

# VILNIAUS UNIVERSITETAS Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Biofizikos bakalauro studijų programos IV kurso studentas

Lukas GUDIŠKIS

Bakalauro baigiamasis darbas

# Tioflavino T jungimosi prie insulino amiloidinių fibrilių tyrimas

Darbo vadovas: Dr. V. Smirnovas

# Tioflavino T jungimosi prie insulino amiloidinių fibrilių tyrimas

Darbas atliktas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijų instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje.

Studentas:

Lukas GUDIŠKIS \_\_\_\_\_

Darbo vadovas:

Dr. V. SMIRNOVAS

# TURINYS

ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1.Amiloidai	6
1.2. Amiloidinės ligos	7
1.3. Amiloidų formavimasis	8
1.4. Insulinas kaip modelinis baltymas	9
1.5. Amiloidinių insulino fibrilių struktūrų susidarymas	11
1.6.Amiloidinių dažų istorija ir ThT savybės	11
1.7. ThT fluorescencijos mechanizmas	13
1.8.Vidinio filtro reiškinys	13
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	15
2.1 Medžiagos ir įranga	15
2.1.1 Naudotos medžiagos	15
2.1.2 Naudota įranga	15
2.1.3 Buferiniai tirpalai	15
2.2 Metodai	16
2.2.1 Fibrilių formavimas	16
2.2.2 Fibrilių apdorojimas ultragarsu	16
2.2.3 Dviejų tipų fibrilių mėginių ruošimas	16
2.2.4. Tioflavino T tirpalų ruošimas	16
2.2.5. FT-IR spektroskopijai skirtų mėginių paruošimas	16
2.2.6. Atominės jėgos mikroskopija	17
2.2.7. Insulino fibrilių agregacijos kinetikos matavimai	17
2.2.8. Prisijungusio tioflavino T prie insulino fibrilių fluorescencijos matavimai	18
2.2.9. Tyrimas su mikrodializės cele	19
2.2.10. Jungimosi konstantos kb ir jungimosi santykio n nustatymas	21
2.2.11. FT-IR spektroskopija	21
2.3. Duomenų apdorojimas	22
2.3.1. FT-IR spektro duomenų apdorojimas	22
2.3.2. Insulino agregacijos kinetikos duomenų apdorojimas	22
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	24
3.1 Insulino fibrilių struktūrų nustatymai atominės jėgos mikroskopu	24
3.2 Insulino struktūrų palyginimas naudojant FT-IR spektroskopiją	25

3.3. Tioflavino T poveikio insulino fibrilių susidarymo kinetikai nustatymas	26
3.4. Tioflavino T prisijungusio prie insulino fibrilių fluorescencijos tyrimas	27
3.5. Tioflavino T jungimosi prie insulino fibrilių jungimosi konstantos kb nustatymas	31
IŠVADOS	37
SANTRAUKA	38
SUMMARY	39

#### ĮVADAS

Paskutinius kelis dešimtmečius baltymų agregacijos ir fibrilizacijos procesai pritraukia vis didesnį mokslininkų dėmesį. Amiloidinių baltymų agregacija į netirpius fibrilinius agregatus yra vis dažniau įvardinama kaip pagrindinė įvairių ligų priežastis. Šiuo metu yra nustatyta daugiau nei 40 ligų, kurios siejamos su amiloidinių fibrilių kaupimusi – Alzheimerio ir Parkinsono ligos, tam tikros vėžio formos, II tipo diabetas, katarakta. Daugumos amiloidinių baltymų formuojamų agregatų struktūra yra panaši – dominuoja pasikartojančios β-klostės, statmenos fibrilių ašiai. Tačiau skirtingose sąlygose net tas pats baltymas gali sudaryti skirtingo tipo agregatus, kurie skiriasi savo struktūra bei kitomis fizinėmis savybėmis.

Didelė dalis baltymų agregacijos į amiloidines fibriles tyrimų yra atliekami naudojant fluorescencinį dažą Tioflaviną T (ThT). Šis dažas jungiasi prie amiloidinių agregatų, tačiau jo sąveikos su skirtingais agregatais skirtumai mažai ištyrinėti.

Šio bakalaurinio darbo metu buvo naudojamas rekombinantinis žmogaus insulinas. Dėl savo savybės lengvai formuoti amiloidines fibriles *in vitro* esant žemam pH ir aukštai temperatūrai, jis buvo pasirinktas kaip modelinis baltymas.

Šio darbo tikslas – nustatyti Tioflavino T jungimosi skirtumus tarp insulino amiloidinių fibrilių suformuotų 20 % acto rūgštyje ir insulino amiloidinių fibrilų suformuotų fosfatiniame buferiniame tirpale.

