mikroskopija . . . 25

2.2.10. Duomenų apdorojimas 25

3. Rezultatai ir jų aptarimas **27**

3.1. *E. coli* kultūros auginimo sąlygų optimizavimas SOD1 baltymo sintezei ir baltymo gryninimas 27

3.1.1. *E. coli* kultūros auginimo sąlygų optimizavimas 27

3.1.2. SOD1 gryninimas 28

3.1.3. Išgrynintos SOD1 kokybės kontrolė 28

3.2. Agregacijos sąlygų optimizavimas 30

3.2.1. Spontaninės agregacijos sąlygų optimizavimas 30

3.2.2. Agregacijos kinetikos sąlygų optimizavimas 31

3.3. Slopiklių įtaka SOD1 agregacijos kinetikai 33

3.3.1. Flavonų įtaka 34

3.3.2. EGCG įtaka 37

3.3.3. Metileno mėlio įtaka 38

3.3.4. Etanolio įtaka 39

4. Išvados **42**

Santrauka **43**

Summary **44**

Literatūros sąrašas **52**

Priedas

Santrumpos

AA/BAA – Akrilamidas/bisakrilamidas
AFM – Atominės jėgos mikroskopija (angl. *Atomic force microscopy*)
ALS – Amiotrofinė lateralinė (šoninė) sklerozė
ANS – 8-anilinonaftalen-1-sulfoninė rūgštis
apo^{SH} – Apofermentas su redukuotais disulfidiniais tilteliais
APS – Amonio persulfatas
C9ORF72 – 9 chromosomos 72 atviro skaitymo rėmelis
CCS – SOD1 vario šaperonas (angl. *Copper Chaperone for SOD1*)
DMSO – Dimetilsulfoksidas
DSF – Diferencinė skanavimo fluorimetrija
DTT – Ditiotreitolis
EAAT2 – Aminorūgščių-neuromediatorių nešiklis (angl. *Excitatory Amino Acid Transporters*)
EGCG – Epigalokatechin-3-galatas
fALS – Paveldima amiotrofinė lateralinė sklerozė
FTD – Frontotemporalinė demencija
FUS – FUS baltymas (angl. *Fused In Sarcoma*)
IAPP – Amilinas (angl. *Islet Amyloid Polypeptide*)
IPTG – Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozidas
MES – 2-(N-morfolino)etano sulfoninė rūgštis
NDS – Natrio dodecilsulfatas
OT – Optinis tankis
PDB – Baltymų 3D struktūrų duomenų bankas (angl. *Protein Data Bank*)
ROS – Reaktyviosios deguonies formos (angl. *Reactive Oxygen Species*)
S.O.C – S.O.C terpė (angl. *Super Optimal Broth*)
sALS – Spontaninė (sporadinė) amiotrofinė lateralinė sklerozė
SOD1, hSOD1 – žmogaus Cu, Zn superoksido dismutazė
T_m – Lydymosi temperatūra
TDP-43 – TAR DNR rišantis baltymas (angl. *TAR DNA-Binding Protein*)
TEMED – Tetrametiletilendiaminas
ThT – Tioflavinas T
tPA – audinių plazminogeno aktyvatorius (angl. *Tissue-type Plasminogen Activator*)
TRIS – Tris(hidroksimetil)aminometanas
TTR – Transtiretinas

Įvadas

Neurodegeneracinės ligos – nervų sistemos ligos, tokios kaip Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono, taip pat prioninės ligos, kurių metu pažeidžiamos nervinės ląstelės ir pasireiškia nervų sistemos veiklos – atminties, kalbos, judesių, mąstymo sutrikimai.

Viena iš tokių ligų yra amiotrofinė lateralinė sklerozė (ALS), kuriai vystantis pažeidžiami ir žūsta motoriniai neuronai. Nuo ligos požymių atsiradimo pacientai išgyvena vos 3–5 metus, kol palaipsniui visą organizmą apima paralyžius ir žmogus miršta (Peters ir Brown Jr, 2015). Vaistų, visiškai išgydančių nuo ALS kenčiančius pacientus, nėra. Vienintelis preparatas, skiriamas tokiems ligoniams, yra riluzolas (Miller et al., 2012), kuris tik pailgina gyvenimo trukmę keletu mėnesių. ALS priežastis – netirpių baltyminių agregatų (amiloidų) susidarymas nervinėse ląstelėse ir užląstelinėje erdvėje. Šie agregatai pasižymi β klostytų struktūrų gausa, daliniu atsparumu daugumai proteazių, yra nesuardomi ląstelės baltymų degradacijos sistemų pagalba bei jungia amiloidiniams dariniams specifinius dažus. Vienas iš dažniausiai su ALS siejamų baltymų – Cu, Zn superoksido dismutazė (SOD1), kuri ir yra šio bakalaurinio darbo tyrimo objektas.

Remiantis statistika, ALS suserga vidutiniškai 1,9 iš 100 000 žmonių. 2015 m. sirgo 222 801 pacientas ir manoma, kad ligonių skaičius 2040 m. padidės iki 376 674 (Arthur et al., 2016). Priežastimi nurodomas visuomenės senėjimas besivystančiose šalyse (Arthur et al., 2016). Kadangi visuomenės senėjimas yra neišvengiamas ateityje, kyla didelis mokslinės bendruomenės susidomėjimas ALS bei kitomis amiloidinėmis ligomis. Šiuo metu yra žinoma keliolika baltymų, kurių agregacija siejama su ALS (Peters ir Brown Jr, 2015). Tačiau nėra aiškūs ligos rizikos faktoriai, tikslūs agregacijos mechanizmai, taip pat yra intensyviai ieškoma amiloidinės agregacijos slopiklių.

Norint tirti konkretaus amiloidinio baltymo agregaciją ir įvairių medžiagų poveikį šiam procesui laboratorijos sąlygomis, pirmiausia reikia turėti pakankamą kiekį baltymo. Taip pat reikia optimizuoti sąlygas greitai agregacijos kinetikai stebėti, kad visas procesas įvyktų per priimtiną laiką. Turint baltymo ir žinant šias sąlygas, galima tirti įvairių medžiagų poveikį agregacijos procesui. Remiantis šiais pastebėjimais, darbui su naujai gautu baltymu laboratorijoje suformuluojami **uždaviniai:**

1. Optimizuoti *E.coli* kultūros auginimo sąlygas tikslinio baltymo gryninimui.
2. Išgryninti rekombinantinę žmogaus Cu, Zn superoksido dismutazę.
3. Optimizuoti amiloidinių fibrilių gavimo ir agregacijos kinetikos tyrimo sąlygas.
4. Atlikti SOD1 agregacijos eksperimentus su potencialiais agregacijos slopikliais.

Viso darbo tikslas – ištirti potencialių agregacijos slopiklių įtaką hSOD1 agregacijai.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Neurodegeneracinės ligos

Neurodegeneracinės ligos – lėtinės nervų sistemos ligos, kurių bendras požymis – amiloidinių baltymų agregatų kaupimasis nervinėse ląstelėse ir už jų ribų. Dažniausiai pasireiškia vyresnio amžiaus žmonėms. Pacientai patiria atminties, kalbos, suvokimo, elgsenos, judėjimo sutrikimus. Šie požymiai susiję su nervinių ląstelių žūtimi ar veiklos sutrikimu jose kaupiantis netirpiems baltymų agregatams. Vienos labiausiai paplitusių ir ištyrinėtų yra Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono ligos, su kuriomis siejami atitinkamai amiloidas β, α sinukleinas ir hantingtinas (Stroo et al., 2017). Be paminėtų egzistuoja ir daugybė kitų sutrikimų, susijusių su amiloidiniais baltymais (1 lentelė).

1 lentelė. Amiloidinių baltymų sukeliamos ligos (pagal Stroo et al. (2017))

Liga	**Baltymas**	**Pažeidžiama nervų sistemos dalis**
Alzheimerio liga	Amiloidas β, τ baltymas	Smegenų žievė, Amono ragas (lot. *Hippocampus*)
Hantingtono liga	Hantingtinas	Dryžuotasis kūnas (lot. *Corpus Striatum*)
Parkinsono liga	α sinukleinas	Tamsioji medžiaga (lot. *Substantia Nigra*)
Demencija su Levi kūneliais	α sinukleinas	Smegenų žievė, Amono ragas (lot. *Hippocampus*)
Frontotemporalinė demencija	τ baltymas	Kaktinė ir smilkininė smegenų žievė
Prioninės ligos	Prioniniai baltymai	Galvos ir nugaros smegenys
Amiotrofinė lateralinė sklerozė	SOD, FUS, TDP-43	Motoriniai neuronai

1.2. Amiotrofinė lateralinė sklerozė

Amiotrofinė lateralinė (šoninė) sklerozė, dar vadinama Lu Gerigo liga (*Lou Gehrig's disease*) arba Šarko (*Charcot*) liga - neurodegeneracinė liga, kuria sergant žūsta viršutiniai ir apatiniai motoriniai neuronai. Pirmąkart pastebėta dar 1830 m. Čarlzo Belo (*Charles Bell*), tačiau išsamiai aprašyta prancūzų neurologo Žano Martino Šarko (*Jean-Martin Charcot*) 1874 m. JAV susidomėjimas šia liga kilo XX a., kai žymus beisbolo žaidėjas Lu Gerigas 1939 m. dėl jos buvo priverstas nutraukti karjerą. Tuo tarpu pasaulyje apie ligą plačiau imta kalbėti tik 1963 m., ja susirgus anglų fizikui Stivenui Hokingui (*Stephen Hawking*) (Katz, 2015). ALS dažniausiai paveikia senyvo amžiaus, vyresnius

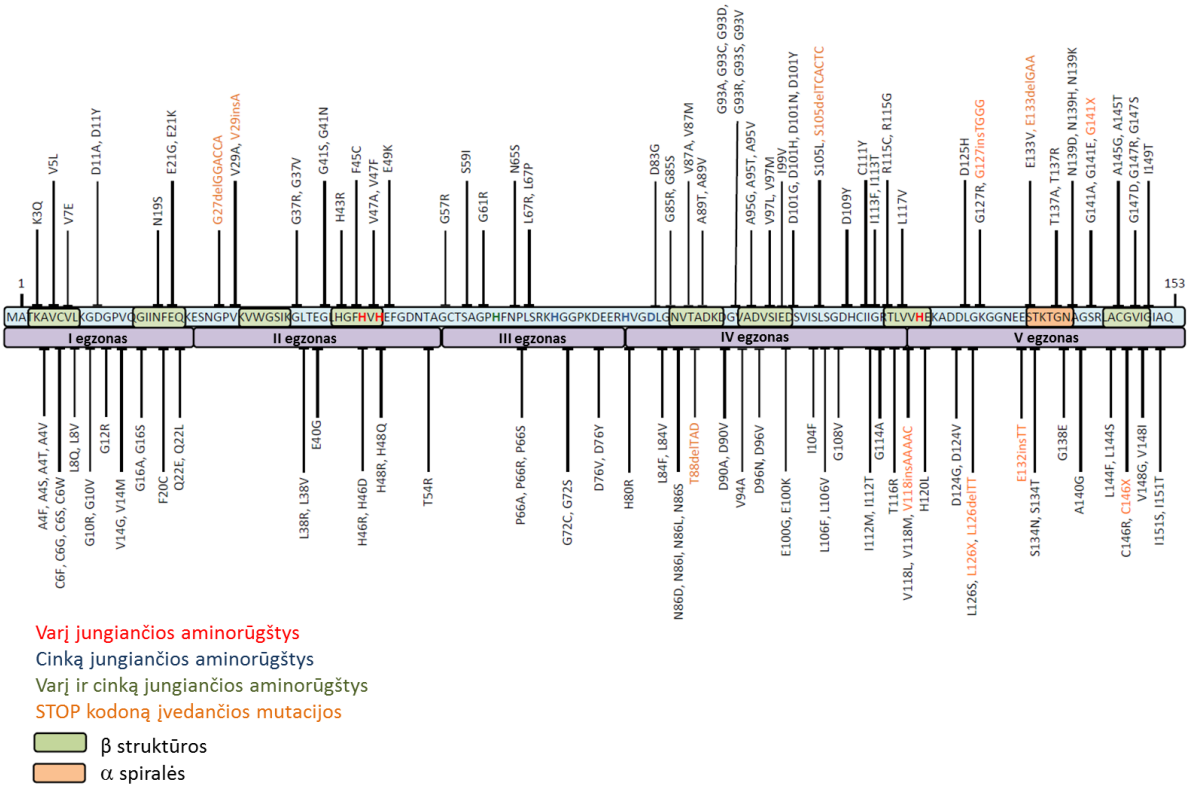
nei 50 m. žmones, tačiau tikimybė susirgti egzistuoja visu gyvenimo laikotarpiu. 90 % atvejų ALS susergama spontaniškai (sporadinė ALS, sALS) dėl nežinomų priežasčių, tuo tarpu likusiuose 10 % atvejų liga paveldima genetiškai, autosominiu dominantiniu būdu (paveldima ALS, fALS). Nuo pirmųjų ALS požymių pasireiškimo iki mirties dažniausiai praeina 3–5 metai (Peters ir Brown Jr, 2015).

1.2.1. Požymiai

Pirmieji ALS požymiai - sunkumas atlikti valingus raumenų judesius. Tai pasireiškia sunkumu vaikščioti, kalbėti, atlikti kasdienius darbus. Ligai progresuojant, atrofuojasi nemankštinami raumenys, pasireiškia nuovargis, dažnėja mėšlungis, žmogus paralyžuojamas. Paskutinėje stadijoje tampa sunku ryti, kvėpuoti ir galiausiai ligonis miršta. Įdomu tai, kad ALS paveikia tik motorinius neuronus - dažnai žmogaus intelektas, mąstymas, asmenybė išlieka nepakitę (Zarei et al., 2015), tačiau yra atvejų, kai pasireiškia gimininginų ligų, pavyzdžiui, frontotemporalinės demencijos (FTD), požymiai (Mathis et al., 2017; Peters ir Brown Jr, 2015). Ligoniams su pasireiškusiais FTD požymiais būdingas impulsyvumas, nuotaikų kaita, kalbos, mąstymo funkcijų sutrikimas. Seniau buvo manyta, kad ALS vystosi individualiuose neuronuose. Tačiau tyrimai parodė, kad ALS patogenezei įtakos turi ir vyksmai kaimyninėse glijos ląstelėse (Maniecka ir Polymenidou, 2015; Peters ir Brown Jr, 2015). Tai reiškia, kad liga yra kompleksinė ir negalima jos priežasčių sieti su vienu ląstelių tipu ar baltymu.

1.2.2. Priežastys

Šiuo metu nustatyta virš 30 genų, atsakingų už ALS požymių atsiradimą. SOD1 buvo pirmasis baltymas, 1993 m. identifikuotas kaip ALS sukėlėjas (Rosen et al., 1993). Sergančių žmonių nervinių ląstelių agregatų sudėtyje randama tiek laukinio tipo, tiek mutantinės formos SOD1 (šiuo metu žinoma daugiau kaip 160 mutacijų *SOD1* gene, susijusių su ALS - 1.1 pav.). Plačiau apie SOD1 baltymą rašoma 1.3.3 skyrelyje. Su ALS taip pat susiję su nukleorūgštimis sąveikaujantys TAF15, EWSR1, ANG, SETX, ELP3, ataksinas–1, ataksinas–2, hnRNP–A1, hnRNP–A2B1 ir CREST baltymai. Iš jų dažniausiai sutinkami TDP-43 ir FUS ribonukleoproteinai. Mutacijos *TDP-43* ir *FUS* genuose lemia 10 % fALS atvejų. TDP-43 yra 414 aminorūgščių DNR jungiantis baltymas, turintis 2 RNR atpažinimo motyvus, branduolio lokalizacijos ir eksporto sekas. Daugiausia mutacijų, susijusių su ALS, randama glicinais turtingame C gale. FUS sudarytas iš 526 a.; jo struktūra panaši į TDP-43. Baltymas turi branduolio importo/eksporto sekas, sekas jungimuisi su RNR/DNR ir *Zn* pirštų motyvą (Peters ir Brown Jr, 2015). Dažniausia su nukleorūgštimis sąveikaujančių baltymų vieta eukariotinėje ląstelėje yra branduolys. ALS atveju, sutrinka tokių baltymų įnaša į branduolį ir jie nebegali atlikti savo funkcijos. Kita toksiškumo priežastis - FUS ir TDP-43 turi prioninius domenus (angl. *prion-like domains*), kuriais



1.1 pav. Su ALS susijusios mutacijos *SOD1* gene.

baltymai labai stipriais ryšiais negrįžtamai sukimba į streso granules ir formuoja netirpius intarpinius kūnelius (Mackenzie et al., 2010; Peters ir Brown Jr, 2015). Įdomu tai, kad iš TDP-43 agregatų sudarytuose intarpiniuose kūneliuose nerandama SOD1 agregatų, o FUS agregatų sudėtyje nerandama TDP-43. Tai liudija skirtingus šių baltymų agregacijos mechanizmus, nors visi jie sukelia tą pačią ligą (Maniecka ir Polymenidou, 2015). Neseniai atrasta, kad net 10 % ALS atvejų sukelia heksanukleotido GGGGCC pasikartojimų I-ajame nenustatytos funkcijos geno *C9ORF72* introne padidėjimas nuo 2-23 iki 700-1600 vienetų. Manoma, kad esant pasikartojimų skaičiaus padidėjimui, alternatyvaus splaisingo metu gaunamos skirtingos iRNR. Šios iRNR koduoja kitokias C9ORF72 baltymo izoformas, kurios kol kas nežinomu būdu dalyvauja ALS vystymesi (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011).

1.2.3. Rizikos veiksniai

Pagrindinis rizikos veiksnys fALS atveju, žinoma, yra mutacijos su ALS susijusių baltymų genuose. Tuo tarpu sALS rizikos veiksniai nėra gerai ištirti, kadangi ligos požymiai atsiranda senyvame amžiuje ir yra sunku atsekti tikruosius rizikos veiksnius. Yra tik numanomas šių veiksnių žalingas poveikis (Zarei et al., 2015):

- Rūkymas. Tabake esantys sunkieji metalai ląstelėse sukelia oksidacinį stresą, užde-

gimą ir veikia neurotoksiškai.

- Fizinis aktyvumas. Nėra aišku, kaip geras fizinis pasirengimas gali sukelti ALS, tačiau pastebėta, kad atletams susirgti ALS rizika yra didesnė negu nesportuojantiems žmonėms.
- Žemės ūkyje naudojami chemikalai. Nustatyta, kad žmonės, 4 metus ir ilgiau dirbę su pesticidais, herbicidais ir kitomis žemės ūkyje naudojamomis cheminėmis medžiagomis, labiau rizikuoja susirgti ALS.
- Elektromagnetiniai laukai. Nustatyta, kad labai žemo dažnio elektromagnetiniai laukai skatina reaktyviųjų deguonies formų susidarymą ląstelėse *in vitro* ir *in vivo*. Kadangi oksidacinis stresas tiesiogiai susijęs su ALS, tokio pobūdžio radiacija gali prisidėti prie ALS vystymosi.

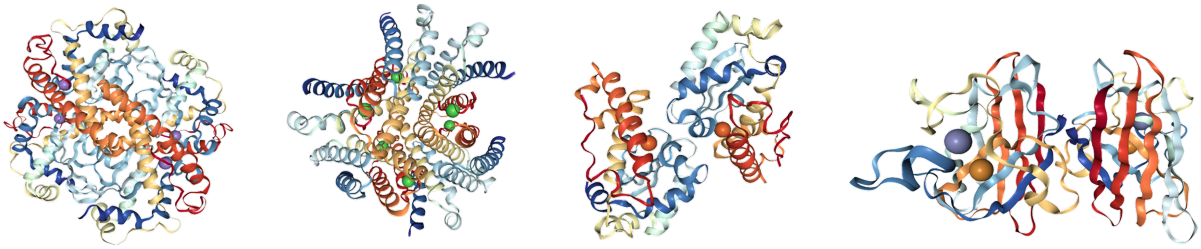
Tuo tarpu vitamino E vartojimas kartu su omega–3 riebiosiomis rūgštimis sumažina riziką susirgti ALS iki 60 % (Veldink et al., 2007).

1.3. Superoksido dismutazės

Superoksido dismutazės – visų trijų domenų organizmuose randami baltymai. Jų funkcija – mažinti oksidacinį stresą ląstelėse reaktyvų superoksido joną $O_2^{\cdot -}$ verčiant į vandenilio peroksidą ((1) lygtis). Neseniai atrasta, kad žmogaus *Cu*, *Zn* superoksido dismutazė dalyvauja AKT kinazės valdomame signaliniame kelyje (Mondola et al., 2016).

$$2\,O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \tag{1}$$

Pirmoji superoksido dismutazė buvo išskirta iš jaučio eritrocitų dar 1969 m. (McCord ir Fridrowich, 1969). Šiuo metu žinomos superoksido dismutazės skirstomos į 3 klases pagal tai, kokių metalų jonus turi aktyviajame centre - *Mn*, *Ni*, *Fe* ar *Cu* (1.2 pav.) (Miller, 2011).