Darbo uždaviniai:

- 1. Nustatyti galimus struktūrinius skirtumus tarp insulino fibrilių susidarusių fosfatiniame buferiniame tirpale ir 20 % acto rūgštyje.
- Nustatyti Tioflavino T įtaką insulino fibrilių susidarymo kinetikai fosfatiniame buferiniame tirpale ir 20 % acto rūgštyje.
- Naudojant pusiausvyrinės dializės metodą, palyginti Tioflavino T jungimąsi su skirtingomis sąlygomis susidariusiomis insulino fibrilėmis.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

#### 1.1.Amiloidai

Terminą "amiloidas" pirmą kartą pristatė vokiečių mokslininkas Rudolfas Virchovas (vok. *Rudolf Virchow*) 1845 metais. Mokslininkas šiuo terminu apibūdino makroskopinį audinio nenormalumą, kuris pasižymėjo šviesiai gelsva spalva ir teigiama jodo dažymo reakcija, kuri yra būdinga medžiagoms turinčioms krakmolo. Mokslininkas nusprendė, kad tai medžiaga turinti celiuliozės ir dėl to davė amiloido pavadinimą. Terminas kilęs iš lotynų kalbos žodžio *amylum* ir graikų kalbos žodžio *amylon*, kurie reiškia krakmolą. 1859 metais du mokslininkai Fridrichas (vok. *Friedrich*) ir Kekulė (pranc. *Kekulé*) atlikę detalesnius tyrimus amiloidiniuose dariniuose aptiko dideles azoto koncentracijas, tuo remiantis padarė išvadą, jog amiloidai susideda iš baltymų, o ne iš angliavandenių, kaip buvo manyta iki tol. Nuo tada amiloidai yra laikomi baltymais. Vėliau jie buvo priskirti atskirai baltymų klasei, kuri pasižymi savybe formuoti fibriles (Sipe et al. 2000).

Dabartinio histologinio termino "amiloidiniai agregatai" apibūdinimas sako, kad amiloidai yra tarpląstelinės baltymų sankaupos, prie kurių prisijungęs Kongo raudonasis dažas skleidžia žalią poliarizuotą šviesą. Laikui bėgant buvo atrasti vis kitokie metodai medžiagų savybėms ir sudėčiai tirti. Molekulių struktūroms tirti buvo naudojamas rentgeno spindulių difrakcinis vaizdinimas. Rentgeno spindulių pluoštą praleidus pro surikiuotas amiloidines fibriles ir išanalizavus gautus difrakcinius vaizdus, buvo nustatyta, kad amiloidai sudaryti iš  $\beta$  klosčių motyvų.  $\beta$  struktūroje atskiros gijos išsidėsčiusios statmenai fibrilių ašies kas 4,7 Å, o lygiagrečiai fibrilių ašies kas 10 Å (**1.1 pav.**). Po elektroninio mikroskopo sukūrimo ir panaudojimo amiloidinėms fibrilėms tirti, buvo nustatyta, kad fibrilės yra ilgos, nešakotos, 6-12 nm skersmens, sudarytos iš tvarkingai išsidėsčiusių tūkstančių peptidų / baltymų kopijų (Samir K. Maji, Lei Wang, Jason Greenwald, Roland Riek, 2009).



**1.1 pav.** A – amiloidinių fibrilių elektroninio mikroskopo nuotrauka – ilgos ir nešakotos struktūros filamentai. B – Fibrilių rentgeno spindulių difrakcijos vaizdas, būdingos  $\beta$ -klostytam struktūriniam motyvui (adaptuota iš Maji et al. 2009).

#### 1.2. Amiloidinės ligos

Daug ligų atsiranda todėl, kad baltymams nepavyksta susilankstyti į natyvią funkcinę struktūrą ar išlikti šioje būsenoje. Šios patologinės sąlygos paprastai vadinamos klaidingu baltymų susilankstymu ( klaidinga baltymų konformacija). Jos apima patologines būsenas, kuriose baltymai įgavę neteisingą konformaciją negali atlikti savo funkcijos, todėl sumažėja baltymo su taisyklinga konformacija, galinčio atlikti savo įprastines funkcijas ir dėl to išsivysto įvairios ligos. Šis, baltymų turinčių teisingą konformaciją, sumažėjimas gali pasireikšti kaip rezultatas vieno iš kelių potransliacinių procesų, tokių kaip padidėjusi endoplazminio tinklo kokybės kontrolės degradacijos tikimybė, cistinės fibrozės atveju (Uversky Vn et al., 2006), ar netinkamo baltymo paskirstymo ankstyvoje emfizemos stadijoje (Lomas DA et al., 2002). Taip pat šiai grupei priklauso ligos susijusios su specifinių peptidų ar baltymų pakitimu iš jų tirpios funkcionuojančios būsenos į labai taisyklingus, organizuotus fibrilinius agregatus – amiloidines fibriles (Westermark P et al., 2005). Dėl amiloidinių fibrilių susikaupimo išsivysčiusios ligos vadinamos amiloidozėmis. Šios ligos gali būti suskirstytos į tris grupes:

- Neurodegeneracinės ligos baltymų agregacija ir amiloidų kaupimasis pasireiškia smegenyse;
- Lokalizuotos amiloidozės: šias ligas sukelia agregatų formavimas ir kaupimasis tam tikro tipo audiniuose, išskyrus smegenų audinį;
- Sisteminės amiloidozės baltymų agregacija ir amiloidų kaupimasis aptinkamas įvairaus tipo audiniuose.