(a) *Mn* SOD, PDB kodas 1ZSP. **(b)** *Ni* SOD, PDB kodas 1T6U. **(c)** *Fe* SOD, PDB kodas 1ISB. **(d)** *Cu*, *Zn* SOD, PDB kodas: 1HL5.

1.2 pav. Superoksido dismutazių erdvinės struktūros.

1.3.1. *Mn ir Fe* SOD

Mn ir Fe jonus turinčios SOD (1.2a ir 1.2c pav.) pasižymi panašia struktūra, aminorūgščių seka ir (1) reakcijos katalizės mechanizmu.

Abu baltymai randami bakterijose, pirmuonyse, grybuose, augaluose. Mn SOD dar randama ir gyvūnų ląstelių mitochondrijose (vėžiagyviuose, naudojančiuose Cu deguonies transportui, citozolinė SOD taip pat turi Mn joną) (Miller, 2011).

1.3.2. *Ni* SOD

Ni SOD – iš 13,2 kDa subvienetų sudarytas homoheksameras, pirmąkart rastas *Streptomyces* genties bakterijose, aktyviame centre turintis Ni^{3+} joną (1.2b pav.) (Youn et al., 1996). Baltymas pasižymi mažiausia aminorūgščių sekos homologija palyginus su kitų SOD klasių baltymais. Holofermente yra 6 Ni^{3+} jonai, koordinuojami histidino ir trijų cisteinų šoninių grupių. Aktyvaus centro metalo jonas yra giliai fermento viduje ir kanalas iki jo yra tokio pločio, kad prie jo patekti gali tik desolvatuotas $O_2^{\cdot -}$. Ni SOD, kaip ir Cu, Zn ir Fe SOD, yra citozolinis baltymas. Jį koduoja *sodN* genas; po transliacijos profermentas yra brandinamas nuskeliant visų polipeptidinių grandinių N galus (Barondeau et al., 2004).

1.3.3. *Cu, Zn* SOD

Cu ir Zn jonus turinčios SOD (1.2d pav.), aptinkamos visose gyvybės karalystėse, išskyrus pirmuonis. Galimos trys baltymo formos: monomeras, dimeras ir tetrameras (Antonyuk et al., 2009). Monomeras randamas bakterijose, dimeras – gyvūnų ląstelių citozolyje, peroksisomose, mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje, branduolyje, tetrameras – užląstelinėje erdvėje (Miller, 2011).

Žmogaus Cu, Zn superoksido dismutazė – citozolyje lokalizuotas 32 kDa homodimeras, kiekviename subvienete turintis po vieną Cu, vieną Zn joną ir vidumolekulinį disulfidinį ryšį tarp Cys^{57} ir Cys^{146}. Subvienetą sudaro 8 juostų β statinė, Zn kilpa, elektrostatinė kilpa ir graikiško rakto motyvą turinti kilpa. Zn ir elektrostatinė kilpos sudaro kanalo, vedančio nuo baltymo paviršiaus iki aktyviojo centro, sienas (Rotunno ir Bosco, 2013; Strange et al., 2003; Tainer et al., 1982). Cu^{2+} yra koordinuojamas keturių His šoninių grupių, Zn^{2+} – trijų histidinų ir aspartato. Vieno histidino imidazolo žiedas yra bendras ligandas abiems metalams (Tainer et al., 1982).

SOD1 ląstelėje brandinama superoksido dismutazės vario šaperono (hCCS) pagalba. Brendimas vyksta keliais etapais (pagal Banci et al. (2012), 1.3 pav.):

1. Zn jono įterpimas į apofermentą;

2. $Cu(I)$-hCCS heterodimerizacija su brandinama SOD1;

3. *Cu* įjungimas į SOD1 per hCCS D1 domeną;

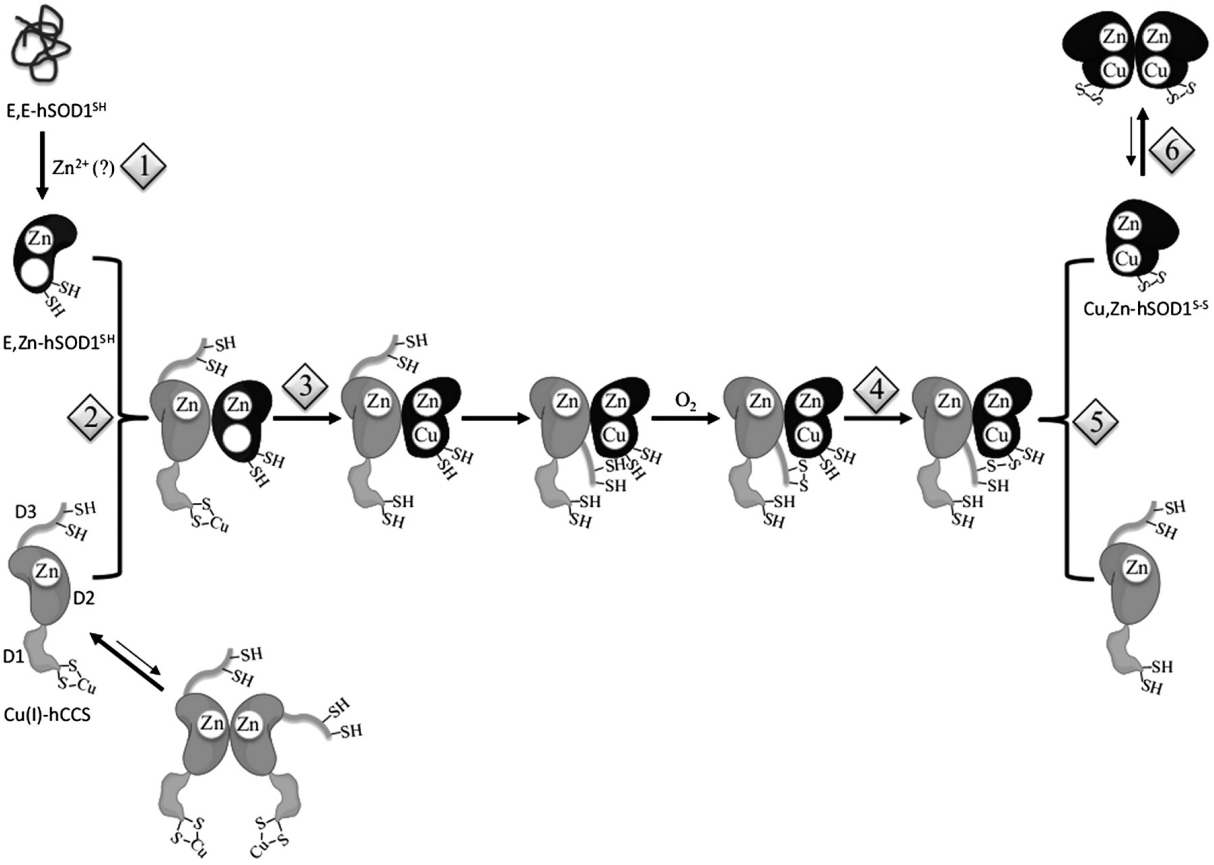
4. Tarpmolekulinio disulfidinio ryšio tarp SOD1 ir hCCS suformavimas:

   (hCCS) Cys^{244}–Cys^{246} + (hSOD1) Cys^{57} $\xrightarrow{O_2}$ (hCCS) Cys^{244} – Cys^{57}(hSOD1) + (hCCS) Cys^{246}

5. Vidumolekulinio (hSOD1) Cys^{57} – Cys^{146} tilto susidarymas:

   (hCCS) Cys^{244} – Cys^{57}(hSOD1) + (hSOD1) Cys^{146} ⟶ (hSOD1) Cys^{57} – Cys^{146} + (hCCS) Cys^{244}

6. Subrendusių SOD1 subvienetų homodimerizacija į natyvų baltymą.

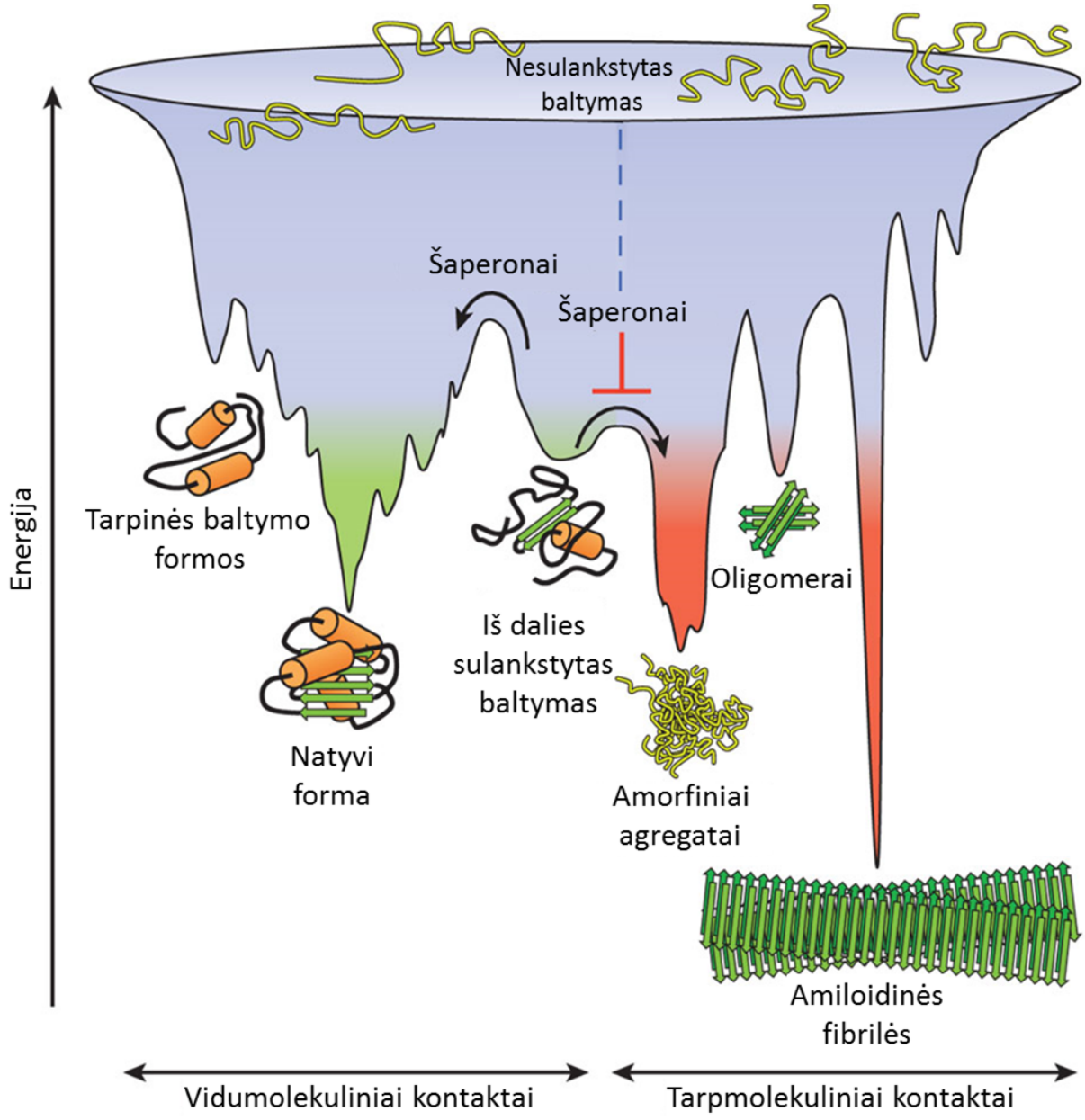


1.3 pav. Žmogaus *Cu*, *Zn* superoksido dismutazės brendimas dalyvaujant O_2 (pagal Banci et al. (2012)).

1.4. Amiloidinių baltymų agregacijos mechanizmai

Ląstelės baltymai, kad galėtų atlikti savo funkciją, pirmiausia turi įgyti jiems būdingą tretinę ir/arba ketvirtinę struktūrą. Šios struktūros įgijimas ląstelės aplinkoje dažniausiai yra sudėtingas ir vyksta keliais etapais, kurių metu baltymas yra vis kitokios energinės būsenos (1.4 pav.). Susilankstymo eigoje baltymo kontaktai su kitomis molekulėmis lemia,

kokia struktūra bus įgyta. Įprastu atveju įgyjama natyvi tretinė/ketvirtinė struktūra, tačiau baltymas gali sukibti į amorfinius agregatus ar amiloidines fibriles. Agregatų susidarymo tikimybė priklauso nuo laiko, kurį tarpinė susilankstančio baltymo forma praleidžia hidrofobines sritis eksponuodama į aplinką. O tai savo ruožtu priklauso nuo baltymo dydžio, jo struktūros sudėtingumo ir energinio barjero, kuris turi būti įveiktas, kad baltymas įgytų natyvią struktūrą (Hartl et al., 2011).



1.4 pav. Baltymo tretinės struktūros įgijimo energetika (pritaikyta pagal Hartl et al. (2011)).

Įgyti teisingą tretinę ar ketvirtinę struktūrą baltymams padeda šaperonai; jie taip pat dalyvauja blogai susisukusių baltymų perlankstyme. Ląstelės baltymų pastovumui (proteostazei) palaikyti svarbios ir proteosomos. Sutrikimai, atsirandantys šiose sistemose

dėl amžiaus ar genetinių mutacijų, gali sukelti jau aptartas amiloidines ligas (Hartl et al., 2011).

1.4.1. Bendras agregacijos mechanizmas

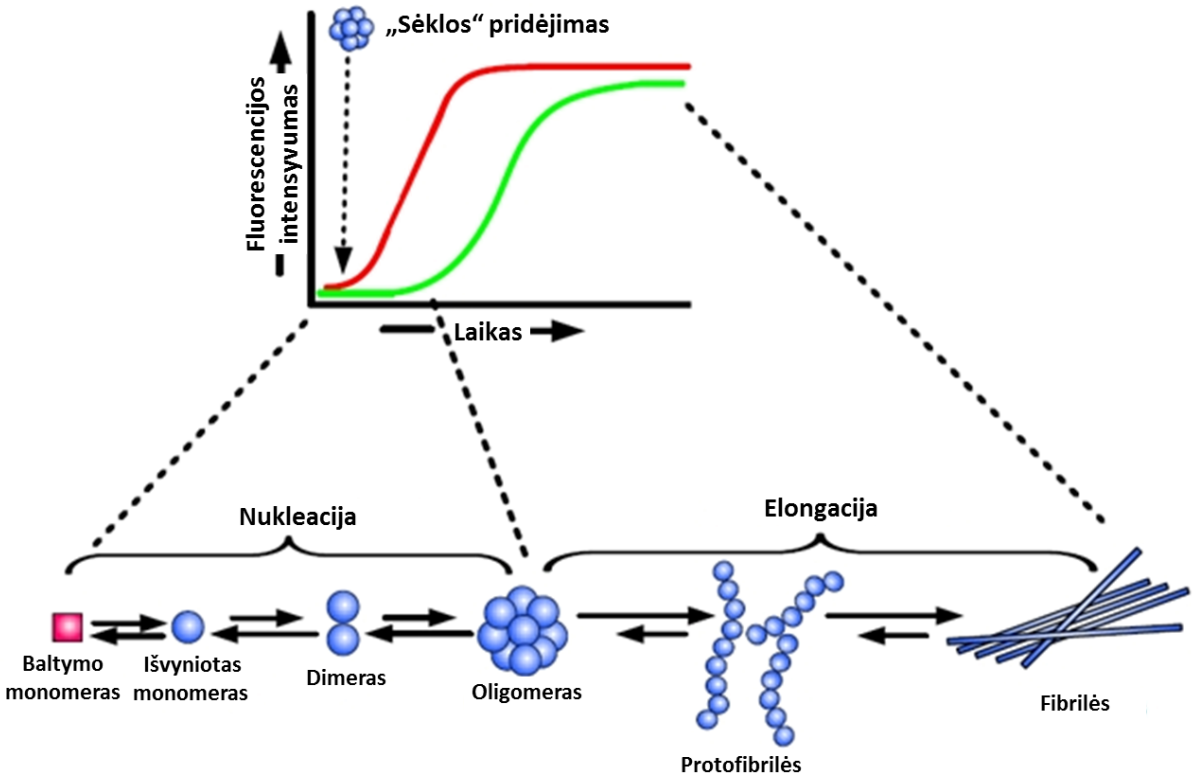
Amiloidinės agregacijos kinetikai stebėti naudojami įvairūs specifiniai dažai (tioflavinas S, tioflavinas T, nilo raudonasis, kongo raudonasis, dapoksilas), *in vitro* tyrimams dažniausiai naudojamas tioflavinas T. Dažui prisijungus prie amiloidinių struktūrų, jo fluorescencijos emisijos intensyvumas padidėja keliasdešimt kartų (Hawe et al., 2008). Tokiu būdu stebint agregacijos kinetiką *in vitro*, pastebėta, kad dažnu atveju duomenų išsidėstymas yra sigmoidinės kreivės pavidalo (1.5 pav.). Remiantis tuo buvo pasiūlyti galimi amiloidinės agregacijos mechanizmai (Eisele et al., 2015).

Agregacijos procesas prasideda agregacijos branduolių, iš kelių baltymo monomerų sudarytų oligomerų, formavimusi – tai lėčiausia, greitį limituojanti stadija, dar vadinama **nukleacija**. Pagal **nukleacinės polimerizacijos** (angl. *nucleated polymerisation*) hipotezę, branduolių formavimosi (lag fazės) metu atsitiktinai susiduria baltymo molekulės, tačiau oligomerai susidaro ne kiekvieno susidūrimo metu. Į agregacijos branduolius susijungia tik tam tikros konformacijos baltymo formos, kurioms termodinamiškai palankiau jungtis į oligomerus, negu egzistuoti atskirai. Branduolių susidarymas aiškinamas ir **branduolio konformacinio pokyčio** (angl. *nucleated conformational conversion*) teorija. Pagal šią teoriją, egzistuoja pusiausvyra tarp baltymo monomero ir dažnu atveju stabilesnio oligomero. Bėgant laikui oligomeras persitvarko ir virsta agregacijos branduoliu, kuris dalyvauja fibrilių ilgėjime (Eisele et al., 2015). Abiem atvejais nukleacija agregacijos kinetinėje kreivėje stebima mažo, nekintančio fluorescencijos emisijos intensyvumo kreivės pavidalu nuo laiko momento t=0 iki elongacijos pradžios. Šios agregacijos fazės tyrimai yra patys sudėtingiausi dėl susidarančių oligomerų įvairovės ir metodų juos atskirti trūkumo (Buell et al., 2014). Atliekant eksperimentus lag fazės trukmę galima gerokai sutrumpinti į agregacijos mišinį pridėjus „sėklos“ – jau susiformavusių fibrilių. Tuomet ima vyrauti elongacijos procesas, kuris yra daug greitesnis nei nukleacija (žr. toliau) (Kumar ir Walter, 2011). Šiuo principu paremtas baltyminio užkrato plitimas į kitas ląsteles sergančiame organizme (Buell et al., 2014; Eisele et al., 2015).

Agreguojant kai kuriems baltymams (pvz. transtiretinui) *in vitro*, pastebėta, kad kartais kinetinėse kreivėse nebūna lag fazės, nors „sėklos“ ir nebuvo pridėta. Tokiam reiškiniui paaiškinti buvo sukurta **savaiminės polimerizacijos** (angl. *downhill polymerisation*) teorija. Pagal ją, greitį limituojanti stadija yra baltymo virtimas į agregatyvią formą. Šios formos monomerai yra aukščiausios energinės būsenos ir savaime agreguoja iškart, nes bet kokio tipo agregatai yra žemesnės energinės būsenos. Tokio tipo baltymų agregacijai „sėklos“ pridėjimas neturi jokios įtakos (Eisele et al., 2015).

Elongacija (fibrilių ilgėjimas) – tirpių baltymo formų jungimasis išilgine kryptimi

prie agregacijos branduolių. Elongacijos metu susidaro pailgos formos fibrilės, kurių galai veikia kaip aktyvūs centrai jungtis kitiems monomerams (ar oligomerams). Prisijungęs baltymas įgyja tokią formą, kuri leidžia sukurti tokį patį aktyvų centrą, prie kurio prieš tai prisijungė – taip atsiranda išilginė fibrilės simetrija. Kol kas nesutariama, kas dalyvauja ilgėjime – baltymo monomerai ar oligomerai. Manoma, kad esant mažoms baltymo koncentracijoms, prie fibrilių galų jungiasi monomerai. Tai įrodoma tiesine elongacijos greičio priklausomybe nuo baltymo koncentracijos. Tuo tarpu esant didesnei baltymo



1.5 pav. Bendras amiloidinės agregacijos mechanizmas (pritaikyta pagal (Kumar ir Walter, 2011)).

koncentracijai, prie galų labiau linkę jungtis oligomerai – tokia išvada buvo padaryta pranykus tiesinei elongacijos greičio priklausomybei nuo baltymo koncentracijos (Buell et al., 2014). Kai kuriuose šaltiniuose (Kumar ir Walter, 2011; Perrett, 2014) išskiriama tarpinė fazė tarp agregacijos branduolių ir fibrilių susidarymo. Teigiama, jog fibrilės susidaro tarpusavyje jungiantis protofibrilėms (trumpiems, pailgiems baltymų agregatams, kuriems taip pat būdinga β klostyta struktūra). Protofibrilių struktūros susidarymui svarbūs vandeniliniai ryšiai tarp polipeptidinių grandinių karkasų; tuo tarpu protofibrilių tarpusavio jungimosi pobūdį lemia peptido šoninių grupių sudaromi vandeniliniai ryšiai ir kitos šoninių grupių sąveikos (Perrett, 2014). Abiem atvejais, fibrilių ilgėjimas ar protofibrilių susidarymas bei jungimasis į subrendusias fibriles kinetinėje kreivėje stebimas kaip eksponentinis fluorescencijos emisijos intensyvumo didėjimas (1.5 pav.).

Agregacijos procesas baigiasi pasiekus **įsisotinimą**. Šios fazės metu terpėje nebėra

laisvų monomerų, visi sujungti į fibriles. Esant įsisotinimui vyksta tik fibrilių lūžinėjimas dėl vidinių įtempio jėgų. Įsisotinimas stebimas kaip beveik nekintančio fluorescencijos emisijos intensyvumo, kuris yra keliasdešimt kartų didesnis už pradinį, kreivė (Buell et al., 2014).

Visas aukščiau aprašytas procesas dar vadinamas **pirmine nukleacija**. Jai įvykus dar gali vykti **antrinė nukleacija** – monomerų jungimas ir fibrilių susidarymas ant jau esančių agregatų paviršiaus. Toks procesas laikomas paviršiaus katalizės rūšimi. Baltymo monomerai gali jungtis tiek ant iš tokių pačių baltymų sudarytų fibrilių, tiek ant kitokių baltymų fibrilių (Buell et al., 2014).

1.4.2. SOD1 mutantų ir agregatų toksiškumas

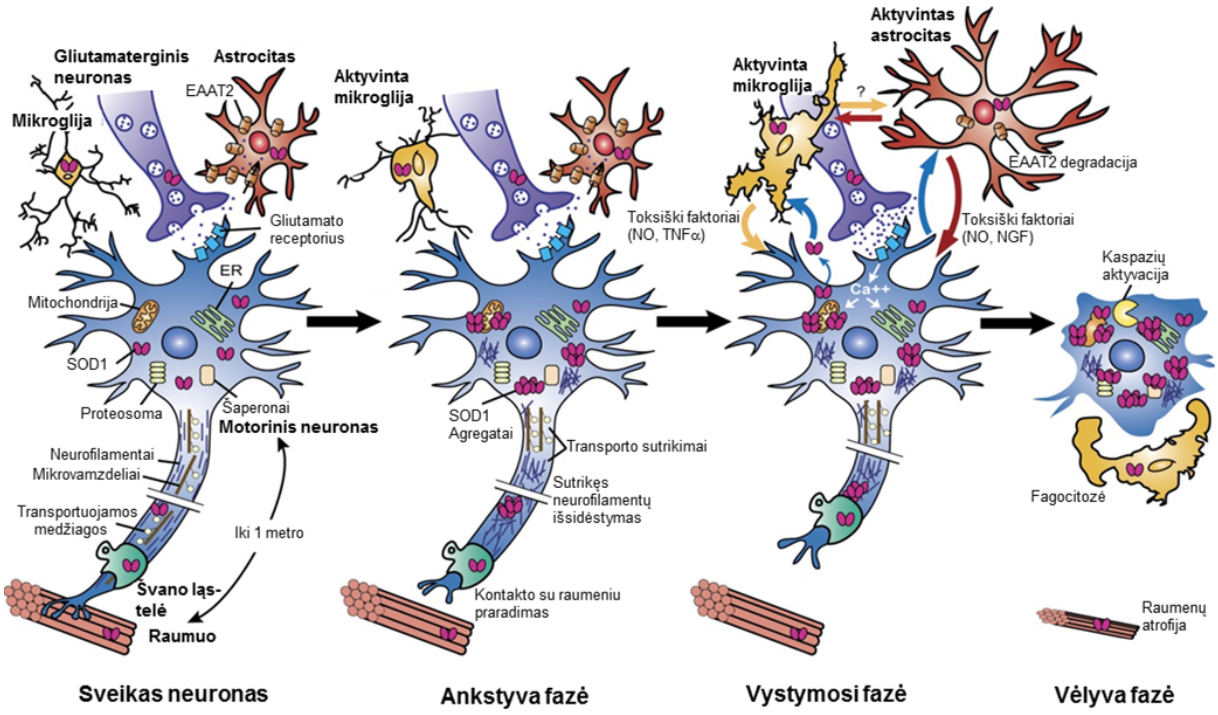
Nuo pat SOD1 susiejimo su ALS buvo bandoma išaiškinti, koks tikslus šio baltymo vaidmuo ligos vystymesi ir dažniausiai tyrimai buvo atliekami su mutantiniais SOD1 variantais. Iš pradžių buvo tikima funkcijos praradimo (angl. *loss of function*) hipoteze. Pagal šią hipotezę, mutuota SOD1 nebegali katalizuoti fermentinės reakcijos – $O_2^{\cdot -}$ vertimo į vandenilio peroksidą – ir neuronai žūva dėl oksidacinio streso. Ši hipotezė buvo paneigta keliais faktais. Pirma, heterozigotiniai pagal *SOD1* geną asmenys taip pat serga ALS, nors vieno sveiko alelio turėtų pakakti nefunkcionalaus baltymo funkcijai atstatyti. Antra, pelės, kuriose smarkiai padidinta sveiko *SOD1* geno raiška, taip pat turi ligos požymių. Ir trečia, pelės su išveiklintu *SOD1* genu neturi ligos požymių, nors jų ląstelės be šio fermento gyvena didesnio oksidacinio streso sąlygomis. Šiuo metu tikima naujos funkcijos įgijimo (angl. *gain of function*) hipoteze. Pagal ją, mutantės SOD1 yra įgijusios naują funkciją – neurodegeneracinių ligų kontekste tai yra didesnis polinkis formuoti agregatus, kurių kaupimasis ląstelėse yra kenksmingas (Peters ir Brown Jr, 2015). Mutantinės SOD1 formos ir agregatai randami neįprastose ląstelės vietose ir trikdo įvairius ląstelinius procesus motoriniuose neuronuose ir aplinkinėse nervinėse ląstelėse – astrocituose, mikroglijos ląstelėse (žr. 1.6 pav.).

Sklindant nerviniam signalui, į neurono sinapsę per presinapsinę membraną išskiriamas neuromediatorius gliutamatas, kurį atpažįsta postsinapsinės membranos receptoriai. SOD1 agregatai sutrikdo gliutamato pašalinimą iš sinapsės po signalo perdavimo, inaktyvuodami astroglijos ląstelių gliutamato nešiklį EAAT2 (Boillée et al., 2006; Zarei et al., 2015). Sinapsėje susikaupęs gliutamatas trukdo naujo signalo sklidimui ir nuolat stimuliuoja postsinapsinius receptorius – atsiranda ekscitotoksiškumas. Ekscitotoksiškumas savo ruožtu aktyvuoja nuo Ca^{2+} priklausomus metabolinius kelius ir didesnį Na^{+}, Ca^{2+} jonų patekimą į ląstelę (Zarei et al., 2015).

Su motorinių neuronų žūtimi susijusios ir pažaidos mitochondrijose. Mutantės SOD1 pasižymi savybe kauptis mitochondrijų tarpmembraninėje erdvėje ir matrikse. Taip pat, sąveikaudamos su fosfolipidinėmis membranomis, trikdo mitochondrijos baltymų importą

iš citozolio (sąveikaudamos su TIM/TOM nešikliais) (Boillée et al., 2006). Tam tikri mutantai (G93A) slopina oksidacinį fosforilinimą, o šio proceso rezultatas – sumažėjęs ATP kiekis ląstelėje (Mattiazzi et al., 2002). Nesant pakankamai ATP, motoriniai neuronai nebegali atlikti savo funkcijos dėl energijos trūkumo. SOD1 agregatai taip pat inicijuoja pirmalaikį vidinį apoptozės kelią – trikdo antiapoptotinio reguliatoriaus Bcl-2 veiklą. Savo ruožtu apoptozės signalinio kelio gale aktyvuojama kaspazė-3 proteolitiškai inaktyvuoja EAAT2 nešiklį, ir taip dar labiau padidinamas ekscitotoksiškumo lygis ir pagreitinama neuronų žūtis (Boillée et al., 2006; Boston-Howes et al., 2006).

Mitochondrijos svarbios ir patovios Ca^{2+} koncentracijos palaikymui. Buvo parodyta, kad ALS pacientų neuronuose yra smarkiai sumažėjęs Ca^{2+} jungiančių baltymų, tokių kaip kalretikulinas ir kalbindinas, kiekis – tai siejama su neuronų žūtimi dėl homeostazės nepalaikymo. Galiausiai agregatai, kaip didelių matmenų dalelės ląstelės mastu, apsunkina mitochondrijų transportą į aksono galą, kur signalo perdavimo metu yra didelis ATP poreikis ir Ca^{2+} koncentracija. Esant blogam mitochondrijų paskirstymui, aksonas kenčia nuo ATP trūkumo ir kalcio homeostazės sutrikimo. Be to, aksone kaupiasi pasenusios, nebeveiksnios mitochondrijos ir į jų vietą neatnešamos naujos (Maniecka ir Polymenidou, 2015).



1.6 pav. Motorinio neurono degradacija vystantis ALS (pritaikyta pagal (Boillée et al., 2006)).

Be jau minėtų reiškinių, SOD1 agregatai užkemša proteosomas trukdydami ardyti įprastus ląstelės baltymus bei kaupiasi endoplazminio tinklo ertmėje trikdydami blogą struktūrą įgavusių baltymų degradaciją ERAD mechanizmu (angl. *ER-associated degradation*) (Maniecka ir Polymenidou, 2015).

Taip pat buvo parodyta, kad mutantinės SOD1 formos atrankiai sekretuojamos į ląstelės išorę (Shi et al., 2016) ir keičia glijos ląstelių aktyvumą.

Deja, tikslus agregatų vaidmuo ALS ir kitų amiloidinių ligų patogenezėje kol kas nėra žinomas. Seniau buvo manoma, kad toksiškiausia baltymo forma yra fibriliniai agregatai (Hardy ir Higgins, 1992). Tačiau šiuo metu vyrauja nuomonė, kad agregacija į fibriles tėra apsauginis mechanizmas, o toksiškiausios ląstelėms yra struktūrą praradusios tarpinės baltymo formos ir iš jų sudaryti oligomerai (Eisele et al., 2015; Stroo et al., 2017; Verma et al., 2015).

1.5. Agregacijos slopikliai

Amiloidinėms ligoms gydyti gali būti taikomos pačios įvairiausios strategijos (Eisele et al., 2015). Bendro gydymo visoms tokio tipo ligoms kolkas nėra, visi metodai yra specifiniai ir priklauso nuo su liga siejamo baltymo ir pažeidžiamo organo. Bendros strategijos ligoms įveikti yra agregatyvaus baltymo geno raiškos mažinimas, blogą tretinę ar ketvirtinę struktūrą įgijusių baltymų degradacijos efektyvumo gerinimas, amiloidinio baltymo tretinės/ketvirtinės struktūros stabilizavimas, monomerų agregacijos į oligomerus ar amiloidines fibriles slopinimas (Cheng et al., 2013).

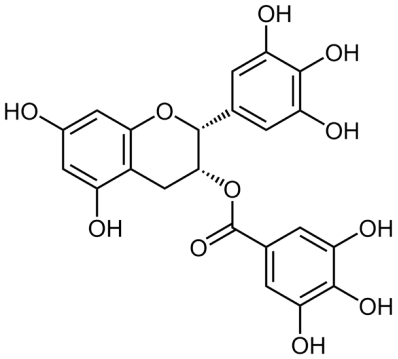
Dėl amiloidinių ligų diagnostinių metodų trūkumų, tikroji diagnozė (ypač spontaninių susirgimų atvejais) pacientams nustatoma pakankamai vėlai – kai audiniuose jau randama amiloidinių baltymų agregatų. Tokiais atvejais, norint pagydyti žmogų, reikia šalinti agregatus ir ieškoti junginių, kurie stabilizuotų ląstelėse esantį baltymą (Eisele et al., 2015).

Viena iš junginių, slopinančių monomerų agregaciją į oligomerus ir fibriles, klasių yra polifenoliai – tokių junginių gausu arbatoje, vyne, vynuogėse, kavoje. Jų veikimas aiškinamas tuo, kad polifenolių aromatiniai žiedai dėl $\pi - \pi$ sąveikos jungiasi su aromatinių aminorūgščių šoninėmis grupėmis, neleidžia joms jungtis tarpusavyje ir formuoti agregatus.

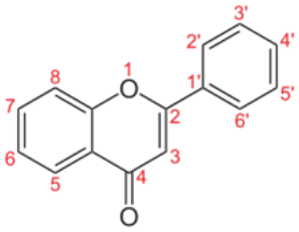
Ypač išsamiai ištyrinėtas yra (-)epigalokatechin-3-galatas (EGCG – 1.7a pav.); buvo parodytas jo teigiamas slopinimo efektas α-sinukleinui, amiloidui β, kalcitoninui ir TTR. Manoma, kad oksiduotas EGCG jungiasi su peptidų amino grupėmis, neleidžia joms sudaryti vandenilinių ryšių ir suformuoti β klostytų struktūrų. Be to, aromatinis žiedas neleidžia β struktūroms jungtis savo plokštumomis į persidengiančias β klostes (angl. *cross β–sheet*) (Cheng et al., 2013; Eisele et al., 2015). Parodyta, kad vyne randamas polifenolis resveratrolis taip pat slopina Aβ ir IAPP fibrilizaciją. Tiek EGCG, tiek resveratrolis veikia kaip veiksniai, pertvarkantys agregacijos proceso tarpininkus oligomerus ir fibriles į netoksiškus agregatus (Cheng et al., 2013).

Panašiai veikia ir flavonoidai, kurių pagrindas – 2-fenil-1-benzopiran-4-ketonas (1.7b pav.). Vienas iš tokių junginių – baikaleinas (5,6,7-trihidroksiflavonas; jo struktūrinė

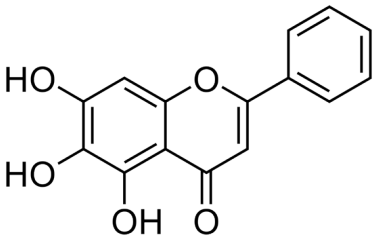
formulė pateikta 1.7c pav.) *in vitro* ir *in vivo* slopina α-sinukleino ir Aβ fibrilizaciją, ardo jau susidariusias fibriles ir nukreipia agregaciją netoksiškų agregatų susidarymo keliu (Cheng et al., 2013; Zhu et al., 2004).



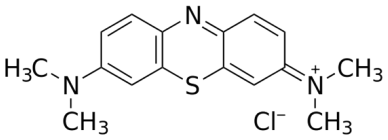
(a) (-)EGCG struktūrinė formulė.



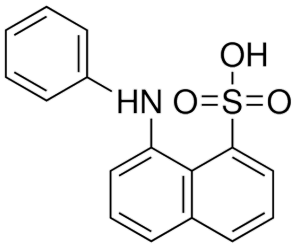
(b) Flavono struktūrinė formulė.



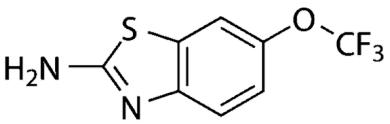
(c) Baikaleino struktūrinė formulė.



(d) Metileno mėlio struktūrinė formulė.



(e) ANS struktūrinė formulė.



(f) Riluzolo struktūrinė formulė.

1.7 pav. Agregacijos slopiklių struktūrinės formulės.

Kiti junginiai, slopinantys amiloidinių baltymų agregaciją *in vivo* ir/ar *in vitro*, yra kurkuminas, kofeino rūgštis, fenolio raudonasis (pH indikatorius), alyvuogių aliejuje randamas oleuropeinas, augaluose ir jų vaisiuose randami silibininas, salvianolinė rūgštis, procianidinas. Taip pat kumarinas ir jo analogai, *scilo*-inozitolis, antihipertenzinis vaistas furosemidas (Cheng et al., 2013), reumatoidiniam artritui gydyti skirtas sulfosalazinas, metileno mėlis (1.7d pav.) bei fluorescencinis dažas ANS (1.7e pav.) (Brumshtein et al., 2015).

Agregatų pašalinimui yra tikimasi ateityje naudoti fibrilėms/oligomerams specifinius antikūnus, kurie prisijungę prie agregatų trukdytų jiems jungti monomerus ar pažymėtų sunaikinimui (Cheng et al., 2013; Eisele et al., 2015). Toks būdas tiktų užląstelinių agregatų šalinimui bei galėtų sustabdyti užkrato plitimą į kitas ląsteles. Taip pat mielėse ir bakterijose buvo rasti baltymai–disagregazės, Hsp104 ir ClpB atitinkamai, kurie ardo amiloidinius agregatus. Žinduoliuose tokios funkcijos baltymai dar neaptikti, tačiau manoma, kad mielių ar bakterijų disagregazes galima pritaikyti kaip vaistus, ardančius agregatus ir žmogaus organizme (Eisele et al., 2015).

Dar nėra sukurta vaistų, išgydančių ALS. Vienintelis vaistas, skiriamas šia liga sergantiems pacientams, yra riluzolas (6-(trifluormetoksi)-2-aminobenzotiazolas, struktūrinė

formulė pateikta 1.7f pav.), kompanijos Sanofi-Aventis parduodamas *Rilutek*® komerciniu pavadinimu. Riluzolas blokuoja gliutamato sekreciją į sinapsę mažindamas ekscitotoksiškumą ir atidėdamas motorinių neuronų žūtį. Deja, šis vaistas tik pailgina ligonių gyvenimo trukmę keliais mėnesiais ir pilnai jų neišgydo, o kaina metams pacientui siekia 10 000 JAV dolerių (Miller et al., 2012). Gydymo riluzolu efektyvumas taip pat kelia klausimų – žinoma, kad nemaža dalis suvartoto vaisto taip ir nepasiekia tikslinio audinio. Skirtinguose organizmuose riluzolo metabolizmas vyksta skirtingu greičiu – tai priklauso nuo vaisto skaidyme dalyvaujančių fermentų izoformų. Pastaruoju metu yra bandoma taip modifikuoti riluzolą, kad aktyvia vaistine forma jis taptų tik paveikus tam tikrais fermentais – taip padidėtų šio vaisto stabilumas *in vivo*. 2013 metais III klinikinių tyrimų fazę pasiekė nauji potencialūs vaistai ALS gydymui: dekspramipeksolas (angl. *dexpramipexole*) ir olesoksimas (angl. *olesoxime*), veikiantys mitochondrijas; arimoklomolis – HSP šaperonų genų raiškos reguliatorius bei edaravonas, ROS gaudyklė (Limpert et al., 2013).

1.6. Amiloidinių baltymų funkcijos

Amiloidiniai baltymai pasižymi maža sekos homologija, todėl manoma, kad savybė formuoti amiloidines fibriles būdinga daugeliui baltymų. Iš amiloidinių baltymų CsgA ir CsgB yra sudarytas *E. coli* ir *Salmonella* spp. kurlis (angl. *curli*), kurio funkcija – padėti bakterijai prikibti prie paviršiaus ir formuoti kolonijas (Barnhart, 2006). Dirvožemyje gyvenančios *Streptomyces coelicolor* filamentinės bakterijos sintetina čaplinus (angl. *chaplins*), kurie dengia hifų paviršių sumažindami juos dengiančio vandens paviršiaus įtempimą ir leidžia gijoms išlaikyti savo struktūrą (Claessen et al., 2003).

Amiloidinių baltymų randama ir grybuose. Mielių *Saccharomyces cerevisiae* transliacijos terminatoriaus Sup35p funkcija - stabdyti peptido sintezę ribosomai pasiekus STOP kodoną. Suagregavęs Sup35p nebeatlieka savo funkcijos, tai lemia baltymų sintezę su papildomomis aminorūgštimis C gale, o tai savo ruožtu generuoja kitokią organizmo proteomą ir naują fenotipą (Fowler et al., 2007; True ir Lindquist, 2000). Transkripcijos faktoriaus URE2p agregacija taip pat lemia naujo fenotipo atsiradimą (Fowler et al., 2007).