Atrandama vis daugiau baltymų, kurie neturi sąryšio su amiloidozėmis, tačiau jie formuoja fibrilinius agregatus, morfologiškai ir struktūriškai panašius į amiloidus (Stefani M. et al., 2003; Uversky VN., et al, 2004). Tai rodo, kad amiloidinė strūktūra yra neatskiriama nuo polipeptidinių grandinių, nors polinkis sudaryti tokią struktūrą priklauso nuo paties polipeptido sekos. Taip pat yra atvejų kai amiloidinės fibrilės panaudoja tam tikros gyvos sistemos. Kai kuriais išskirtiniais atvejais amiloidinės fibrilės yra taisyklinga ir siekiama tam tikrų baltymų komplekso struktūra. Pavyzdžiui, amiloidinės fibrilės vorų šilke ir bakterijų formuojamose bioplėvelėse atlieka struktūrinę funkciją, žmonėse baltymų agregatų formoje yra saugomi kai kurie hormonai, grybuose amiloidiniai baltymai pasižymi reguliacine funkcija (Pham CL et al., 2014). Manoma, kad ateityje bus aptikta didesnė baltymų įvairovė, kurie ląstelės ar organizmo fiziologinėmis sąlygomis sugeba formuoti amiloidines fibriles (Harrison et al., 2007).

# 1.3. Amiloidų formavimasis

Didelė įvairovė baltymų ir peptidų kurie tarpusavyje neturi sekos ar struktūrų panašumų gali suformuoti panašias į amiloidinės fibrilės struktūras (Serpell L C et al., 1997). Visos amiloidinės fibrilės yra suformuotos ir palaikomos vandenilinių ryšių sąveikos tarp polipeptidų šoninių grupių (Dobson C M et el., 1999). Manoma, kad tokia universali struktūra gali būti energetiškai palankiausia polipeptido struktūra (Baldwin A J *et al.*, 2011). Yra nustatyta, kad dalis fibrilinių agregatų yra termodinamiškai stabilesni negu jų natyvi baltymo konformacija (Shammas S L et al., 2011).

Amiloidinių fibrilių formavimasis aiškinamas dviejų etapų mechanizmu: lag fazės metu susidaro branduoliai, eksponentinės fazės metu ilgėja fibrilės (**1.2 pav.**). (Hortschansky et al., 2005; Nielsen et al., 2001b). Branduolių susidarymas laikomas atsitiktine, reakcijos greitį limituojančia stadija (Foder'a et al., 2008; Hortschansky et al., 2005). Pradinių branduolių susirinkimui svarbiausia yra hidrofobinė sąveika (Nielsen et al., 2001a). Pirmajam aktyviajam vienetui susiformuoti reikia tam tikros baltymo koncentracijos: lag fazė ilgėja mažėjant baltymo koncentracijai, kol pasiekus kritinę koncentracijos vertę agregacija nebevyksta (Kumar and Udgaonkar, 2010). Agregaciniam centrui susiformavus prasideda ilgėjimo stadija, kai baltymo monomerai arba oligomerai jungiasi prie fibrilės galų. Fibrilių ilgėjimas yra daug greitesnis procesas, galintis vykti sąlygomis, nepalankiomis branduolių susidarymui, dėl to amiloidų formavimosi varomąja jėga laikomas būtent fibrilių augimas (Milto et al., 2013).



**1.2 pav.** Sigmoidinis fibrilių susidarymo grafikas susidedantis iš *lag* fazės, elongacijos (ilgėjimo). Parametrai:  $\tau_{50}$  – laikas, kai agregacija įpusėjo; tiesės nuolinkio kampas – agregacijos greitis. (adaptuota iš Gillam, MacPhee, 2013).

## 1.4. Insulinas kaip modelinis baltymas

Insulinas – nedidelis kasoje gaminamas ir į kraują išskiriamas polipeptidinis hormonas, kurio masė 5808 Da. Jis verčia raumenų ir kepenų ląsteles iš gliukozės gaminti glikogeną, o riebalų ląsteles gaminti riebalus. Insulinas sudarytas iš dviejų peptidinių grandinių (A grandinė - 21 aminorūgštis, B grandinė - 30 aminorūgščių). Abi grandinės yra susijungusios disulfidiniais tilteliais A7-B7 ir A20-B19. A grandinė atskirai turi dar vieną disulfidinį tiltelį A6-A11 (**1.3 pav.**).



1.3 pav. Pirminė insulino struktūra. A ir B pagrindinės grandinės, S-S disulfidiniai tilteliai.

Grandinės A erdvinę struktūrą sudaro dvi priešingų krypčių  $\alpha$ -spiralės A2-A8 ir A13-A20. B grandinės erdvinė struktūra susideda iš dviejų laisvų polipeptidinės grandinės galų, kurie viduryje sujungti  $\alpha$ -spirale B9-B19 (**1.4 pav.**) (Smith et al., 1984).



**1.4 pav.** Antrinė natyvaus insulino struktūra. A grandinei priklausančios  $\alpha$ -spiralės – raudonos sritys. B grandinei priklausančios  $\alpha$  spiralės – mėlynos sritys. Oranžine spalva pavaizduoti disulfidiniai tilteliai.

Tirpale insulinas gali sudaryti monomerus, dimerus, tetramerus ir heksamerus. Organizmuose naudojančiuose insuliną, baltymas yra saugomas cinko jonų koordinuoto heksamero forma, susidedančioje iš dviejų cinko jonų ir trijų insulino dimerų (Nielsen et al., 2001).

#### 1.5. Amiloidinių insulino fibrilių struktūrų susidarymas

Nustatyta, kad parinkus skirtingas pradines sąlygas, tas pats baltymas gali suformuoti skirtingos struktūros fibriles. Insulino agregacijos greitis priklauso nuo jo paties koncentracijos, maišymo intensyvumo, pH, joninės jėgos, anijonų koncentracijos, insulino fibrilių sėklos koncentracijos ir papildomų medžiagų, tokių kaip karbamido ir sacharozės koncentracijos (Nielsen et al., 2001). Insulino savaiminei agregacijai inicijuoti pakanka žemos tirpalo pH ir aukštos temperatūros. Dėl šių sąlygų sukeliamų išorinių jėgų insulino molekulė priverčiama pakeisti savo natyvią struktūrą. Pakitusios struktūros insulino molekulės jungiasi tarpusavyje ir suformuoja fibriles. Suagregavusio insulino fibrilės gali būti sudarytos iš 2, 4 ar 6 dešiniu sukiniu susisukusių protofibrilių (Jimenez et al., 2002). Keičiant agregacijos iniciacijos sąlygas taip pat kinta insulino molekulės konformacija. Dėl parinktų išorinių sąlygų net ir maži insulino monomero β-klostės pokyčiai turi įtakos protofibrilių struktūrai (Sunde et al. 2002). Parinkus skirtingas pH vertes inicijuojant insulino agregaciją, yra suformuojamos skirtingos struktūros fibrilės (Sneideris et al., 2015). Todėl parinkus skirtingas pradines agregacijos iniciacijos sąlygas, pridedant įvairių agregacijai reiškmingų medžiagų susiformuoja įvairių struktūrų fibrilės (Vestergaard et al. 2007).

# 1.6. Amiloidinių dažų istorija ir ThT savybės

Po XX amžiaus pradžios ir vidurio, histologinis amiloidų aptikimas buvo dažniausiai atliekamas naudojant Kongo raudonąjį dažą, pritaikytą iš audinių pramonės. Deja, amiloidinių darinių dažymas naudojant Kongo raudonąjį dažą buvo sunkus ir reikalavo poliarizuotos šviesos mikroskopo naudojimo, taip pat buvo sunku interpretuoti mįslingą obuolių žalsvumo spalvą kuri atsirasdavo dažui prisijungus prie amiloidinių darinių (Porat, Y, et al., 2006). Kongo raudonasis dažas yra priskiriamas tiesioginių dažų grupei, kurių funkcija paremta giminiškumo skirtumų tarp fibrilių ir į fibriles nepanašių medžiagų. Toks dažymo būdas reikalavo plovimo po dažymo, dėl ypač žymaus foninio spalvos intensyvumo.

1959 metais Vassaras ir Cullingas pademonstravo fluorescencinės mikroskopijos potencialą amiloidinių fibrilių diagnostikai novatoriškoje ataskaitoje apie specifinius amiloidų dažus. Šie mokslininkai pirmieji parodė benzatiazolo dažo Tioflavino T (ThT) panaudojimą kaip stipriai veikiantį fluorescencinį amiloidų žymenį fibrilių histologijoje (**1.5 A pav.**) (Findeis, M. A. et al., 2000). Jie pabrėžė, kad ThT selektyviai lokalizuoja amiloidų sąnašas, iškart po sužadinimo padidėja fluorescencijos emisijos intensyvumas (**1.6 pav.**). Lyginant su keliais įprastais amiloidų dažais, jie rekomendavo ThT naudojimą amiloidų atvaizdavimui, nes jis yra gerokai pranašesnis negu Kongo raudonasis ar metilo violetas (Findeis, M. A. et al., 2000).