Amiloidiniai baltymai svarbūs kraujo krešulių susidaryme žmogaus organizme. Pagrindinis kraujo krešulius sudarantis baltymas fibrinas laikomas amiloidiniu baltymu. Jame gausu β struktūrų, jis dažosi amiloidiniams baltymams specifiniu Kongo raudonuoju dažu (Fowler et al., 2007). Amiloidai svarbūs ir kraujo krešėjimo iniciacijai bei krešulio skaidymui. Alzheimerio ligą sukeliančio amiloido β agregatai aktyvuoja XII kraujo krešėjimo faktorių. Jo funkcija - inicijuoti proteolitinę kaskadą, kurioje dalyvaujantys baltymai tirpų fibrino pirmtaką fibrinogeną verčia netirpiu fibrinu (Shibayama et al., 1999). Fibriną skaidančiai proteazei plazminui susidaryti reikalingas plazminogenas ir jo aktyvatorius tPA. Pastariesiems suartėti reikalingas paviršius, kurį ir suteikia fibrino ar amiloido β

skaidulos (Kranenburg et al., 2002).

Plazminogeno aktyvacijos principu naudojasi ir kai kurie patogenai. Pastebėta, kad bakterijos, sintetinančios β struktūromis gausų kurlį, pasižymi didesniu virulentiškumu. Tai aiškinama tuo, kad kurlis veikia kaip paviršius tPA ir plazminogenui prisijungti. Proceso rezultatas – aktyvuojamas plazminas, skaidantis ne tik fibriną, bet ir užląstelinio užpildo komponentus ir taip padedantis bakterijoms užkrėsti audinius (Fowler et al., 2007; Gebbink et al., 2005).

Žinduolių baltymas Pmel17 svarbus pigmento melanino sintezei. Iš Pmel17 transmembraninio baltymo Mα fragmento susidariusios fibrilės veikia kaip katalitinis paviršius, palengvinantis 5,6-indolchinono polimerizaciją į melaniną (McGlinchey ir Lee, 2017).

Iš pateiktų pavyzdžių akivaizdu, kad ląstelėms amiloidiniai baltymai yra reikalingi. Tačiau dėl didelio potencialo tapti toksiškais jų kiekis turi būti griežtai reguliuojamas. Mielių ląstelėse šaperonas Hsp104 skaido Sup35p ir URE2p agregatus (Vashist et al., 2010). Tuo tarpu žinduolių ląstelės nuo Mα agregatų toksiškumo yra apsaugotos keliais fiziologiniais barjerais. Melanino sintezė yra erdviškai izoliuota – vyksta tik melanosomose, todėl Mα neturi kontakto su ląstelės citozolio baltymais ir kitomis organelėmis. Be to, nuo Pmel17 atskeltas Mα dar kurį laiką lieka disulfidiniu ryšiu prisijungęs prie savo pirmtako ir negali laisvai difunduoti - tai apsaugo nuo agregatyvių monomerų susijungimo į fibriles. Taip pat Mα agregacija yra reguliuojama aplinkos pH (Berson et al., 2001; McGlinchey ir Lee, 2017).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos ir laboratorinė įranga

2.1.1. Medžiagos

- **AB Vilniaus degtinė:** 96 % etanolis;
- **Acros Organics:** 99 % Na_2SO_4, 99,6 % NH_4Cl, 99 % glicerolis, 98,5 % NaOH, 98 % ir 99,7 % GuHCl, NaH_2PO_4, 37 % HCl tirpalas, 50 % NaOH tirpalas, 99,5 % APS, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$;
- **Carl Roth:** 99 % KH_2PO_4, KCl, kazeino hidrolizatas, TRIS, 99 % ampicilino natrio druska, Luria Broth mitybinė terpė, 99 % CH_3COOH, 99 % DTT;
- **Fisher Scientific:** 99,5 % $MgSO_4$, laktozė, imidazolas, K_2HPO_4, glicinas, dekstrozė, TEMED, NDS, triptonas, akrilamido/bis-akrilamido 30 % tirpalas, 99% EDTA, agarozė, DMSO, MES, molekulinės masės žymuo „EZ-RUN prestained Rec protein ladder“, elektroforezės gelių dažas „Ez-Run Protein Gel Staining Solution“, plazmidinės DNR išskyrimo rinkinys „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“;
- **GE Healthcare:** sorbentas „Ni $Sepharose^{TM}$ 6 Fast Flow";
- **Indofine Chemical Company:** flavonoidai, pilnas sąrašas pateiktas priede, 4 lentelėje;
- **Oxoid:** mielių ekstraktas;
- **Sigma-Aldrich:** ANS, EGCG, metileno mėlis, ThT, 98 % $CuSO_4$, 98 % $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$;

2.1.2. Laboratorinė įranga

- 96 šulinėlių mikroplokštelės „Corning“ ir jų sandarinimo juosta „Nunc“;
- Autoklavas „AHS-75N“ (Raypa);
- Atominės jėgos mikroskopas „Dimension Icon“ ir zondas „RTESPA-300“ (Bruker);
- Centrifugos „HiCen SR“, rotoriai AF 6.500 ir AS 4.500 (HeroLab); „Technico Maxi“;
- Chromatografijos sistema „$\ddot{A}KTApurifier$“ (GE Healthcare);
- Chromatografinė kolonėlė „XK 26/20“ (GE Healthcare);
- Dializės žarnos: 49,5 mm skersmens „Zella Trans Roth“ (pralaidumas 6-8 kDA);

- DSF aparatas „nanoDSF“ (nanoTemper Technologies);
- Elektroforezės aparatas „Biometra Minigel-Twin“ su „Biometra PS 300 T“ srovės šaltiniu;
- Filtrai: 0,22 μm ir 0,45 μm porų dydžio „Sartorius Stedim Biotech“ ir „Millipore Stericup“;
- Homogenizatorius „Potter–Elvehjem“ (Fisher Scientific);
- Koncentratoriai „Amicon® Ultra-15“ (pralaidumas 10 kDa);
- Magnetinės maišyklės: „Scientifica ARE“ (Velp), „Ultra Thin Magnetic Stirrer“ (Fisher Scientific), „Maxi Direct“ (VARIOMAG);
- pH metras „Orion DUAL STAR meter“ (Thermo Scientific);
- Plokštelių skaitytuvas „Biotek Synergy H4 Multi-Mode Reader“;
- Purtyklė „KS 4000i“ (IKA);
- Realaus laiko PGR analizatorius „Rotor-Gene Q real-time analyzer“ (GE Healthcare);
- Refraktometras „RL3” (PZO);
- Spektrofotometrai „UV-1800“ (Schimadzu), „Varian Cary Eclipse“;
- Svarstyklės: „PCB 1000-2 (Kern)“, „TP-214“ (Denver Instruments);
- Termostatai: „Ditabis MHR 23“, „IB-15G“, „Mini Dry Bath“ (Fisher Scientific);
- Ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls 3100“ (antgaliai: VS70/T, MS72);
- Vakuuminė filtravimo įranga „Sigma-Aldrich“;
- Vandens valymo sistema „Simplicity UV system“.

2.1.3. Konstruktas

pET303/CT-his plazmidė su hSOD1 ir atsparumo ampicilinui genais įsigyta iš *Invitrogen.*

2.1.4. Kompetentinės ląstelės

E. coli BL21 Star^{TM}(DE3) kamienas, kurio genotipas $F^{\smile}$ *ompT* $hsdS_B$ ($r^{\smile}_B$ $m^{\smile}_B$) *gal dcm rne*131(DE3), naudotas baltymų sintezei. Kamienas įsigytas iš *Invitrogen.*

2.1.5. Mitybinės terpės

- **LB (Luria-Bertani) terpė**: 25 g LB-Medium terpės mišinio ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens. Agarizuotai terpei papildomai pridedama 1,5 % agaro.
- **S.O.C. mitybinė terpė** transformacijai (100-ui ml): 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 3,5 mM KCl, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$ ir 20 mM gliukozės.
- **Autoinduktyvi ZYM-5052 terpė su Cu^{2+} ir Zn^{2+} druskomis**: 1 % (w/v) kazeino hidrolizato, 0,5 % (w/v) mielių ekstrakto, 25 mM Na_2HPO_4, 25 mM KH_2PO_4, 50 mM NH_4Cl, 5 mM Na_2SO_4, 2 mM $MgSO_4$, 0,3 mM $ZnSO_4$ ir 0,3 mM $CuSO_4$, 0,5 % glicerolio, 0,05 % gliukozės, 0,2 % laktozės.

Terpės autoklavuojamos 20 min 1 atm slėgio ir 121 °C temperatūros sąlygomis.

2.1.6. Tirpalai

A buferinis tirpalas: 50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, 100 mM NaCl, pH 7,5

B buferinis tirpalas: 50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, 100 mM NaCl, 0,5 M imidazolo, pH 7,5

C buferinis tirpalas: 100 mM CH_3COOH/CH_3COONa, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 3,8

D buferinis tirpalas: 100 mM CH_3COOH/CH_3COONa, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 3,8

E buferinis tirpalas: 10 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,4

F buferinis tirpalas: 10 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 6 M GuHCl, pH 7,4

G buferinis tirpalas: 10 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 0,5 M GuHCl, 5 mM DTT, pH 7,4

Buferinių tirpalų pH koreguojamas HCl arba NaOH. Visi tirpalai (išskyrus **C**, **D**, **E**) filtruojami per 0,22 μm porų dydžio filtrą. GuHCl koncentracija buferiniame tirpale **F** nustatoma tirpalo lūžio rodiklį matuojant refraktometru, tuomet tirpalas praskiedžiamas tiek, kad galutinė GuHCl koncentracija būtų 6 M.

2.2. Metodai

2.2.1. Plazmidinės DNR transformacija

Į 100 μl atšildytų kompetentinių ląstelių įdedama 1 μl plazmidinės DNR ir 30 min inkubuojama ant ledo. Po inkubacijos ląstelės 90 s laikomos 42 °C termostate; tada 2 min

įdedamos į ledo vonelę. Įpilama 400 μl S.O.C. terpės ir 45 min auginama purtyklėje (37 °C, 220 aps/min). 2 min centrifuguojama 6000 aps./min greičiu. 200 μl l supernatanto nupilama, ląstelės resuspenduojamos likusiame tūryje ir išsėjamos Petri lėkštelėje ant agarizuotos LB terpės su 100 μg/ml ampicilino. Inkubuojama termostate 37 °C 16 val.

2.2.2. Tikslinio baltymo sintezė

Tikslinio baltymo sintezė atliekama naudojant naktinę kultūrą. Naktinė kultūra auginama 100 ml LB terpėje su 100 μl g/ml ampicilino. Į autoklavuotą terpę užsėjama viena bakterijų kolonija, užaugusi po transformacijos. Kultūra auginama purtyklėje (37 °C, 220 aps./min) 16 val. Tuomet į kolbas su mitybinėmis terpėmis ir ampicilinu sėjama naktinė kultūra tūrio santykiu 1:40 ir auginama 37 °C, 220 aps/min. Auginant LB terpėje baltymo sintezė indukuojama 1 mM IPTG, kurio į terpę pridedama kultūrai pasiekus OT_{600} 0,6-0,8. Auginimo sąlygų optimizavimui tam tikrais laiko momentais imami mėginiai ir matuojamas optinis tankis. Užaugintos kultūros centrifuguojamos 20 min 6000 aps./min greičiu +4 °C temperatūroje. Ląstelės plaunamos **A** buferiniu tirpalu.

2.2.3. Baltymų elektroforezė

Baltymų elektroforezė vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis pagal U. K. Laemmli aprašytą metodiką (Laemmli, 1970). Baltymų atskyrimui naudojamas 12 % skiriamasis gelis. Elektroforezė vykdoma esant 150 V įtampos ribai ir 30 mA srovei. Pasibaigus elektroforezei, gelis dažomas „Ez-Run“ gelių dažu per naktį, po to blukinamas distiliuotu vandeniu, kol išryškėja juostelės.

2.2.4. Baltymo gryninimas

Biomasė mechaniškai homogenizuojama **A** buferiniame tirpale. Gautas homogenatas 10 min ardomas ultragarsu, 60 s trukmės impulsais kas 60 s, parinkus 70 % VS70T antgalio galingumą, mėginį šaldant lede. Biomasė centrifuguojama 20 min 18000 aps./min esant +4 °C temperatūrai. Supernatantas sumaišomas su buferiniu tirpalu **A** nulygsvarintu ir $Ni(II)$ pakrautu IMAC sorbentu. Sorbentas su supernatantu paliekami per naktį +4 °C lėtai maišant, kad nusistovėtų pusiausvyra ir tikslinis baltymas histidinine uodega prisijungtų prie imobilizuotų $Ni(II)$ jonų.

Sorbentas pakraunamas į chromatografinę koloną, kuri prijungiama prie chromatografo. Buferiniai tirpalai gryninimui (**A** ir **B**) parinkti remiantis Gazdag et al. (2010) literatūros šaltiniu. 3 ml/min greičiu leidžiamas tirpalas **A**, kol išsiplauna su sorbentu nesąveikaujantys baltymai. Tuomet leidžiamas 10 % laiptinis buferinio tirpalo **B** gradientas (50 mM imidazolo), išplaunami silpnai su sorbentu sąveikaujantys baltymai. Laiptinis gradientas padidinamas iki 40 % (200 mM imidazolo), plaunamas tikslinis baltymas, surenkamos jo frakcijos.

Po chromatografinio gryninimo vykdoma dializė, kuriai **C** ir **D** buferiniai tirpalai parinkti remiantis Chattopadhyay et al. (2008), Stathopulos et al. (2003) šaltiniais ir eksperimentiškai. Surinktos tikslinio baltymo frakcijos sujungiamos į vieną ir 12 valandų dializuojamos tirpale **C**, po to – 2 valandas tirpale **D**. Šio etapo dializės funkcija – gauti SOD1 apofermentą. Esant rūgštiniam pH baltymas dalinai denatūruojamas, todėl netenka Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonų (juos prisijungia EDTA). Antras etapas – 3 valandų trukmės dializės dviejuose **E** tirpaluose, esant tirpalo ir surinktų frakcijų santykiui 100:1. Šio etapo paskirtis – renatūruoti baltymą ir atsikratyti EDTA.

Po dializės baltymas nufiltruojamas per 0,22 μm porų dydžio filtrą ir koncentruojamas iki 5 mg/ml 10 000 Da pralaidumo koncentratoriais esant +4 °C temperatūrai. Išgrynintas ir sukoncentruotas baltymas išpilstomas ir užšaldomas -80 °C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

2.2.5. Baltymo koncentracijos nustatymas

Baltymo koncentracija nustatoma matuojant OT_{280} ir skaičiuojant pagal formulę:

$$C = \frac{A \cdot M}{\varepsilon_{280} \cdot l}, \tag{2}$$

kur A - optinis tankis ties 280 nm, M - baltymo molekulinė masė (16 867,5 Da SOD1 monomerui), ε_{280} - ekstinkcijos koeficientas (5750 cm^{-1} mol^{-1} SOD1 monomerui), l - šviesos kelio ilgis.

2.2.6. Baltymo lydymosi temperatūros nustatymas

Baltymo lydymosi temperatūra nustatoma DSF metodu, matuojant fluorescencinio dažo ANS fluorescencijos emisijos (sužadinimas 365 nm, emisija 460 nm) intensyvumą (Zubriene et al., 2009) arba tirozino ir triptofano fluorescencijos emisijos intensyvumą (sužadinimas 295 nm, emisija 330 ir 350 nm). Matavimai su ANS vyksta buferiniame tirpale **E**, į jį papildomai pridėjus 100 μM ANS. Mėginiai išpilstomi po 30 μl, daroma po 3 pakartojimus. Fluorescencijos emisijos intensyvumas matuojamas realaus laiko PGR analizatoriuje Rotor-Gene Q, temperatūrą keliant 0,5 °C/min greičiu nuo 25 °C iki 99 °C.

Tyr ir Trp fluorescencijos intensyvumai matuojami DSF aparatu nanoDSF; buferiniame tirpale **E**. Baltymo formai su redukuotais disulfidiniais tilteliais gauti naudojami 5 mM DTT. Mėginiai matuojami 10 μl tūrio stikliniuose kapiliaruose, daroma po 3 pakartojimus.

2.2.7. Amiloidinių fibrilių gamyba

SOD1 amiloidinės fibrilės gaminamos 200 μM baltymo monomero 4 paras laikant buferiniame tirpale **G**, kuris gaunamas maišant tirpalus **E** ir **F** bei pridedant 5 mM DTT. Agregacijos buferinis tirpalas su baltymu išpilstomas į 96 šulinėlių mikroplokštelę ir purtomas 600 aps./min +37 °C temperatūroje.

Agregacijos procesas stebimas naudojant amiloidinėms fibrilėms specifinį dažą tioflaviną T, kuris sužadinamas 440 nm banga, o emisija matuojama 460-520 nm bangų srityje (Amdursky et al., 2012). Mėginių su 50 μM tioflavino T fluorescencijos emisija matuojama mikroplokštelių skaitytuve.

2.2.8. Agregacijos kinetikos tyrimai

Spontaninės agregacijos kinetika tiriama tirpale **G** naudojant 200 μM baltymo monomero ir 50 μM ThT. Agregacijos su „sėkla“ kinetikai tirti dedama 190 μM baltymo ir 10 μM (5 %) suformuotų fibrilių, kurios prieš pat tyrimą ardomos ultragarsu 10-15 min 30 s impulsais kas 30 s esant 20 % MS72 antgalio galingumui. Tyrimų su flavonoidais kontrolėms dar įdedama DMSO (galutinė koncentracija 2 %), kadangi pradiniai flavonoidų tirpalai gaminami juos tirpinant 100 % DMSO. Mišiniai išpilstomi po 100 μl į 96 šulinėlių plokšteles, po 3-4 pakartojimus kiekvienam. Plokštelės bent 15 valandų 16 Hz dažniu purtomos mikroplokštelių skaitytuve, +60 °C temperatūroje. Agregacijos procesas stebimas matuojant OT_{800} ir ThT fluorescencijos emisijos intensyvumą kas 5-10 min. ThT sužadinamas 440 nm banga, emisija matuojama ties 480 nm bangos ilgiu.

2.2.9. Atominės jėgos mikroskopija

30 μl mėginio užnešama ant žėručio disko; po 10 min diskas nuplaunamas vandens srove ir išdžiovinamas. Mikroskopija atliekama Dimension Icon mikroskopu, angl. *Tapping-mode* režimu, 300 kHz dažniu. Skanavimo greitis – 0,5-1 Hz, plotas – 5-20 μm, skanavimo kokybė – 512x512 arba 1024x1024 taškų.

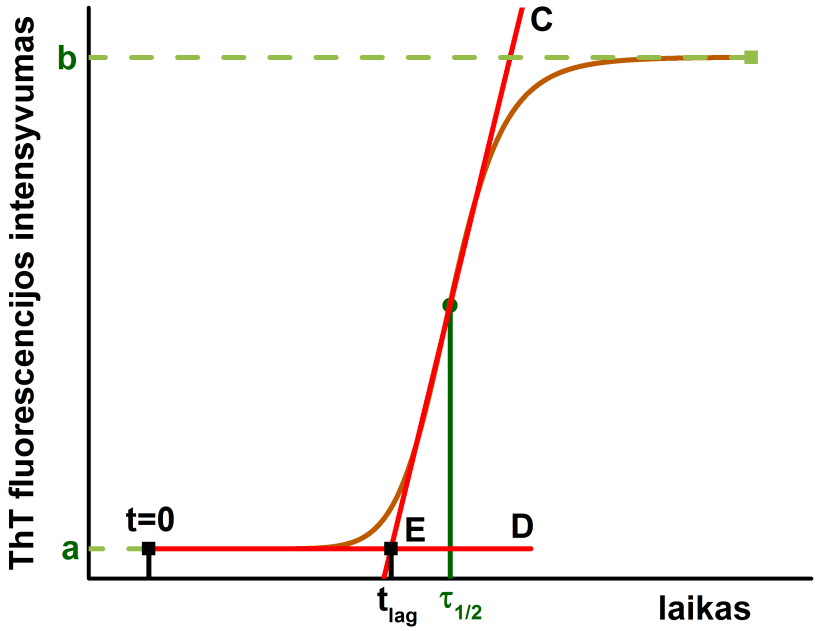
2.2.10. Duomenų apdorojimas

Agregacijos kinetikos duomenys apdorojami naudojant Ms Excel ir Origin 2016 programinę įrangą. Kinetinės kreivės gluodinamos sigmoidine Hilo (angl. *Hill*) lygtimi (3 lygtis, 2.1 pav.):

$$y = a + (b - a)\frac{x^n}{\tau_{1/2}^n + x^n}, \tag{3}$$

kur y - fluorescencijos emisijos intensyvumas laiko momentu x, a - pradinis fluorescen-

cijos emisijos intensyvumas, b - galutinis fluorescencijos emisijos intensyvumas, n - Hilo koeficientas (kreivės išlenktumo rodiklis), $\tau_{1/2}$ - agregacijos puslaikis (laiko momentas, kai mišinyje suagregavę pusė baltymo).