**Pav.1.5.** A - Tioflavino T molekulinė struktūra. B -Optinis dažo vaizdas, kuriame benzatiazolo ir benzilamino grupės vaizduojamos skirtingose plokštumose. Šios molekulės grupės laisvai sukasi apie C-C ryšį. (Matthew Biancalana, et al., 2010)

Tyrimai atlikti 1980-1990 metais buvo svarbūs ThT parametrų nustatymui. Naiki ir LeVino buvo tarp pirmųjų kruopščiai charakterizavusių fluorescencijos spektrą ir ThT prisijungimo parametrus. Jie pademonstravo, kad po prisijungimo prie fibrilių, ThT sužadinimo maksimumas smarkiai pasislenka (nuo 385 iki 450 nm), taip pat smarkiai pasislenka emisijos maksimumas (nuo 445 iki 482 nm). ThT fluorescencija padidėja tik tuo atveju, jei ThT molekulė prisijungia prie amiloidinių fibrilių (Vassar et al., 1959) (**Pav.1.6.**). ThT tirpus vandenyje ir pasižymi vidutinišku giminingumu fibrilėms, tai daro ThT dar labiau tinkamą tyrimams. Svarbu pabrėžti, kad ThT vienodai efektyvus dažas įvairioms fibrilėms tiek susintetintoms, tiek gautoms iš biologinių šaltinių.



**1.6 pav. Paveikslėliuose tekstas turi būti lietuviškas** Violetinė spalva žymi dažo fluorescencijos emisijos intensyvumą prisijungus prie amiloidinių fibrilių. Mėlyna spalva žymi laisvo ThT dažo fluorescencijos emisija vandenyje. (Matthew Biancalana, et al., 2010).

#### 1.7. ThT fluorescencijos mechanizmas

Fluorescencijos sustiprėjimas po prisijungimo prie fibrilių yra kruopščiausiai ištyrinėta ThT savybė. Yra manoma, kad padidėjusi ThT fluorescencija yra rezultatas, kai selektyviai įmobilizuojama viena ThT konformacija. Gausybė eksperimentinių duomenų ir kvantinių mechanizmų prognozavimų siūlo, kad ThT elgiasi kaip "molekulinis rotorius". Tirpale, žemos energijos barjeras leidžia ThT benzilamino ir benzatiazolo žiedams laisvai suktis apie juos jungiantį anglies-anglies ryšį (**1.5 pav. B**). Šis sukimasis greitai <u>numalšina sužadintą būseną</u>, <u>kurią sugeneruoja sugertas fotonas</u> ir sukelia tik žemą fluorescencijos emisijos intensyvumą kai ThT yra laisvas. Bet, kai ThT sukimasis imobilizuotas jis ilgiau išsaugo sužadintą būseną. Sužadinta būsena grįžtą į pradinę nesužadintą būseną tik išspinduliuojant ilgesnės šviesos bangos fotoną. Dėl to žymiai išauga fluorescencijos emisijos intensyvumas (**1.6 pav.**). Amiloidinės fibrilės gali sudaryti palankią ThT jungimosi sritį (**1.7 pav.**), kuri erdviškai blokuoja ir suriša dažų molekulę, todėl taip sukuria ThT fluorescencijos išaugimą.



**1.7 pav.** ThT sąveikos su amiloidinėmis fibrilėmis modelis. ThT žymi abipusė rodyklė,  $\beta$  juostas – vienpusės rodyklės, o aminorūgščių šonines grupes – apskritimai (pritaikyta iš Biancalana and Koide 2010).

#### 1.8. Vidinio filtro reiškinys

Vidinio filtro reiškinys yra reikšminga kliūtis fluorescencijos metodų naudojime. Nauodojant dideles fluoroforų (dažų) koncentracijas fluorescencijos intensyvumas ima kisti netiesiškai keičiant fluoroforų koncentraciją. Šis poveikis labai apsunkina tikslių fluorescencijos spektrų gavimą ir fluorescencinių dažų jungimosi parametrų nustatymą. Vidinio filtro reiškinys susidaro esant didelei fluorescencinių dažų koncentracijai, kai fluorescenciją žadinanti šviesa yra sugeriama pradiniuose mėginio sluoksniuose ir dėl to vis mažiau žadinančios šviesos gali pasiekti vis gilesnį mėginio sluoksnį. Dėl šio reiškinio didinant dažų koncentraciją fluorescencijos intensyvumas nustoja kisti. Todėl fluorescencijos matavimai galimi tik iki tam tikros fluorescencinių dažų koncentracijos, kai vidinio filtro reiškinio įtaka fluorescencijai yra maža (Fonin AV et al., 2014).

# 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

# 2.1 Medžiagos ir įranga

### 2.1.1 Naudotos medžiagos

- Acto rūgštis (99,98%);
- Fisher Scientific: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH;
- Sigma Aldrich: rekombinantinis žmogaus insulinas, tioflavinas T;
- Carl Roth: sunkusis vanduo deuterio oksidas (99,8 % D);
- Acros Organics: natrio chloridas, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

# 2.1.2 Naudota įranga

- Atominės jėgos mikroskopas "Dimension Icon";
- Termocikleris "Qiagen Rotor-Gene Q"
- Maišyklė "CLASSIC Vortex Mixer" (VELP Scientifica);
- pH-metras "Orion DUAL STAR meter" (Thermo Scientific);
- Dializės žarna: 28,7 mm diametro "Zella Trans Roth" (pralaidumas iki 8 kDA);
- Spektrofotometras fluorescencijai matuoti: "Varian Cary Eclipse";
- Spektrofotometras optiniam tankiui matuoti: "UV-1800" (Schimadzu);
- Mikrodializės kamera (5 celės po 2 ml);
- Ultragarsinis homogenizatorius "Bandelin Sonopuls" (antgalis: MS73);
- Vandens gryninimo sistema "Simplicity UV system".
- FT-IR spektrometras "Bruker Optics ALPHA FT-IR"

# 2.1.3 Buferiniai tirpalai

- Fosfatinis buferinis (FB) tirpalas: ruošiamas iš fosfatinės rūgšties ir mononatrio fosfato.
  50 ml buferinio tirpalo buvo ruošiama iš 45 ml denijonizuoto vandens, 2,9 ml 1M fosfatinės rūgšties ir 2,1 ml 1M mononatrio fosfato. pH-metru išmatuojama pH vertė ir natrio šarmu privedama iki reikiamos pH vertės (pH 2,0).
- 20% Acto rūgšties (AB) tirpalas: ruošiamas iš 99,98% acto rūgšties ir dejonizuoto vandens. 99,98% acto rūgštis skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 20%. pH-metru

matuojama pH reikšmė (pH-2,0). Į 45 ml paruošto tirpalo įdedama 263 mg NaCl. Galutinė natrio chlorido koncenracija tirpale – 100 mM, tūris 45 ml.

#### 2.2 Metodai

#### 2.2.1 Fibrilių formavimas

Iš žmogaus rekombinantinio insulino formuojamos dviejų tipų fibrilės. Vienos formuojamos fosfatiniame buferiniame tirpale (A fibrilės), kitos 20% acto rūgšties tirpale (B fibrilės). Abiejų tipų fibrilės formuojamos ištirpinus 4,64 mg/ml insulino kristalus buferiniuose tirpaluose ir inkubuojant 24 valandas 60°C temperatūroje.

#### 2.2.2 Fibrilių apdorojimas ultragarsu

Suformuotos A ir B tipo fibrilės (2.2.1) buvo skaldomos pasinaudojant ultragarsiniu homogenizatoriumi "Bandelin Sonopuls" su prijungtu MS73 antgaliu. Skaldymas buvo vykdomas ledo vonioje 0°C, 10 minučių (ciklais po 30s skaldymo ir 30s pauzės) 50% amplitude. Kiekvieno mėginio gautas energijos kiekis neviršijo 5,6 kJ. Apdorojant fibrilės ultragarsu ilgos fibrilės buvo suskaldytos į trumpesnes taip padidinant tirpalo homogeniškumą.

#### 2.2.3 Dviejų tipų fibrilių mėginių ruošimas

Visuose tyrimuose naudojami dviejų tipų mėginiai. A fibrilės suformuotuos FB tirpale ir apdorotos ultragarsu (2.2.2) yra skiedžiamos FB tirpalu iki reikiamos koncentracijos. B fibrilės suformuotuos AB tirpale yra skiedžiamos AB tirpalu iki tokios pačios koncentracijos kaip mėginiuoe su A tipo fibrilėmis. Todėl kiekviename iš tyrimų buvo naudoti 2 skirtingi tipai mėginių, kurie skiriasi fibrilėmis, bet lygiagriačiai yra visada tokios pačios koncentracijos.

## 2.2.4. Tioflavino T tirpalų ruošimas

Tioflavinas T buvo ruošiamas taip pat dviejų skirtingų tipų kaip ir fibrilės. Naudojant insulino fibriles taip pat naudojami įvairios koncentracijos tioflavino T tirpalai. Įvairios ThT koncentracijos buvo gautos 10 mM ThT vandeninį tirpalą skiedžiant FB ar AB tirpalais.

#### 2.2.5. FT-IR spektroskopijai skirtų mėginių paruošimas

Ruošiami 2 skirtingi mėginiai iš A ir B tipo fibrilių. Pirmiausiai į pirmą mėgintuvėlį įpilama 1ml 800 µM A tipo fibrilių, į antrą mėgintuvėlį įpilama tiek pat 800 µM B tipo fibrilių. Abu mėgintuvėliai centrifuguojami 20 minučių 14000 aps/min greičiu. Abejuose mėgintuvėliuose fibrilės nusėda ant dugno. Iš kiekvieno mėginio pašalinamas supernatantas. Į mėgintuvėlius su nusėdusiomis fibrilėmis įpilama po 500 µl sunkiojo vandens ir vėl centrifuguojama 20 minučių 14000 aps/min greičiu. Visas procesas pakartojamas dar 2 kartus. Po paskutinio centrifugavimo pašalinus supernatantą ant mėgintuvėliuose nusėdusių fibrilių užpilama po 1 ml sunkiojo vandens ir 2 min maišoma. Per visą mėginių paruošimo procesą buvo stengiamasi kuo trumpiau laikyti mėgintuvėlius atidarytus, kad į sunkųjį vandenį nepatektų ore esančios vandens molekulės.