2.1 pav. Sigmoidinės kreivės grafikas

Agregacijos *lag* fazės trukmė randama pagal Nielsen et al. (2001) aprašytą metodiką. Išvedama tiesė ($y = kx + b$) per sigmoidės eksponentinio augimo tiesinę dalį (tiesė **C**) ir sigmoidės pradžioje (tiesė **D**). Tiesių susikirtimo taško **E** koordinatė x ir yra *lag* fazės trukmė.

Eksperimentiniai duomenys normalizuojami pagal lygtį:

$$I_{norm} = \frac{I - I_a}{I_b - I_a} \cdot 100, \tag{4}$$

kur I_{norm} – normalizuoto ThT fluorescencijos emisijos intensyvumo įvertis, I – išmatuotas fluorescencijos emisijos intensyvumas, I_a ir I_b – pradinė ir galutinė fluoresencijos emisijos intensyvumų vertės.

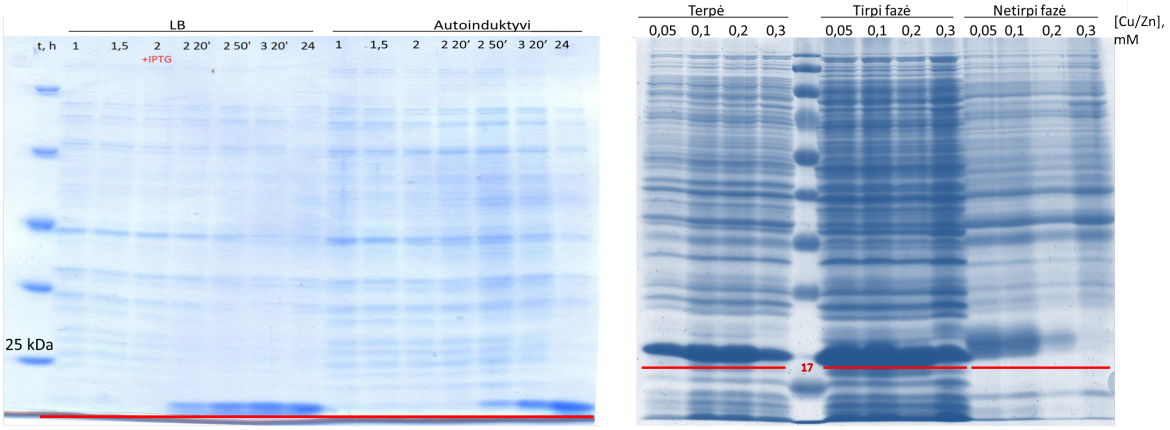
Grafikuose vaizduojamos eksperimentinės kreivės iš 3-4 pakartojimų.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. *E. coli* kultūros auginimo sąlygų optimizavimas SOD1 baltymo sintezei ir baltymo gryninimas

3.1.1. *E. coli* kultūros auginimo sąlygų optimizavimas

Iki šio darbo pradžios laboratorijoje su SOD1 baltymu dirbta nebuvo, todėl nebuvo žinomos optimalios kultūros auginimo sąlygos tikslinio baltymo sintezei. Auginimo sąlygų optimizavimas pradėtas nuo plazmidės pET303/CT-his su *SOD1* genu transformacijos į *E. coli* BL21 Star^{TM}(DE3) kamieną. Iš vieno transformanto užauginta naktinė kultūra LB terpėje su ampicilinu, vėliau naktinė kultūra sėta į šviežias LB ir ZYM-5052 terpes su ampicilinu bei stebėta SOD1 sintezės eiga (3.1a pav.) Tiek LB, tiek autoinduktyvioje terpėje baltymo sintezė prasidėjo beveik tuo pat metu (po 2 val. 20 min ir 2 val. 50 min atitinkamai) nuo užsėjimo. Lyginant abi terpes, baltymo kiekis taip pat panašus. Remiantis šiais pastebėjimais, kultūrą nuspręsta auginti autoinduktyvioje ZYM-5052 terpėje dėl mažesnių darbo sąnaudų (autoinduktyvios terpės nereikia atskirai indukuoti).



(a) Rekombinantinės SOD1 sintezė LB ir ZYM-5052 terpėse.

(b) SOD1 tirpumas esant skirtingai Cu^{2+}/Zn^{2+} jonų koncentracijai.

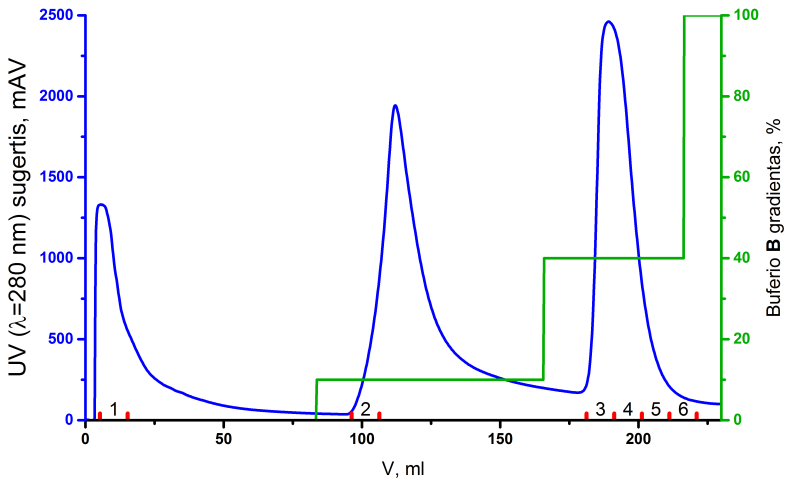
3.1 pav. Auginimo sąlygų optimizavimas.

Auginant kultūrą paprastoje ZYM-5052 terpėje tikslinis baltymas sintetinamas į intarpinius kūnelius. Tokio baltymo gryninimas būtų sudėtingesnis, todėl buvo nuspręsta ieškoti auginimo sąlygų, kuriomis SOD1 būtų sintetinama tirpi. Natyviame baltyme randama Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonų, todėl šių metalų druskų buvo papildomai įdėta į augimo terpę tikintis, kad tokiomis sąlygomis baltymas įgis teisingą struktūrą ir bus sintetinamas tirpus.

Pagal 3.1b pav. pateiktus rezultatus matoma, kad į terpę pridėjus bent po 0,05 mM Cu^{2+} ir Zn^{2+} druskų, SOD1 sintetinama tirpi. Didinant šių druskų kocentraciją, baltymo dalis intarpiniuose kūneliuose mažėja. Tolimesniam auginimui nuspręsta į terpę dėti po 0,3 mM Cu^{2+}/Zn^{2+} druskų, kad kuo didesnė dalis baltymo būtų tirpioje fazėje.

3.1.2. SOD1 gryninimas

Baltymas gryninamas Ni^{2+} jonų gimiringumo chromatografijos metodu, kaip aprašyta 2.2.4 skyrelyje. Tipinė chromatograma pateikta 3.2 pav. Iš sorbento išplaunamas baltyminis turinys stebimas matuojant šviesos (λ=280 nm) sugertį. Pirmiausia plaunant buferiniu tirpalu **A** išsiplauna su sorbentu nesąveikaujantys ląstelės baltymai, paleidus 10 % buferinio tirpalo **B** gradientą – silpnai sąveikaujantys, plaunant 40 % tirpalo **B** gradientu eliuojamas tikslinis baltymas (3-6 frakcijos, po 10 ml kiekviena).



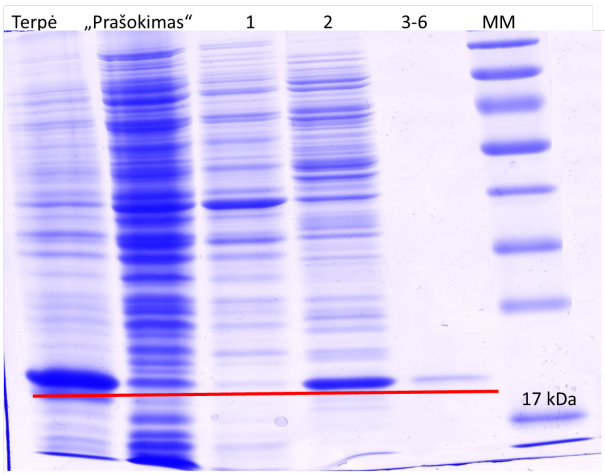
3.2 pav. SOD1 gryninimo chromatograma.

Gryninimo metu surinktos frakcijos analizuojamos NDS-PAAG elektroforezės metodu (2.2.3 skyrelis), elektroforegrama pateikta 3.3 pav. Mėginys iš terpės yra kontrolė, kad prieš gryninimą kultūroje buvo tikslinio baltymo (ryški juostelė šiek tiek aukščiau 17 kDa žymės). „Prašokimas“ – tirpus ląstelių lizatas, kuris neprisijungė prie sorbento ir ištekėjo kolonėlės krovimo metu. Tuo pat metu tai yra kontrolė, kad gryninamas baltymas prisijungė prie sorbento – „prašokime“ jo neturi būti. 1-2 frakcijos – išplauti tyrimams nereikalingi ląstelės baltymai. Tarp jų yra ir tikslinio baltymo, tačiau ši frakcija tolimesniems eksperimentams nenaudojama dėl nepakankamo grynumo. Tolimesniems tyrimams naudojamos tik 3-6 frakcijos, kurių turinys yra dializuojamas, koncentruojamas ir kuriam atliekama kokybės kontrolė.

Iš viso baigiamojo darbo metu užauginta 18,4 l kultūrų, iš kurių surinkta 94,4 g biomasės. Atlikta 15 chromatografinių gryninimų, kurių metu išgryninta 1228 mg švaraus, tinkamo naudoti baltymo.

3.1.3. Išgrynintos SOD1 kokybės kontrolė

Išgryninus baltymą, po dializės yra labai svarbu atlikti kokybės kontrolę, kadangi tolimesniems eksperimentams yra reikalinga apo^{SH} – agregatyviausia baltymo forma. Nustatymui, kokios formos baltymas gaunamas, pasitelkta diferencinė skanavimo fluorimetrija



3.3 pav. Elektroforegrama po gryninimo: mėginiai iš terpės, „prašokimo“, 1, 2 ir 3-6 sujungtų frakcijų. MM - molekulinės masės žymuo.

(2.2.6 skyrelis), o gauti rezultatai palyginti su literatūroje aprašytais (Furukawa et al., 2005).

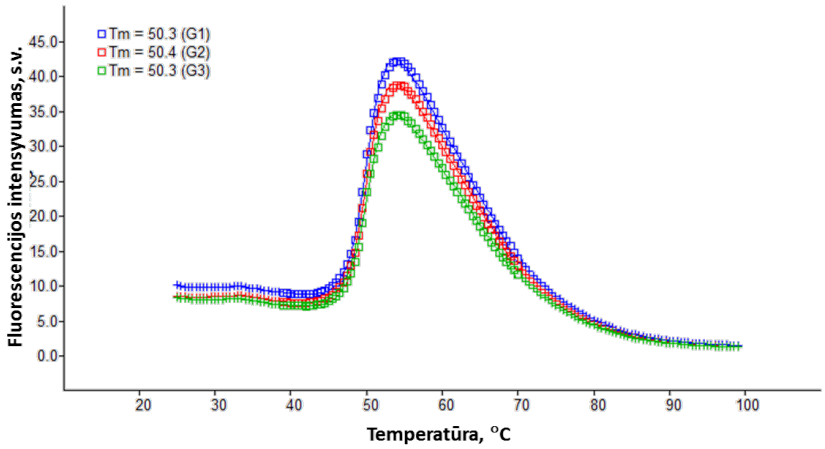
Pradžioje išgryninus baltymą buvo atliekama dializė tirpale **C**, turinčiame 10 mM EDTA, kuris buvo keičiamas du kartus. Išmatavus tokiu būdu gauto baltymo lydymosi temperatūrą, pastebėta, kad ji yra aukštesnė negu turi būti apofermentui (nustatyta 69,1 ± 0,1 °C, kai turi būti 49,8 ± 0,3 °C – 2 lentelė). Visiškam metalų pašalinimui nuspręsta antrą dializės tirpalą **C** pakeisti 50 mM EDTA turinčiu tirpalu **D**. Tokiu būdu gaunamas baltymas jau yra praradęs metalų jonus bei turi oksiduotą disulfidinį tiltelį – apo^{SS} forma (3.4 pav., 2 lentelė, T_m = 50,3 ± 0,1 °C). Papildomai atlikti Trp/Tyr fluorescencijos emisijos matavimo duomenys atitinka fluorescencijos su ANS emisijos matavimo duomenis (2 lentelė).

2 lentelė. SOD1 lydymosi temperatūros.

Duomenys pagal Furukawa et al. (2005)		
Baltymo forma	Redukuotas disulfidinis tiltas	Oksiduotas disulfidinis tiltas
Apofermentas	42,9 ± 0,2	49,8 ± 0,3
Turi 1 Zn	58,4 ± 0,2	74,6 ± 0,2
Eksperimentiniai duomenys		
Metodas	T_m	
ANS fluorescencija	69,1 ± 0,1	50,3 ± 0,1
Trp/Tyr fluorescencija	43,3 ± 0,1	50,6 ± 0,1

Išgrynintas baltymas toliau naudotas amiloidinės agregacijos tyrimams. Kad agreguotų pakankami greitai, SOD1 turi ne tik neturėti metalų jonų, bet ir turėti redukuotą

disulfidinį tiltelį. Disulfidiniam tiltui redukuoti buvo naudojamas DTT. Jo veikimas taip pat įrodytas T_m matavimu. DSF, pagrįsto Trp/Tyr fluorescencija, metodu gauta lydymosi temperatūra 43,3 ± 0,1 °C – tai atitinka literatūroje pateiktą apo^{SH} formos T_m.



3.4 pav. Baltymo lydymosi temperatūros matavimo su ANS kreivė.

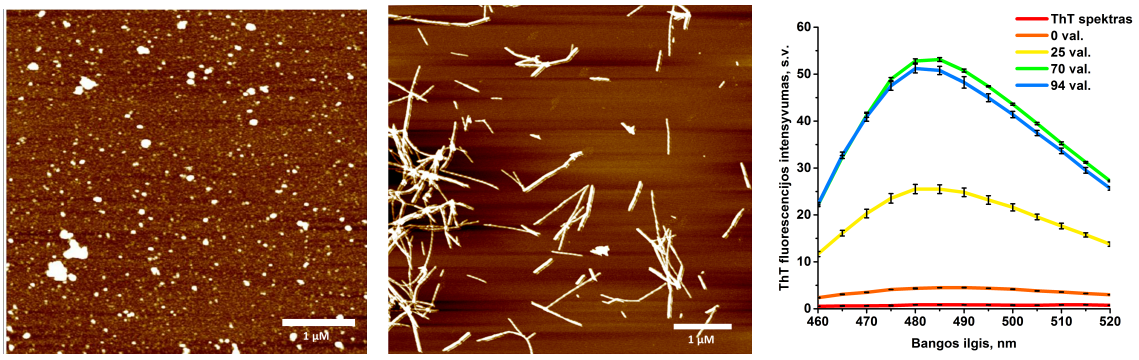
Išgryninto baltymo masė buvo patikrinta masių spektrometrijos būdu; darbą atliko dr. Vytautas Smirnovas. Gauta baltymo masė 16 867,5 ± 1 Da atitinka teorinę 16 867,6 Da masę.

3.2. Agregacijos sąlygų optimizavimas

3.2.1. Spontaninės agregacijos sąlygų optimizavimas

Norint tirti veiksnius, darančius įtaką baltymo amiloidinės agregacijos kinetikai, pirmiausia reikia rasti sąlygas, kuriomis baltymas suagreguoja į amiloidines fibriles. Literatūroje gausu duomenų, kai SOD1 agreguoja į amorfinius agregatus veikiant divalenčių metalų katijonais (Leal et al., 2013, 2015; Li et al., 2013), oksiduojant vandenilio peroksidu ar askorbo rūgštimi (Mulligan et al., 2012; Rakhit et al., 2002). Tuo tarpu agregacija į labai specifinius agregatus, neurodegeneracinėms ligoms būdingas amiloidines fibriles, vyksta tik kiekvienam amiloidiniam baltymui unikaliomis sąlygomis. Yra žinoma, kad apo^{SH} formos SOD1 yra destabilizuota ir formuoja amiloidines fibriles (Furukawa et al., 2004; Hayward et al., 2002; Khare et al., 2004; Oztug Durer et al., 2009). Metalų pašalinimas aptartas 2.2.4 ir 3.1.3 skyreliuose, o disulfidinio tilto redukcijai, remiantis Chattopadhyay et al. (2008) literatūros šaltiniu, pasirinktas ditiotreitolis. DTT veikimu įsitikinta išmatavus SOD1 lydymosi temperatūrą (apo^{SH} T_m yra mažesnė nei apo^{SS} T_m – tai jau aptarta 3.1.3 skyrelyje), tačiau šiomis sąlygomis (37 °C, purtymas, 5 mM DTT) amiloidinių agregatų gauti nepavyko - 3.5a pav. AFM nuotraukoje matomi apvalios formos, keliasdešimties nm skersmens dydžio agregatai nepasižymi fibrilėms būdinga pailga forma. Remiantis laboratorijos darbo su kitais amiloidiniais baltymais patirtimi, nuspręsta į

agregacijos mišinį papildomai įdėti denatūranto GuHCl. GuHCl suardo baltymo antrinę, tretinę, ketvirtinę struktūras ir nukreipia jį amiloidinių agregatų susidarymo keliu (1.4 skyrelis, 1.4 pav.). Šiuo būdu suformuoti agregatai pasižymėjo fibrilėms būdinga išvaizda (pailgi, iki kelių μm ilgio dariniai – 3.5b pav.) ir stiprino ThT fluorescencijos emisijos intensyvumą (3.5c pav.).



(a) Su 5 mM DTT suformuoti agregatai.

(b) Su 0,5 M GuHCl ir 5 mM DTT suformuotos fibrilės.

(c) SOD1 amiloidinių fibrilių ThT spektrai.

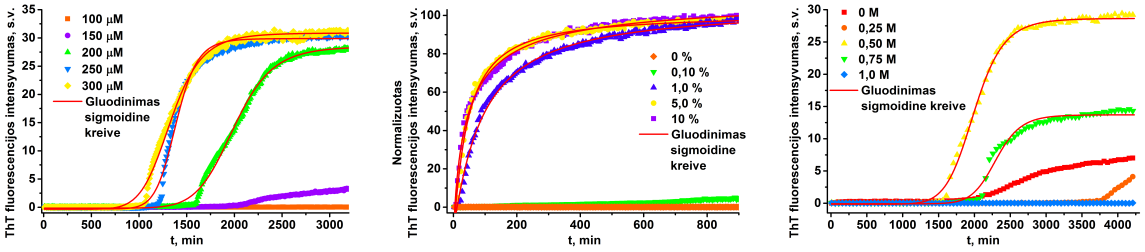
3.5 pav. SOD1 agregatai ir fibrilių ThT fluorescencijos emisijos spektrai.

3.2.2. Agregacijos kinetikos sąlygų optimizavimas

Norint tirti amiloidinės agregacijos kinetikos ypatumus, nepakanka agregacijos mišinyje gauti fibriles, reikia rasti sąlygas, kuriomis jos susidaro per priimtiną laiką (1-3 paros). Kadangi neurodegeneracinių ligų požymiai dažniausiai pasireiškia vėlyvo amžiaus žmonėms, su jomis siejamų baltymų agregacija užtrunka beveik visą gyvenimą – dėl šios priežasties tyrimai fiziologinėmis sąlygomis užtruktų per ilgai. Dažniausiai literatūroje aprašyti SOD1 *in vitro* agregacijos eksperimentai trunka 80 (Chattopadhyay et al., 2008, 2015), 200 (Stathopulos et al., 2003), 400 (Chia et al., 2010) ar net 5000 (Banci et al., 2007) valandų. Sąlygų tokio ilgio eksperimentams laboratorijoje nėra, todėl eksperimentiniu keliu buvo ieškoma būdų, kaip agregaciją dar labiau pagreitinti. Vienas tokių būdų – baltymo koncentracijos didinimas. SOD1 koncentracija ląstelėse yra 100 μM (Banci et al., 2007), o cerebrospinaliniame skystyje – 20 μM (Jacobsson et al., 2001). Remiantis šiais duomenimis parinktos SOD1 koncentracijos ir atliktas agregacijos greičio priklausomybės nuo baltymo koncentracijos tyrimas. Pagal 3.6a pav. rezultatus matoma, kad esant SOD1 koncentracijai 100 μM agregacija dar nesibaigusi ir fibrilių ilgėjimo fazė dar neprasidėjusi, esant 150 μM elongacija prasidėjusi, bet po 3 parų (3200 min) dar nesibaigusi, esant 200-300 μM – pasiektas ThT fluorescencijos intensyvumo įsisotinimas. Kadangi mažiausia koncentracija, kuriai esant pasiekiamas įsisotinimas, yra 200 μM, ši baltymo monomero koncentracija ir pasirinkta tolimesniems tyrimams.

Agregaciją galima pagreitinti į reakcijos mišinį pridėjus suformuotų fibrilių – „sėklos“, tuomet mišinyje dominuoja elongacijos fazė ir stebimas greitas fluorescencijos intensy-

vumo kilimas be *lag* fazės (1.5 pav.). Agregacijos greičio priklausomybės nuo „sėklos“ koncentracijos grafikas pateiktas 3.6b pav. Iš rezultatų matoma, kad mišinyje turi būti bent 1 % fibrilių, kad agregacijos procesas būtų pagreitintas ir baigtųsi per 15 val (900 min). Labiausiai agregaciją greitino 5 % ir 10 % „sėklos“ (agregacijos puslaikiai atitinkamai 100 ± 12 min ir 53 ± 4), tačiau didelio skirtumo kylančioje kreivių dalyje nėra, todėl tolimesniems tyrimams pasirinkta 5 % (10 μM) „sėklos“ koncentracija.



(a) Agregacijos greičio priklausomybė nuo baltymo koncentracijos.

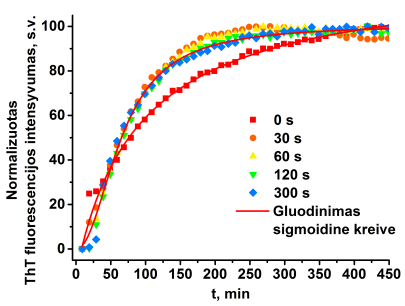
(b) Agregacijos greičio priklausomybė nuo „sėklos“ koncentracijos.

(c) Agregacijos greičio priklausomybė nuo GuHCl koncentracijos.

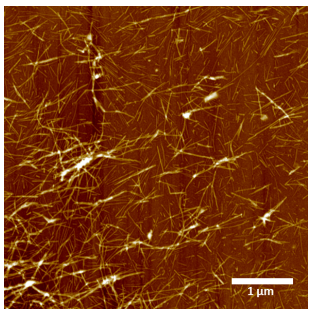
3.6 pav. Agregacijos greičio priklausomybės nuo įvairių veiksnių grafikai.

Kaip minėta 3.2.1 skyrelyje, fibrilės buvo gautos naudojant GuHCl. GuHCl koncentracija agregacijos mišinyje turi būti pakankama, kad baltymas būtų destabilizuotas. Taip pat ir ne per didelė, nes esant per didelei GuHCl koncentracijai elektrostatinės stūmos jėgos tarp denatūrantu apsuptų monomerų nebeleidžia jiems sukibti į fibriles. Optimaliai GuHCl koncentracijai rasti buvo atliktas tyrimas, kurio rezultatai pateikti 3.6c pav. Iš grafiko kreivių matoma, kad nukleacija (*lag* fazė) trunka trumpiausiai (1548 ± 47 min) ir elongacija (fibrilių ilgėjimas) vyksta greičiausiai, kai mišinyje yra 0,50 M GuHCl. Esant didesnėms arba mažesnėms GuHCl koncentracijoms, nukleacijos laikas padidėja kelis kartus arba elongacija išvis neprasideda per tirtą laiką (kreivė su 1,0 M GuHCl). Reikia pastebėti, kad kreivė, gauta nepridėjus guanidino hidrochlorido, atspindi visai kitokio pobūdžio agregatų (3.5a pav.) formavimąsi. Todėl amiloidinių fibrilių kontekste jos parametrai negali būti lyginami su kitų tame pačiame grafike esančių kreivių parametrais.

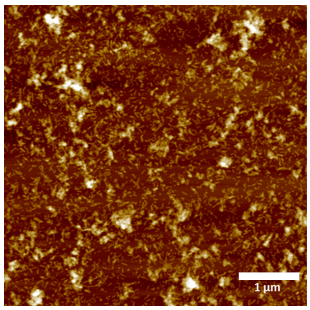
Iš laboratorijos patirties žinoma, kad „sėklos“ veikimas ultragarsu prieš pat eksperimentą padidina „sėklos“ efektyvumą – fibrilės suskaldomos į mažesnes (3.7c pav.), atsiranda daugiau laisvų fibrilių galų, prie kurių gali jungtis baltymo monomerai. Atlikus agregacijos greičio priklausomybės nuo „sėklos“ ardymo ultragarsu laiko tyrimą (3.7a pav.) paaiškėjo, kad veikimas ultragarsu visgi neturi didelės reikšmės fibrilių ilgėjimo greičiui – 300 s ultragarsu paveiktos „sėklos“ $\tau_{1/2}$ sutrumpėja tik 57 minutėmis lyginant su kontrole (0 s). Be to, įsisotinimas stebimas jau po pirmojo 30 s trukmės impulso (paveikus fibriles didesniu impulsų kiekiu, agregacijos puslaikis nebemažėja). Nepaisant to, nuspręsta „sėklą“ ardyti ultragarsu tam, kad fibrilių tirpalas taptų homogeniškesnis ir į agregacijos mišinius pavyktų įdėti vienodą kiekį „sėklos“. Kuo skiriasi ultragarsu neardytos ir ardytos



(a) Agregacijos greičio priklausomybė nuo „sėklos“ veikimo ultragarsu laiko.



(b) Ultragarsu neveiktų fibrilių AFM nuotrauka.



(c) 300 s ultragarsu veiktų fibrilių AFM nuotrauka.

3.7 pav. Ultragarso poveikis fibrilių morfologijai ir kinetikai.

fibrilės, matoma 3.7b ir 3.7c pav.

Aptartų sąlygų agregacijos kreivių parametrai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Agregacijos kreivių parametrai.

Grafikas	Kreivė	$\tau_{1/2}$, min	Lag fazės trukmė, min
3.6a pav.	150 μM	-	2029 ± 40
	200 μM	2258 ± 134	1705 ± 122
	250 μM	1572 ± 92	1323 ± 67
	300 μM	1313 ± 25	1046 ± 33
3.6b pav.	1,0 %	100 ± 12	-
	5,0 %	53 ± 4	-
	10 %	37 ± 2	-
3.6c pav.	0,25 M	-	3671 ± 45
	0,50 M	2231 ± 139	1548 ± 47
	0,75 M	2432 ± 143	2154 ± 112
3.7a pav.	0 s	113 ± 6	-
	300 s	56 ± 4	-

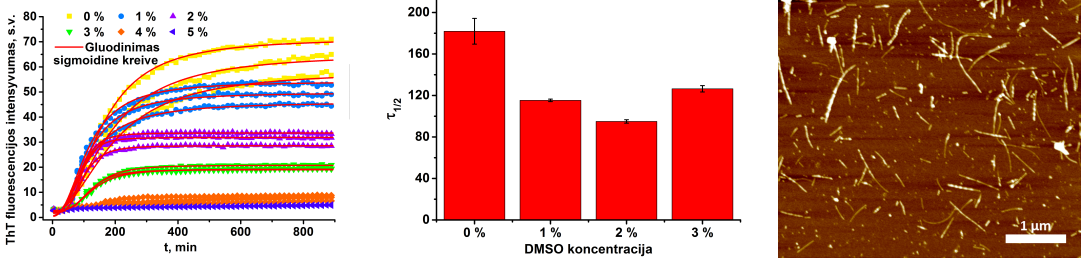
3.3. Slopiklių įtaka SOD1 agregacijos kinetikai

Kaip minėta 1.5 skyrelyje, vaistų, išgydančių ALS, nėra. Literatūroje taip pat yra mažai duomenų, liudijančių apie SOD1 agregacijos slopiklių paieškas. Žinant šią problemą buvo nuspręsta ištirti junginių, slopinančių kitų amiloidinių baltymų agregaciją, poveikį SOD1 fibrilizacijai *in vitro*.

3.3.1. Flavonų įtaka

Yra žinoma, kad flavonų klasės junginiai (flavonoidų struktūrinio motyvo formulė pateikta literatūrinėje dalyje, 1.7b pav.), kurių gausu arbatoje, slopina amiloido β (Marsh et al., 2017) ir modelinio baltymo insulino (Malisauskas et al., 2015) agregaciją. Patikrinus 265 flavonų įtaką insulino agregacijai nustatyta, kad stipriausią slopinimo poveikį turintys flavonai turi bent 3 šonines grupes ir tarp tų trijų grupių yra hidroksi– ir/arba metoksigrupė (Malisauskas et al., 2015). Remiantis šiais kriterijais, tyrimui pasirinkta 112 flavonų (pavadinimų sąrašas pateiktas priede).

Flavonai, struktūriniame motyve turintys benzeno žiedus, yra hidrofobinės medžiagos, todėl buvo tirpinamos su vandeniu besimaišančiame organiniame tirpiklyje DMSO. Todėl prieš atliekant agregacijos eksperimentus su šiais junginiais, reikėjo patikrinti, kokią įtaką SOD1 agregacijai turi DMSO. Flavonus buvo ketinama tikrinti baltymas:flavonas santykiu 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. Tad eksperimentui DMSO kiekis pasirinktas toks, koks bus įneštas kartu su flavonais (atitinkamai 1 %, 2 %, 3 %, 4 % ir 5 %). Agregacijos su „sėkla“



(a) Agregacijos greičio priklausomybė nuo DMSO koncentracijos.

(b) Agregacijos puslaikiai esant skirtingai DMSO koncentracijai.

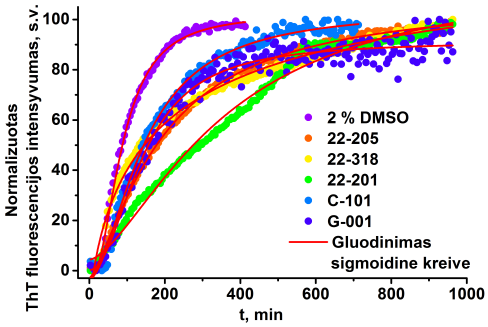
(c) Su 2 % DMSO suformuotos fibrilės.

3.8 pav. DMSO poveikis agregacijos kinetikai ir fibrilių morfologijai.

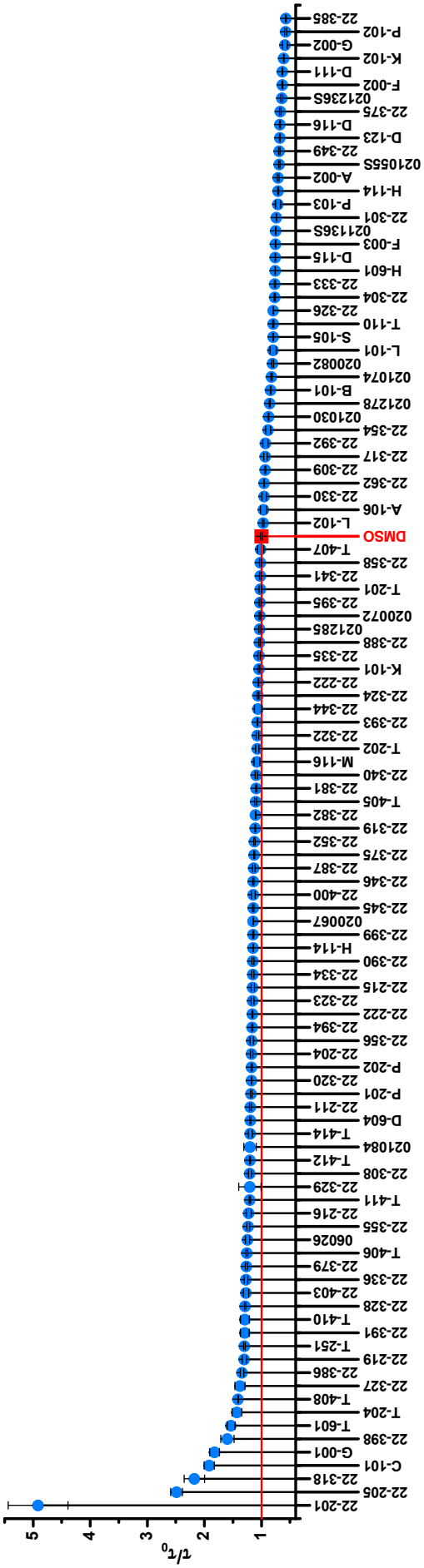
ir DMSO duomenys pateikti 3.8 pav. Iš 3.8a pav. matoma, kad DMSO slopina fibrilėms specifinio dažo ThT fluorescencijos intensyvumą (didėjant DMSO koncentracijai, mažėja maksimalios ThT fluorescencijos įvertis) – tai apriboja flavonų koncentracijas, kurių poveikis gali būti tikrinamas (vykstant dideliam fluorescencijos slopinimui, maksimali ThT fluorescencija mažai skiriasi nuo bazinės ThT fluorescencijos ir tokius rezultatus tampa sunku teisingai interpretuoti). Be to, net 1 % DMSO greitina agregaciją su „sėkla“ (3.8b pav., didėjant DMSO koncentracijai, agregacijos puslaikiai mažėja) – į tai irgi atsižvelgta vertinant tolimesnius rezultatus. Galiausiai svarbu patikrinti, kokią įtaką DMSO turi agregacijos mišinyje gaunamų fibrilių morfologijai. 3.8c pav. pateiktoje AFM nuotraukoje matomos 0,5 - 2 μm ilgio fibrilės, panašios į gaunamas be DMSO (3.7b, 3.13a ir 3.14b pav.).

Patikrinta visų 112 flavonoidų įtaka agregacijai, kai baltymas:slopiklis santykis yra 1:2 (200 μM:400 μM). Tipinės agregacijos kreivės pateiktos 3.9 pav. Santykiniai puslaikiai

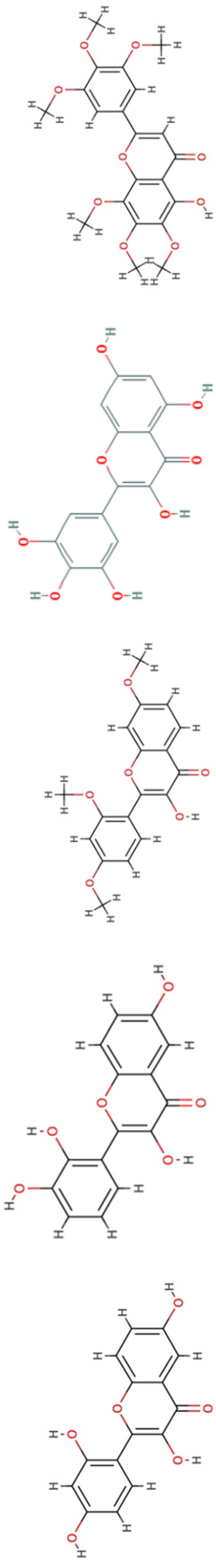
su kontrole, kurioje yra tik DMSO, pateikti 3.10 pav. 7 flavonai iš 112 pasižymėjo stipriu slopinančiu poveikiu (didino agregacijos puslaikį bent 50 %), 65 atvejais buvo matomas silpnas slopinimo efektas ($\tau_{1/2}$ padidėjo iki 50 %). Agregacijos puslaikį didinantys flavonoidai 3.10 pav. atidėti kairiau nuo raudonai pažymėtos kontrolės su DMSO. 1 flavonas neturėjo įtakos agregacijai, tuo tarpu 39 flavonai silpnai greitino SOD1 agregaciją (mažino puslaikį iki 50 %), o stipriai greitinančių flavonų tarp tirtų junginių nebuvo. Agregaciją greitinantį poveikį turintys flavonai 3.10 pav. atidėti dešiniau nuo DMSO kontrolės. 5 didžiausią slopinantį poveikį turinčių flavonų 22-205, 22-318, 22-201, C-101 ir G-001 struktūrinės formulės pateiktos 3.11 pav. Norint detaliau ištirti šių flavonų poveikį agregacijai, reiktų išbandyti skirtingas jų koncentracijas bei išanalizuoti agregatų struktūrą AFM ar IR spektroskopijos metodais.



3.9 pav. Didžiausią poveikį turinčių flavonų įtaka agregacijai.



3.10 pav. Flavonų įtaka SOD1 agregacijos kinetikai su „sėkla“.



(a) 22-205 struktūrinė formulė.

(b) 22-318 struktūrinė formulė.

(c) 22-201 struktūrinė formulė.

(d) C-101 struktūrinė formulė.

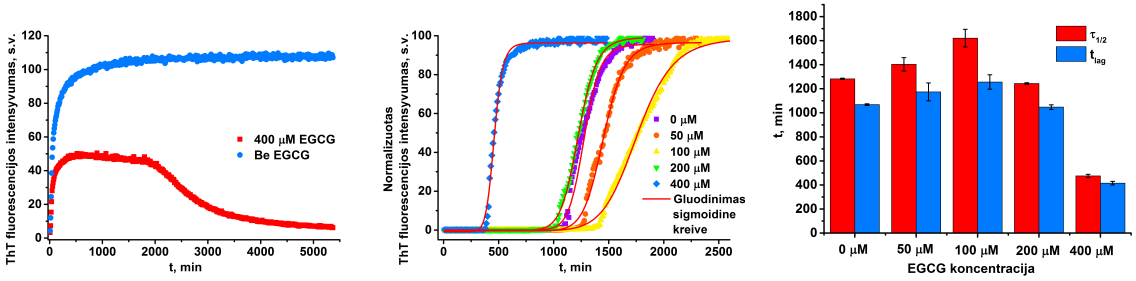
(e) G-001 struktūrinė formulė.

3.11 pav. 5 didžiausią slopinimo efektą turinčių flavonų struktūrinės formulės.

3.3.2. EGCG įtaka

EGCG – gausiausas žaliojoje arbatoje randamas polifenolis. Šis junginys yra plačiai tyrinėjamas kaip amiloidinės agregacijos slopiklis tiek *in vivo*, tiek *in vitro*; yra žinoma jo sąveika su serija amiloidinių baltymų: Aβ, α sinukleinu, hantingtinu, TTR, amilinu, vištos kiaušinio baltymu lizocimu, κ-kazeinu bei kalcitoninu (Stefani ir Rigacci, 2013). Literatūroje eksperimentinių duomenų apie EGCG įtaką SOD1 agregacijai rasti nepavyko. Tačiau rastas straipsnis, kur atlikus kompiuterinio modeliavimo eksperimentus nustatyta, kad EGCG turėtų jungtis su natyviu SOD1 baltymu (Srinivasan ir Rajasekaran, 2017). Tad buvo įdomu sužinoti, kaip EGCG veiks SOD1 agregaciją 2.2 metodų skyriuje aprašytomis sąlygomis ir išbandyti šią medžiagą kaip potencialų SOD1 agregacijos slopiklį.

Eksperimento su šviežiai paruoštu EGCG ir „sėkla“ rezultatai atskleidė, kad SOD1 su EGCG kinetinė kreivė yra tipinės agregacijos su „sėkla“ kreivės pavidalo tik iki 2000-osios minutės (3.12a pav.). Vėliau stebimas laipsniškas ThT fluorescencijos kritimas. Tokie rezultatai perša mintį, kad su EGCG agregacija nukreipiama neamiloidiniu keliu ir susidaro ThT dažą silpniau jungiantys dariniai. Spėjimas pasitvirtino padarius agregatų



(a) Agregacijos kinetika su EGCG ir „sėkla“.

(b) Spontaninės agregacijos kinetika su EGCG.

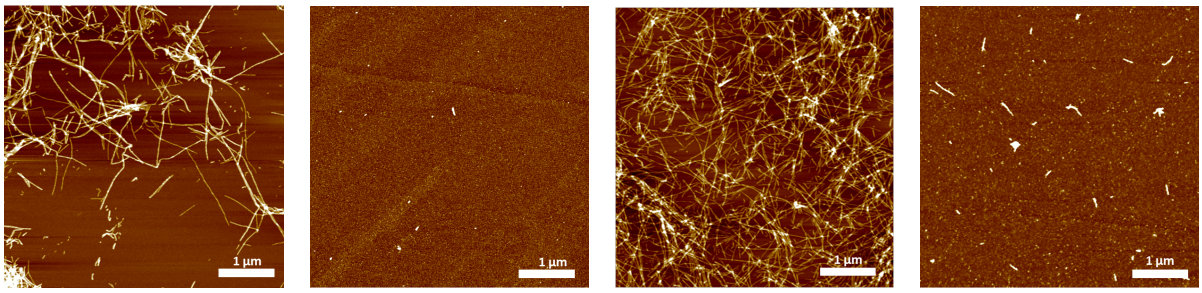
(c) Spontaninės agregacijos kinetikos su EGCG $\tau_{1/2}$ ir t_{lag}.

3.12 pav. SOD1 agregacijos kinetika su EGCG.

AFM nuotrauką (3.13b pav.). Nuotraukoje matomi smulkūs dariniai, nei kiek nepanašūs į kontrolinio eksperimento metu gautas fibriles (3.13a pav.). Amiloidinių baltymų agregatų pertvarkymo (angl. *amyloid remodelling*) efektą veikiant EGCG pastebėjo ir Palhano et al. (2013), agreguojant Aβ, IAPP ir mielių prionui Sup35. Ši tyrėjų grupė taip pat nustatė, kad EGCG amiloidų pertvarkymo efektyvumas didėja jam oksiduojantis. Tai paaiškina, kodėl 3.12a pav. raudonos kreivės fluorescencijos emisijos intensyvumas pradeda kristi tik po 2000 minučių - reikalingas laikas, kad EGCG oksiduotųsi ir pradėtų veikti. EGCG veikimas grindžiamas jo jungimusi prie hidrofobinių sričių baltyme, taip pat Šifo bazių sudarymu su peptidinių grandinių N-galais (Palhano et al., 2013). Ar tikrai EGCG kovalentiškai modifikuoja tirtą baltymą, padėtų nustatyti masių spektrometrija.