# 2.2.6. Atominės jėgos mikroskopija

Atominės jėgos mikroskopijos (AFM) mėginiai buvo ruošiami ant 1 cm aukštos kokybės V1 žėručio plėvelės užlašinant 20 μl mėginio. Užlašintas mėginys laikomas vieną minutę ir tada nuplaunamas dejonizuoto vandens srove. Nuplautas žėrutis džiovinamas pučiant suspaustą orą. Atominės jėgos mikroskopija atliekama Dimension Icon aparatu naudojant dinaminį virpančiojo zondo rėžimą. Mikroskopuojant buvo naudojama PointProbe NCHR adata, kurios virpėjimo dažnis yra ~300 kHz.

# 2.2.7. Insulino fibrilių agregacijos kinetikos matavimai

Insulino fibrilių agregacijos kinetikos matavimai atlikti naudojant "Qiagen Rotor-Gene Q" realaus laiko PGR aparatą (**2.1 pav.**). Šio aparato veikimo mechanizmas leidžia atlikti ne tik PGR reakcijas, bet ir stebėti agregacijos tyrimus. Aparatas palaikydamas pastovią 60 °C temperatūrą matuoja 36 atskirų mėginių fluorescencijos emisijos intensyvumą, kurie rotoriuje sukasi 400 aps/min greičiu. Agreguojant insulinui tioflavinas T jungiasi prie vis daugiau susidariusių insulino fibrilių ir dėl to didėja fluorescencijos emisijos intensyvumas. Fluorescencijos emisijos intensyvumas priklauso nuo reakcijos mišinyje esančių insulino fibrilių ir tioflavino T koncentracijos. ThT sužadinamas 470 nm bangos ilgio šviesa, fluorescencijos emisijos intensyvumas matuojamas ties 510 nm.



2.1 pav. "Qiagen Rotor-Gene Q" aparato sandara.

#### 2.2.8. Prisijungusio tioflavino T prie insulino fibrilių fluorescencijos matavimai

Tioflavino T prisijungusio prie insulino fibrilių fluorescencijos tyrimai buvo atlikti naudojant "Varian Cary Eclipse" spektrofotometrą. Fluorescencijos sužadinimo šviesos bankos ilgis 450 nm, fluorescencija registruojama 455–650 nm šviesos bangos ilgio intervale. Fluorescencijos registratoriaus plyšio plotis ties 2,5 mm. Kai žadinanti šviesa pasiekia mėginį, fluorescencija registruojama 90° kampu. Naudota sumažinto tūrio kiuvetė V=70 µl, šviesos kelias kiuvetėje 3 mm.

Tyrimas buvo atliktas A ir B tipo fibrilėms. Tiriama kaip keičiasi Tioflavino T florescencijos spektras didinant jo koncentraciją. Pasirinktos 3 A ir 3 tokios pačios B fibrilių koncentracijos – 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 800  $\mu$ M. Tyrimas pradedamas nuo fluorescensijos spektro registravimo kai kiuvetėje yra įpilta tik vienų fibrilių tirpalo nepridėjus tioflavino T – tai bazinis fluorescencijos spektras, kuris vėliau atimamas iš visų, vėliau užregistruotų fluorescencijos spektrų tam pačiam mėginiui po ThT pridėjimo. Išmatavus bazinį spektrą, į kiuvetę pridedama 0,52  $\mu$ l 1 mM tioflavino T tirpalo ir užregistruojamas fluorescencijos spektras. Užregistravus pirmą spektrą vėl pridedama 0,52  $\mu$ l 1 mM ThT ir vėl užregistruojamas fluorescencijos spektras. Tai kartojama dar 8 kartus. 11 kartą pridedama 1,05  $\mu$ l 1 mM ThT, išmaišoma ir užregistruojamas fluorescencijos spektrų registravimas buvo atliekamas pridėjus po 1,05  $\mu$ l 1 mM ThT. Šis tioflavino T fluorescencijos spektrų registravimas didinat ThT koncentraciją buvo atliekamas po 3 kartus su kiekviena A ir B fibrilių koncentracija.

Iš vieno mėginio gautų spektrų buvo paimama po vieną fluorescencijos emisijos intensyvumo vertę, kai užregistruotos fluorescencijos šviesos bangos ilgis yra 480 nm. Iš verčių yra nubraižoma fluorescencijos intensyvumo priklausomybės kreivė nuo tioflavino T koncentracijos mėginyje. Visa tai pakartota su visais mėginių spektrais.