Buvo patikrintas ir EGCG poveikis spontaninei SOD1 agregacijai. Pagal 3.12b ir 3.12c pav. pateiktus grafikus matoma, kad esant EGCG koncentracijai iki 100 μM SOD1

agregacija lėtinama (ilgėja *lag* fazė ir didėja $\tau_{1/2}$). Esant 200 μM EGCG, agregacija reikšmingai nesiskiria nuo kontrolinio mėginio, o esant 400 μM EGCG t_{lag} ir $\tau_{1/2}$ sutrumpėja beveik tris kartus – agregacija greitinama. Tokia agregacijos greičio priklausomybė nuo EGCG koncentracijos gali būti aiškinama skirtinga slopiklio sąveika su baltymu. Wang et al. (2012) izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu nustatė, kad esant mažai EGCG koncentracijai, EGCG linkęs sudaryti vandenilinius ryšius su amiloidu β. Esant didelei koncentracijai – vyrauja hidrofobinė sąveika tarp EGCG benzeno žiedų ir baltymo hidrofobinių regionų (Wang et al., 2012). Panaši sąveika galėtų būti tarp EGCG ir SOD1: EGCG vandeniliniais ryšiais gali jungtis su baltymu ir taip trukdyti peptidinėms grandinėms jungtis į amiloidines fibriles. Tuo tarpu esant didelei EGCG koncentracijai, slopiklis gali būti linkęs sudaryti vandenilinius ryšius tarpusavyje, o su SOD1 sąveikauti hidrofobine sąveika – taip pašalinti vandenį nuo baltymo hidrofobinių regionų ir palengvinti jų sukibimą į agregatus. Agregatų, spontaniškai gautų su EGCG, AFM nuotraukoje (3.13d



(a) Fibrilės, suformuotos be EGCG, su „sėkla“.

(b) Agregatai, gauti su 400 μM EGCG ir „sėkla“.

(c) SOD1 fibrilės, gautos be EGCG.

(d) Agregatai, gauti su 400 μM EGCG spontaninės agregacijos metu.

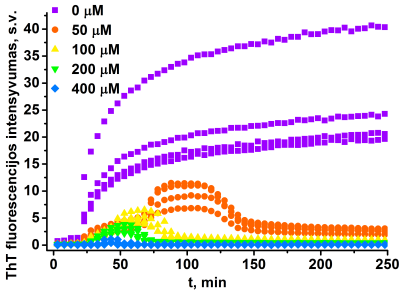
3.13 pav. Agregatų, gautų su ir be EGCG, AFM nuotraukos.

pav.) matomi įvairaus pobūdžio dariniai: tiek trumpos fibrilės, tiek apvalūs agregatai. Apvalūs agregatai galėtų būti stabilizuoti baltymo oligomerai (toks EGCG veikimo efektas parodytas su baltymu amilinu (Nedumpully-Govindan et al., 2016)). Tad padaryti tikslią išvadą apie EGCG poveikį SOD1 agregacijai yra sunku, kadangi visų pirma nėra aišku, kokia EGCG forma – oksiduota ar neoksiduota – ir kaip sąveikauja su baltymu, kokias tarpines agregacijos formas stabilizuoja bei ar nuo pat agregacijos pradžios nukreipia baltymą neamiloidinės agregacijos keliu, ar vėliau.

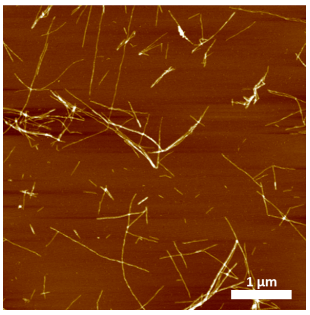
3.3.3. Metileno mėlio įtaka

Dar vienu tyrimų objektu pasirinktas histologinis audinių dažas metileno mėlis, veikiantis Aβ agregacijos procesą (Necula et al., 2007). Atliktas agregacijos greičio priklausomybės nuo metileno mėlio koncentracijos tyrimas su „sėkla“, kurio rezultatai pateikti 3.14a pav. Iš šio grafiko duomenų matoma, kad kaip ir EGCG atveju, agregacijos kreivės

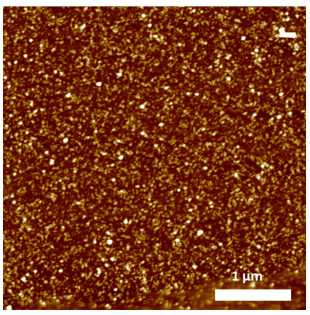
su metileno mėliu nėra tipinio sigmoidės pavidalo – esant bent 50 μM metileno mėlio, ThT fluorescencijos emisijos intensyvumas pakyla ir ima leistis. Priklausomai nuo slopiklio koncentracijos, susidaro skirtingo dydžio „kalneliai“ (3.14a pav.). Padarius mėginio



(a) Agregacijos kinetika su metileno mėliu ir „sėkla“.



(b) Fibrilės, gautos SOD1 agreguojant su „sėkla“.



(c) SOD1 Agregatai, gauti su 400 μM metileno mėlio ir „sėkla“.

3.14 pav. Metileno mėlio įtaka SOD1 agregacijos kinetikai ir agregatų morfologijai.

AFM nuotrauką (3.14c pav.) paaiškėjo, kad susidaro maži, apvalūs agregatai. Metileno mėlis, kaip ir EGCG, galimai veikia kaip veiksnys, nukreipiantis baltymą neamiloidinių agregatų susidarymo kryptimi – tokį poveikį mėlis turi Aβ agregacijos procesui (Necula et al., 2007). Iš 3.14a pav. grafiko matoma, kad stebimo proceso pradžioje fibrilės buvo linkusios ilgėti – ThT fluorescencijos emisijos intensyvumas kilo. Vėliau jis galėjo imti kristi dėl fibrilių ardymo ar pertvarkymo veikiant metileno mėliui - susidarę kitokio tipo agregatai silpniau jungė ThT dažą. Galiausiai ThT fluorescencijos emisijos intensyvumas pasiekė bazinę liniją, kai agregacijos mišinyje nebeliko įprastų SOD1 fibrilių. Apie pasibaigusį procesą liudija ir 3.14c nuotrauka, kurioje nesimato kitokios rūšies agregatų, išskyrus apvalius oligomerus, juo labiau pačių fibrilių.

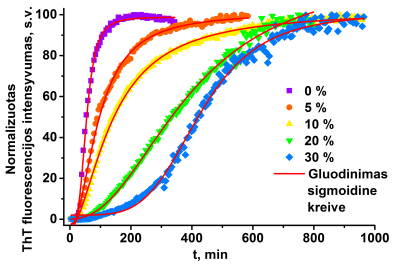
Norint daugiau sužinoti apie susidariusius naujo tipo agregatus metileno mėlio ar EGCG veikimo atveju, reikėtų patikrinti jų gebėjimą inicijuoti elongaciją (veikimą kaip „sėkla“), ištirti toksiškumą ląstelėms ar gebėjimą ardyti membranas. Taip pat, norint geriau išsiaiškinti potencialių slopiklių veikimą, reikėtų patikrinti jų gebėjimą ardyti jau suformuotas fibriles bei atlikti spontaninės agregacijos tyrimus pasirenkant įvairias slopiklio koncentracijas.

3.3.4. Etanolio įtaka

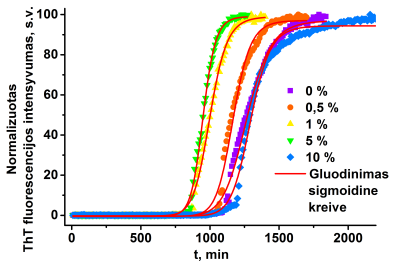
Yra žinoma, kad saikingas alkoholio vartojimas teigiamai veikia nervų sistemą bei mažina riziką susirgti ALS (E et al., 2016; Ji et al., 2015). Žinant šią sąsają, nuspręsta patikrinti, ar etanolis turi tiesioginės įtakos SOD1 agregacijai.

Atliktas eksperimentas naudojant „sėklą“ ir EtOH koncentracijas iki 30 % (3.15a pav.) Iš pateiktų duomenų matoma, kad didėjant etanolio koncentracijai, $\tau_{1/2}$ didėja ir esant 30 % EtOH lyginant su kontrole išauga beveik 9 kartus (3.15c pav.) – agregacijos greitis

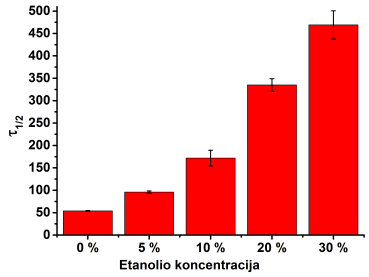
lėtinamas. Padarius AFM nuotrauką nustatyta, kad susidarė fibrilės (3.16b pav.) Slopinantis etanolio efektas fibrilizacijai buvo parodytas agreguojant Aβ *in vitro*, taip pat nustatyta, kad su etanoliu suformuotos fibrilės yra mažiau toksiškos ląstelių kultūroms (Ormeno et al., 2013).



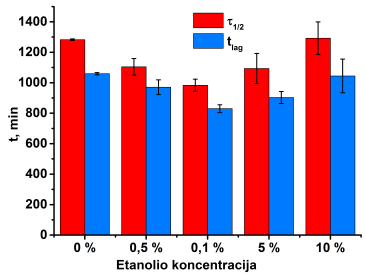
(a) Agregacijos su „sėkla“ ir EtOH kinetika.



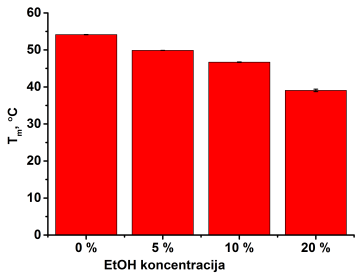
(b) Spontaninės agregacijos su EtOH kinetika.



(c) Agregacijos su „sėkla“ $\tau_{1/2}$.



(d) Spontaninės agregacijos $\tau_{1/2}$ ir t_{lag}.



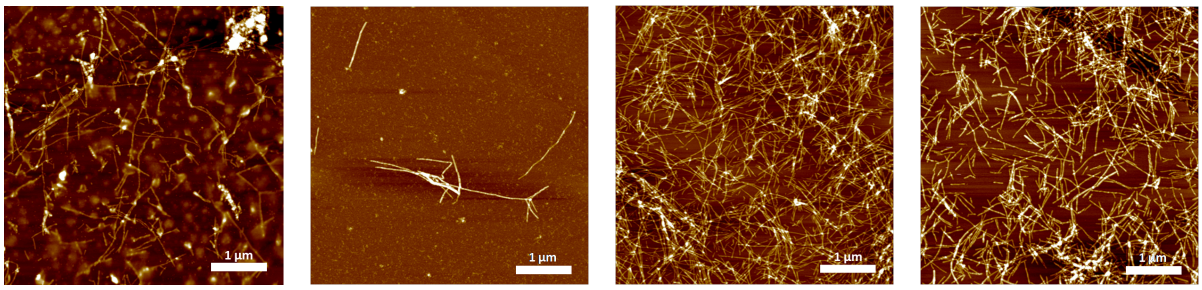
(e) SOD1 T_m priklausomybė nuo EtOH koncentracijos.

3.15 pav. EtOH poveikis SOD1 agregacijos kinetikai ir baltymo T_m.

Atliktas ir spontaninės agregacijos greičio priklausomybės nuo EtOH koncentracijos tyrimas, kurio rezultatai pateikti 3.15b ir 3.15d pav. Aiškią agregacijos greičio priklausomybę nuo EtOH koncentracijos pavyko nustatyti tik esant EtOH koncentracijai iki 5 % – duomenys, gauti mišinyje esant 10 % EtOH, atsikartoja prastai ir jų išsibarstymas didelis (3.15d pav.). Prastas rezultatų atsikartojamumas yra didelė problema SOD1 agregacijos, ypač spontaninės, tyrimuose. Tai galėjo lemti tiek prietaisų matavimo tikslumas, tiek etanolio garavimo problema, tiek pačios agregacijos stochastiškumas (atsitiktinumas) (Abdolvahabi et al., 2016). Tad lyginant su kontrole, pakanka į mišinį įdėti vos 0,5 % EtOH, kad sutrumpėtų t_{lag} ir sumažėtų $\tau_{1/2}$. Spontaninės agregacijos mišinyje taip pat susidarė fibrilės (3.16d pav.).

Taip pat buvo patikrinta, ar EtOH sąveikauja su SOD1 apofermentu. Išmatuota baltymo lydymosi temperatūra esant skirtingoms etanolio koncentracijoms (3.15e pav.). Etanolis veikia kaip SOD1 destabilizuojanti medžiaga – didėjant jo koncentracijai baltymo T_m mažėja ir esant 20 % EtOH, nuo kontrolinio bandymo metu išmatuotos T_m ji skiriasi 10-čia laipsnių (3.15e pav.).

Etanolio į agregacijos mišinius dėta daug, tad jis greičiausiai veikia kaip tirpiklis, keičiantis agregacijos terpės savybes (Dzwolak et al., 2005). Tyrimo su „sėkla“ atveju etanolis



(a) SOD1 fibrilės, gautos be EtOH, pridėjus „sėklos“.

(b) Fibrilės, gautos su 30 % EtOH, pridėjus „sėklos“.

(c) Spontaninė SOD1 agregacija, be EtOH.

(d) Fibrilės, gautos spontaniniškai suagregavus SOD1 su 30 % EtOH.

3.16 pav. Fibrilių, gautų su ir be EtOH, AFM nuotraukos.

galėjo pasireikšti „sėklos“ veikimo efektyvumo mažinimu (apsupo fibriles ir neleido monomerams jungtis prie jų galų) – dėl to sulėtėjo elongacija. Spontaninės agregacijos metu galėjo dominuoti etanolio poveikis monomerui (nes „sėklos“ iš pradžių mišinyje nebuvo). EtOH, sudarydamas vandenilinius ryšius su baltymo monomerais, galėjo pakeisti krūvį turintį guanidiną, sumažinti elektrostatinės stūmos jėgas ir taip palengvinti monomerų jungimąsi į fibriles.

Norint daugiau sužinoti apie etanolio poveikį, reiktų plačiau ištirti susidariusias fibriles – jų struktūra gali skirtis nuo be etanolio gautų SOD1 fibrilių; taip pat jos gali būti mažiau toksiškos, kaip amiloido β atveju (Ormeno et al., 2013).

4. Išvados

1. Optimali terpė SOD1 sintezei *E. coli* - ZYM-5052 su 0,3 mM $ZnSO_4$ ir 0,3 mM $CuSO_4$.

2. Darbo metu išgryninta 1228 mg švaraus SOD1 baltymo.

3. Optimalios sąlygos fibrilių gavybai ir agregacijos kinetikai stebėti: 200 μM baltymo monomero, 5 mM DTT, 0,5 M GuHCl ir 5 % „sėklos“.

4. 114 iš 115 tirtų junginių darė įtaką SOD1 agregacijos kinetikai.

Vilniaus Universitetas
Chemijos ir Geomokslų Fakultetas

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė
Greta Musteikytė

Baigiamasis bakalauro darbas

Rekombinantinės žmogaus superoksido dismutazės I gryninimas ir agregacijos tyrimai

Santrauka

Amiotrofinė lateralinė sklerozė – mirtina neurodegeneracinė liga, kuri dažniausiai siejama su žmogaus superoksido dismutazės I (hSOD1) amiloidinių agregatų kaupimusi nervų sistemoje. Viena iš strategijų tokio tipo ligų gydymui yra agregacijos slopiklių paieška, kurios pradinis žingsnis – agregacijos tyrimai *in vitro*.

Šio darbo metu chromatografijos metodu išgryninta 1228 mg švaraus, tyrimams tinkamo rekombinantinio hSOD1 baltymo, optimizuotos jo agregatų gavimo ir agregacijos kinetikos stebėjimo sąlygos. Fluorescencinės spektroskopijos ar atominės jėgos mikroskopijos metodais patikrinta 115 medžiagų įtaka agregacijai ir agregatų struktūrai.

Atlikus tyrimus paaiškėjo, kad etanolis, metileno mėlis ir EGCG galimai nukreipia SOD1 agregaciją neamiloidiniu keliu ir/arba daro įtaką agregacijos kinetikai. 7 iš 112 tirtų flavonų pasižymi stipriu, agregaciją slopinančiu poveikiu.

Vilnius, 2017

Vilnius University
Faculty of Chemistry and Geosciences

IVth year student of Biochemistry Bsc

Greta Musteikytė

Bachelor Thesis

Purification and aggregation of recombinant human superoxide dismutase I.

Summary

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease, mostly linked to amyloid-like aggregation of human superoxide dismutase I (hSOD1). No effective cure for ALS has been developed for now. One of the strategies for development of therapeutics is looking for potential aggregation inhibitors *in vitro*.

During this work 1228 mg of recombinant hSOD1 was chromatographically purified. Conditions for hSOD1 amyloid-like aggregation and aggregation kinetics were optimized. Finally, the impact of 115 compounds for aggregation kinetics and aggregate structure was tested by the use of fluorescence spectroscopy and atomic force microscopy.

The results have shown that ethanol, methylene blue and EGCG act as amyloid remodelling agents and/or affects hSOD1 aggregation kinetics. 7 of 112 tested flavone derivatives are strong inhibitors of hSOD1 aggregation.

Vilnius, 2017

Literatūros sąrašas

Abdolvahabi, A., Shi, Y., Chuprin, A., Rasouli, S., ir Shaw, B. F. (2016). Stochastic formation of fibrillar and amorphous superoxide dismutase oligomers linked to amyotrophic lateral sclerosis. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(6):799–810.

Amdursky, N., Erez, Y., ir Huppert, D. (2012). Molecular Rotors: What Lies Behind the High Sensitivity of the Thioflavin-T Fluorescent Marker. *Accounts of Chemical Research*, 45(9):1548–1557.

Antonyuk, S. V., Strange, R. W., Marklund, S. L., ir Hasnain, S. S. (2009). The structure of human extracellular copper–zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: Insights into heparin and collagen binding. *Journal of Molecular Biology*, 388(2):310 – 326.

Arthur, K. C., Calvo, A., Price, T. R., Geiger, J. T., Chio, A., ir Traynor, B. J. (2016). Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nature Communications*, 7:12408.

Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Kozyreva, T., Massagni, C., Palumaa, P., Rubino, J. T., ir Zovo, K. (2012). Human superoxide dismutase 1 (hSOD1) maturation through interaction with human copper chaperone for SOD1 (hCCS). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34):13555–13560.

Banci, L., Bertini, I., Durazo, A., Girotto, S., Gralla, E. B., Martinelli, M., Valentine, J. S., Vieru, M., ir Whitelegge, J. P. (2007). Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: a possible general mechanism for familial ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27):11263–11267.

Barnhart, M. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60(1):131–147.

Barondeau, D. P., Kassmann, C. J., Bruns, C. K., Tainer, J. A., ir Getzoff, E. D. (2004). Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*, 43(25):8038–8047.

Berson, J. F., Harper, D. C., Tenza, D., ir Marks, M. S. (2001). Pmel17 Initiates Premelanosome Morphogenesis within Multivesicular Bodies. 12(November):3451–3464.

Boillée, S., Vande Velde, C., ir Cleveland, D. W. (2006). ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron*, 52(1):39–59.

Boston-Howes, W., Gibb, S. L., Williams, E. O., Pasinelli, P., Brown, R. H., ir Trotti, D. (2006). Caspase-3 Cleaves and Inactivates the Glutamate Transporter EAAT2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20):14076–14084.

Brumshtein, B., Esswein, S. R., Salwinski, L., Phillips, M. L., Ly, A. T., Cascio, D., Sawaya, M. R., ir Eisenberg, D. S. (2015). Inhibition by small-molecule ligands of formation of amyloid fibrils of an immunoglobulin light chain variable domain. *eLife*, 4:e10935.

Buell, A. K., Dobson, C. M., ir Knowles, T. P. (2014). The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation. *Essays In Biochemistry*, 56:11–39.

Chattopadhyay, M., Durazo, A., Sohn, S. H., Strong, C. D., Gralla, E. B., Whitelegge, J. P., ir Valentine, J. S. (2008). Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48):18663–8.

Chattopadhyay, M., Nwadibia, E., Strong, C. D., Gralla, E. B., Valentine, J. S., ir Whitelegge, X. J. P. (2015). The Disulfide Bond, but Not Zinc or Dimerization, Controls Initiation and Seeded Growth in Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Cu, Zn Superoxide Dismutase (SOD1). 290(51):30624–30636.

Cheng, B., Gong, H., Xiao, H., Petersen, R. B., Zheng, L., ir Huang, K. (2013). Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: A therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(10):4860 – 4871.

Chia, R., Tattum, M. H., Jones, S., Collinge, J., Fisher, E. M. C., ir Jackson, G. S. (2010). Superoxide dismutase 1 and tgSOD1G93A mouse spinal cord seed fibrils, suggesting a propagative cell death mechanism in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 5(5).

Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F. H., Dijkhuizen, L., ir Wösten, H. A. (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils. *Genes & Development*, 17(14):1714–1726.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., ir Adamson, J. e. a. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2):245–256.

Dzwolak, W., Grudzielanek, S., Smirnovas, V., Ravindra, R., Nicolini, C., Jansen, R., Loksztejn, A., Porowski, S., ir Winter, R. (2005). Ethanol-perturbed amyloidogenic self-assembly of insulin: Looking for origins of amyloid strains. *Biochemistry*, 44(25):8948–8958.

E, M., Yu, S., Dou, J., Jin, W., Cai, X., Mao, Y., Zhu, D., ir Yang, R. (2016). Association between alcohol consumption and amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis of five observational studies. *Neurological Sciences*, 37(8):1203–1208.

Eisele, Y. S., Monteiro, C., Fearns, C., Encalada, S. E., Wiseman, R. L., Powers, E. T., ir Kelly, J. W. (2015). Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(11):759–780.

Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E., ir Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid - from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(5):217–224.

Furukawa, Y., O'Halloran, T. V., ir Biology, C. (2005). Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo- and reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17):17266–17274.

Furukawa, Y., Torres, A. S., ir O'Halloran, T. V. (2004). Oxygen-induced maturation of sod1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone ccs. *The EMBO Journal*, 23(14):2872–2881.

Gazdag, E. M., Cirstea, I. C., Breitling, R., Lukeš, J., Blankenfeldt, W., ir Alexandrov, K. (2010). Purification and crystallization of human Cu/Zn superoxide dismutase recombinantly produced in the protozoan Leishmania tarentolae. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(8):871–877.

Gebbink, M. F., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L., ir Wosten, H. A. B. (2005). Amyloids – a functional coat for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4):333–341.

Hardy, J. ir Higgins, G. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054):184–185.

Hartl, F. U., Bracher, A., ir Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356):324–332.

Hawe, A., Sutter, M., ir Jiskoot, W. (2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical Research*, 25(7):1487–1499.

Hayward, L. J., Rodriguez, J. A., Kim, J. W., Tiwari, A., Goto, J. J., Cabelli, D. E., Valentine, J. S., ir Brown, R. H. (2002). Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18):15923–15931.

Jacobsson, J., Jonsson, P. A., Andersen, P. M., Forsgren, L., ir Marklund, S. L. (2001). Superoxide dismutase in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients with and without CuZn-superoxide dismutase mutations. *Brain*, 124(7):1461.

Ji, J., Sundquist, J., ir Sundquist, K. (2015). Association of alcohol use disorders with amyotrophic lateral sclerosis: a swedish national cohort study. *European Journal of Neurology*, 23(2):270–275.

Katz, J. S. (2015). Amyotrophic Lateral Sclerosis : A Historical Perspective. *Neurologic Clinics of NA*, 33(4):727–734.

Khare, S. D., Caplow, M., ir Dokholyan, N. V. (2004). The rate and equilibrium constants for a multistep reaction sequence for the aggregation of superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42):15094–15099.

Kranenburg, O., Bouma, B., Kroon-Batenburg, L. M., Reijerkerk, A., Wu, Y.-P., Voest, E. E., ir Gebbink, M. F. (2002). Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-β structure receptor. *Current Biology*, 12(21):1833 – 1839.

Kumar, S. ir Walter, J. (2011). Phosphorylation of amyloid beta (aβ) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in alzheimer's disease. *Aging*, 3(8):803–812.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.

Leal, S. S., Cardoso, I., Valentine, J. S., ir Gomes, C. M. (2013). Calcium Ions Promote Superoxide Dismutase 1 (SOD1) Aggregation into Non-fibrillar Amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, 288(35):25219–25228.

Leal, S. S., Cristovao, J. S., Biesemeier, A., Cardoso, I., ir Gomes, C. M. (2015). Aberrant zinc binding to immature conformers of metal-free copper, zinc superoxide dismutase triggers amorphous aggregation. *Metallomics*, 7(2):333–346.

Li, C., Xu, W.-C., Xie, Z.-S., Pan, K., Hu, J., Chen, J., Pang, D.-W., Yang, F.-Q., ir Liang, Y. (2013). Cupric ions induce the oxidation and trigger the aggregation of human superoxide dismutase 1. *PLoS ONE*, 8(6):e65287.

Limpert, A. S., Mattmann, M. E., ir Cosford, N. D. P. (2013). Recent progress in the discovery of small molecules for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9:717–732.

Mackenzie, I. R., Rademakers, R., ir Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*, 9(10):995–1007.

Malisauskas, R., Botyriute, A., Cannon, J. G., ir Smirnovas, V. (2015). Flavone derivatives as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation. *PLOS ONE*, 10(3).

Maniecka, Z. ir Polymenidou, M. (2015). From nucleation to widespread propagation: A prion-like concept for als. *Virus Research*, 207:94 – 105.

Marsh, D. T., Das, S., Ridell, J., ir Smid, S. D. (2017). Structure-activity relationships for flavone interactions with amyloid β reveal a novel anti-aggregatory and neuroprotective effect of 2',3',4'-trihydroxyflavone (2-D08). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.

Mathis, S., Couratier, P., Julian, A., Corcia, P., ir Masson, G. L. (2017). Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regeneration Research*, 12(2):181–184.

Mattiazzi, M., DÁurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M. F., ir Manfredi, G. (2002). Mutated Human SOD1 Causes Dysfunction of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33):29626–29633.

McCord, J. M. ir Fridrowich, I. (1969). Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The journal of biological chemistry*, 244(22):6049–6055.

McGlinchey, R. P. ir Lee, J. C. (2017). Reversing the amyloid trend: Mechanism of fibril assembly and dissolution of the repeat domain from a human functional amyloid. *Israel Journal of Chemistry*.

Miller, A.-F. (2011). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586(5):585–595.

Miller, R. G., Mitchell, J. D., ir Moore, D. H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A., ir Santillo, M. (2016). The Cu, Zn Superoxide Dismutase: Not Only a Dismutase Enzyme. *Frontiers in Physiology*, 7:594.

Mulligan, V. K., Kerman, A., Laister, R. C., Sharda, P. R., Arslan, P. E., ir Chakrabartty, A. (2012). Early Steps in Oxidation-Induced SOD1 Misfolding: Implications for Non-Amyloid Protein Aggregation in Familial ALS. *Journal of Molecular Biology*, 421(4-5):631–652.

Necula, M., Breydo, L., Milton, S., Kayed, R., van der Veer, W. E., Tone, P., ir Glabe, C. G. (2007). Methylene blue inhibits amyloid beta oligomerization by promoting fibrillization. *Biochemistry*, 46(30):8850–8860.

Nedumpully-Govindan, P., Kakinen, A., Pilkington, E. H., Davis, T. P., Chun Ke, P., ir Ding, F. (2016). Stabilizing Off-pathway Oligomers by Polyphenol Nanoassemblies for IAPP Aggregation Inhibition. *Scientific Reports*, 6(1).

Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., Uversky, V. N., ir Fink, A. L. (2001). Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*, 40(20):6036–6046.

Ormeno, D., Romero, F., Lopez-Fenner, J., Avila, A., Martinez-Torres, A., ir Parodi, J. (2013). Ethanol reduces amyloid aggregation in vitro and prevents toxicity in cell lines. *Archives of Medical Research*, 44(1):1–7.

Oztug Durer, Z. A., Cohlberg, J. A., Dinh, P., Padua, S., Ehrenclou, K., Downes, S., Tan, J. K., Nakano, Y., Bowman, C. J., Hoskins, J. L., Kwon, C., Mason, A. Z., Rodriguez, J. A., Doucette, P. A., Shaw, B. F., ir Valentine, J. S. (2009). Loss of metal ions, disulfide reduction and mutations related to familial ALS promote formation of amyloid-like aggregates from superoxide dismutase. *PLoS ONE*, 4(3).

Palhano, F. L., Lee, J., Grimster, N. P., ir Kelly, J. W. (2013). Toward the Molecular Mechanism(s) by Which EGCG Treatment Remodels Mature Amyloid Fibrils. *Journal of the American Chemical Society*, 135(20):7503–7510.

Perrett, S. (2014). *Amyloids in health and disease*. Portland Press Limited, 1 edition.

Peters, O. M. ir Brown Jr, R. H. (2015). Neurobiology of brain disorders. *Elsevier Science Publishing*, 1:262–279.

Rakhit, R., Cunningham, P., Furtos-Matei, A., Dahan, S., Qi, X.-f. F., Crow, J. P., Cashman, N. R., Kondejewski, L. H., ir Chakrabartty, A. (2002). Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49):47551–47556.

Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., ir Myllykangas, L. e. a. (2011). A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2):257–268.

Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., OŔegan, J. P., ir Deng, H.-X. e. a. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415):59–62.

Rotunno, M. S. ir Bosco, D. a. (2013). An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(December):253.

Shi, Y., Acerson, M. J., Abdolvahabi, A., Mowery, R. A., Shaw, B. F., Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R., Julien, J.-P., ir Miller, A.-F. (2016). Gibbs energy of superoxide dismutase heterodimerization accounts for variable survival in amyotrophic lateral sclerosis Gibbs energy of superoxide dismutase heterodimerization accounts for variable survival in amyotrophic lateral sclerosis. *FEBS Letters*, 586(5):585–595.

Shibayama, Y., Joseph, K., Nakazawa, Y., Ghebreihiwet, B., Peerschke, E. I., ir Kaplan, A. P. (1999). Zinc-dependent activation of the plasma kinin-forming cascade by aggregated β amyloid protein. *Clinical Immunology*, 90(1):89 – 99.

Srinivasan, E. ir Rajasekaran, R. (2017). Probing the inhibitory activity of epigallocatechin-gallate on toxic aggregates of mutant (L84F) SOD1 protein through geometry based sampling and steered molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 74:288–295.

Stathopulos, P. B., Rumfeldt, J. a. O., Scholz, G. a., Irani, R. a., Frey, H. E., Hallewell, R. a., Lepock, J. R., ir Meiering, E. M. (2003). Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12):7021–7026.

Stefani, M. ir Rigacci, S. (2013). Protein folding and aggregation into amyloid: The interference by natural phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6):12411–12457.

Strange, R. W., Antonyuk, S., Hough, M. A., Doucette, P. A., Rodriguez, J. A., Hart, P., Hayward, L. J., Valentine, J. S., ir Hasnain, S. (2003). The Structure of Holo and Metal-deficient Wild-type Human Cu, Zn Superoxide Dismutase and its Relevance to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Molecular Biology*, 328(4):877 – 891.

Stroo, E., Koopman, M., Nollen, E. A. A., ir Mata-Cabana, A. (2017). Cellular regulation of amyloid formation in aging and disease. *Frontiers in Neuroscience*, 11:64.

Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Beem, K. M., Richardson, J. S., ir Richardson, D. C. (1982). Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Molecular Biology*, 160(2):181 – 217.

True, H. L. ir Lindquist, S. L. (2000). A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. 407:477–483.

Vashist, S., Cushman, M., ir Shorter, J. (2010). Applying Hsp104 to protein-misfolding disorders. *Biochemistry and Cell Biology*, 88(1):1–13.

Veldink, J. H., Kalmijn, S., Groeneveld, G.-J., Wunderink, W., Koster, A., de Vries, J. H. M., van der Luyt, J., Wokke, J. H. J., ir Van den Berg, L. H. (2007). Intake of polyunsaturated fatty acids and vitamin E reduces the risk of developing amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 78(4):367–371.

Verma, M., Vats, A., ir Taneja, V. (2015). Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 18(2):138–145.

Wang, S.-H., Dong, X.-Y., ir Sun, Y. (2012). Thermodynamic Analysis of the Molecular Interactions between Amyloid beta-Protein Fragments and (-)Epigallocatechin-3-gallate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(20):5803–5809.

Youn, H.-D., Kim, E.-J., Roe, J.-H., Hah, Y. C., ir Kang, S.-O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from streptomyces spp. *Biochemical Journal*, 318(3):889–896.

Zarei, S., Carr, K., Reiley, L., Diaz, K., Guerra, O., Altamirano, P., Pagani, W., Lodin, D., Orozco, G., ir Chinea, A. (2015). A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surgical Neurology International*, 6(1):171.

Zhu, M., Rajamani, S., Kaylor, J., Han, S., Zhou, F., ir Fink, A. L. (2004). The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26):26846–26857.

Zubriene, A., Matuliene, J., Baranauskiene, L., Jachno, J., Torresan, J., Michailoviene, V., Cimmperman, P., ir Matulis, D. (2009). Measurement of nanomolar dissociation constants by titration calorimetry and thermal shift assay - radicicol binding to hsp90 and ethoxzolamide binding to caii. *Int J Mol Sci*, 10(6):2662–2680.

Priedas

4 lentelė. Flavonų pavadinimai

Pavadinimas	Kodas	Pavadinimas	Kodas
Galanginas, 3,5,7-trihidroksiflavonas	020067	3,2',4',5',6-pentametoksiflavonas	22-381
Akacetinas, 5,7-dihidroksi-4'-metoksiflavonas	020072	3,2',4',5'-tetrametoksiflavonas	22-382
Diosmetinas, 5,7,3'-trihidroksi-4'-metoksiflavonas	020082	5,7-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-385
Kuercetagetinas, 3,3',4',5,6,7-heksahidroksiflavonas	021030	3-hidroksi-6-metil-3',4'-metilendioksiflavonas	22-386
Homoorientinas, luteolino-6-L-glikozidas	021055S	3,6,2',4',5'-pentahidroksiflavonas	22-387
Kuercetino-3,7,3',4'-tetrametileteris	021074	3,7,2',4',5'-pentametoksiflavonas	22-388
6-metoksiluteolinas, 6-metoksi-5,7,3',4'-tetrahidroksiflavonas	021084	3-hidroksi-7,8,2'-trimetoksiflavonas	22-390
Ramnetinas, 3,3',4',5-tetrahidroksi-7-metoksiflavonas	021136S	3-hidroksi-7,8,3'-trimetoksiflavonas	22-391
Skutelareinas, 5,6,7,4'-tetrahidroksiflavonas	021165	3,7,8,2'-tetrahidroksiflavonas	22-392
Kvercitrinas, 3',4',5,7-pentahidroksiflavono 3-L-ramnozidas	021236S	6,7,3',4'-tetrahidroksiflavonas	22-393
Skutelareino tetrametileteris	021278	3,7,8,2'-tetrametoksiflavonas	22-394
Kuercetino 3,5,7,3',4'-pentametileteris	021285	6,7,3',4'-tetrametoksiflavonas	22-395

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

4 lentelės tęsinys

Pavadinimas	Kodas	Pavadinimas	Kodas
6,7-dimetoksi-5,3',4'-trihidroksiflavonas	021301	3-hidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavonas	22-398
Morinas, 3,5,7,2',4'-pentahidroksiflavonas	021344S	3,3',7,8-tetrametoksiflavonas	22-399
Tangeretinas, 4',5,6,7,8-pentametoksiflavonas	06-026	3,7,8,4'-tetrametoksiflavonas	22-400
4'-benziloksi-5,7-dimetoksiflavonas	19-887	3-hidroksi-7,8,2',3'-tetrametoksiflavonas	22-403
3-hidroksi-7,2',4'-trimetoksiflavonas	22-201	Apigeninas, 5,7,4'-trihidroksiflavonas	A-002
3-hidroksi-6,2',4'-trimetoksiflavonas	22-204	5,7,4'-trimetoksiflavonas	A-106
3,6,2',4'-tetrahidroksiflavonas	22-205	Baikaleinas, 5,6,7-trihidroksiflavonas	B-101
2',4'-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-211	3'-benziloksi-5,7-dihidroksi-3,4'-dimetoksiflavonas	B-104
3-hidroksi-6,2',3'-trimetoksiflavonas	22-215	3'-benziloksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavonas	B-105
3-hidroksi-7,2',3'-trimetoksiflavonas	22-216	Miricetinas, 3,5,7,3',4',5'-heksahidroksiflavonas	C-101
2',3'-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-219	3,7-dihidroksi-3',4'-dimetoksiflavonas	D-111
3-hidroksi-6,3',4'-trimetoksiflavonas	22-222	5,4'-dihidroksi-7-metoksiflavonas	D-115
7,4'-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-301	5,6-dihidroksi-7-metoksiflavonas	D-116
2',4'-dimetoksi-3-hidroksi-6-metilflavonas	22-304	5,3'-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavonas	D-123
3-hidroksi-3',4',5'-trimetoksiflavonas	22-308	3',4'-dimetoksiflavonas, 3-hidroksi-3',4'-dimetoksiflavonas	D-604

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

4 lentelės tęsinys

Pavadinimas	Kodas	Pavadinimas	Kodas
3,6,3',4'-tetrametoksiflavonas	22-309	Fisetinas, 3,7,3',4'-tetrahidroksiflavonas	F-002
3',4'-dimetoksi-3-hidroksi-6-metilflavonas	22-317	Flavonas	F-003
3,6,2',3'-tetrahidroksiflavonas	22-318	Gardeninas, 5-hidroksi-3',4',5',6,7,8-heksametoksiflavonas	G-001
3,6,2',3'-tetrametoksiflavonas	22-319	Gosipinas, 3,3',4',5,7,8-heksahidroksiflavono-8-gliukozidas	G-002
7,3',4',5'-tetrametoksiflavonas	22-320	Gosipetinas, 3,5,7,8,3',4'-heksahidroksiflavonas	G-500
6,2',4'-trimetoksiflavonas	22-322	3'-hidroksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavonas	H-114
6,2',3'-trimetoksiflavonas	22-323	6,4'-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	H-601
6,2',3'-trihidroksiflavonas	22-324	Kaempferidas, 4'-metoksi-3,5,7-trihidroksiflavonas	K-101
7,3'-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-326	Kaempferolis, 3,5,7,4'-tetrahidroksiflavonas	K-102
3,7,3'-trihidroksiflavonas	22-327	Luteolinas, 5,7,3',4'-tetrahidroksiflavonas	L-101
3,7,3'-trimetoksiflavonas	22-328	5,7,3',4'-tetrametoksiflavonas	L-102
7,2',3'-trimetoksiflavonas	22-329	3,5,7-trihidroksi-3',4',5'-trimetoksiflavonas	M-116
7,2',4'-trimetoksiflavonas	22-330	Kuercetinas, 3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavonas	P-102
6,3'-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-333	3,7,3',4',5'-pentahidroksiflavonas	P-103
3,6,3'-trihidroksiflavonas	22-334	5,6,7,3',4'-pentametoksiflavonas	P-201

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

4 lentelės tęsinys

Pavadinimas	Kodas	Pavadinimas	Kodas
3,6,3'-trimetoksiflavonas	22-335	5,7,3',4',5'-pentametoksiflavonas	P-202
6,7,3'-trihidroksiflavonas	22-336	3',5'-dimetoksi-3,5,7,4'-tetrahidroksiflavonas	S-105
5,7,3',4',5'-pentahidroksiflavonas	22-340	3,4'-dimetoksi-5,7,3'-trihidroksiflavonas	T-110
7,3',4',5'-tetrahidroksiflavonas	22-341	7,8,3',4'-tetrahidroksiflavonas	T-201
3,6,3',4'-tetrahidroksiflavonas	22-344	7,8,3',4'-tetrametoksiflavonas	T-202
3-hidroksi-7,3',4',5'-tetrametoksiflavonas	22-345	7,3',4'-trimetoksiflavonas	T-204
3,7,3',4',5'-pentametoksiflavonas	22-346	3,7,4'-trihidroksiflavonas	T-251
6,2'-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-349	3,6,4'-trihidroksiflavonas	T-405
3,6,2'-trimetoksiflavonas	22-352	5,3',4'-trihidroksiflavonas	T-406
7,2'-dimetoksi-3-hidroksiflavonas	22-354	5,7,2'-trihidroksiflavonas	T-407
3,6,2'-trihidroksiflavonas	22-355	6,3',4'-trihidroksiflavonas	T-408
3,3',4'-trimetoksiflavonas	22-356	7,8,2'-trihidroksiflavonas	T-410
5,7,3'-trimetoksiflavonas	22-358	7,8,3'-trihidroksiflavonas	T-411
5,7,2'-trimetoksiflavonas	22-362	7,8,4'-trihidroksiflavonas	T-412
3-hidroksi-2',4',5'-trimetoksiflavonas	22-375	7,3',4'-trihidroksiflavonas	T-414
3-hidroksi-2',4',5',6-tetrametoksiflavonas	22-379	3,3',4'-trihidroksiflavonas	T-601