## 2.2.9. Tyrimas su mikrodializės cele

Mikrodializės celė sudaryta iš dviejų kamerų perskirtų regeneruotos celiuliozės membrana. Abejų kamerų suminis tūris yra 2 ml, membrana kameras perskiria per celės vidurį, vienos kameros tūris yra 1 ml. Regeneruotos celiuliozės membrana turi tam tikro dydžio poras, pro kurias gali laisvai judėti medžiagos, kurių molinė masė neviršija 8000 Da. Todėl ji yra pralaidi tioflavino T molekulėms ir nepralaidi insulino fibrilėms.

Regeneruotos celiuliozės mambrana ruošiama iš dializės žarnos. Nuo dializės žarnos ritinėlio atkerpama 7cm ilgio dializės žarnos dalis. Nuo viršutinės ir apatinės dializės žarnos dalies atkerpama po 5 mm. Apkarpyta dializės žarna yra plaunama silpna dejonizuoto vandens srove. Žarnai suminkštėjus, atskiriamas vienas sluoksnis dializės membranos. Atskirta membrana išdžiovinama ir įdedama į mikrodializės celę. Dializės celė su membrana suveržiama 7 varžtais.

Į vieną kameros pusę (1# kamera) pilama tam tikros koncentracijos 1 ml kurio nors tipo insulino fibrilių. O į kitą dializės kameros pusę (2# kamera) buvo pilamas 1 ml tam tikros tioflavino T koncentracijos tirpalas. Kadangi tioflavinas T laisvai gali judėti per membraną dėl difuzijos iš 2# kameros pusės patenka į 1# kameros pusę, kurioje yra insulino fibrilės. Tioflavinas T jungiasi prie fibrilių ir laisvo tioflavino T koncentracija mažėja abejose kameros pusėse. Kai tioflavinas T prisijungia prie visų insulino fibrilių jungimosi sričių, ThT koncentracija nustoja kisti. Abejose kamerose pasiekiama vienoda pusiausvyrinė ThT koncentracija. Pusiausvyrinei tioflavino T koncentracija pasiekti mėginiai mikrodializės kamerose laikomi 24 valandas. 2# kameroje lieka prie fibrilių neprisjungęs tioflavinas T.

Spektrofotometru išmatuojame mėginių optinio tankio spektrus prieš ir po koncentracijų nusistovėjimo mikrodializės celėje. Prieš mėginių panaudojimą mikrodializės celėje išmatuojame insulino fibrilių ir laisvo tioflavino T optinio tankio spektrus. Po tų pačių mėginių koncentracijų nusistovėjimo mikrodializės celėje išmatuojami likusio laisvo, neprisijungusio prie insulino fibrilių, tioflavino T optinio tankio spektras (mėginys iš 2# kameros) ir suminis laisvų insulino fibrilių, tioflavino T, prisijungusio prie insulino fibrilių, ir laisvo tioflavino T neprisijungusio prie insulino fibrilių, tioflavino T, prisijungusio prie insulino fibrilių, ir laisvo tioflavino T neprisijungusio prie insulino fibrilių, optinio tankio spektras (mėginys iš 1# kameros). Optinio tankio spektrai pavaizduoti **2.2 pav.** 



**2.2 pav.** Optinio tankio spektrai. Oranžinė linija – laisvų insulino fibrilių spektras, pilka linija – laisvo tioflavino T spektras, mėlyna linija – laisvo tioflavino T, susijungusio tioflavino T su insulino fibrilėmis ir laisvų insulino fibrilių suminis spektras. Geltona linija – laisvo ir susijungusio tioflavino T spektras. Žalia linija – tioflavino T susijungusio su insulino fibrilėmis optinio tankio spektras.

Remiantis šviesos adityvumo principu, galime išskaičiuoti laisvo ir susijungusio tioflavino T spektrą, bei tioflavino T susijungusio su insulino fibrilėmis spektrą. Laisvo ir susijungusio su insulino fibrilėmis tioflavino T spektrą (**2.2 pav.** juoda linija) gauname iš laisvų fibrilių, susijungusio ir laisvo tioflavino T spektro atimdami laisvų fibrilių spektrą (**2.2 pav.** mėlyna linija). Iš laisvo ir susijungusio su insulino fibrilėmis tioflavino T spektrą (**2.2 pav.** juoda linija) atimame laisvo tioflavino T spektrą (**2.2 pav.** geltona linija), gauname tioflavino T susijungusio su insulino fibrilėmis tioflavino T susijungusio su insulino fibrilėmis tioflavino T spektrą (**2.2 pav.** juoda linija) atimame laisvo tioflavino T spektrą (**2.2 pav.** geltona linija), gauname tioflavino T susijungusio su insulino fibrilėmis spektrą.

Tioflavino T koncentracija iš 2# kameros buvo nustatoma optinio tankio spektrometru. Laisvas ThT pasižymi didesniu optiniu tankiu 380-450 nm bangos ilgio diapazone. Kintant tioflavino T koncentracijai tiesiškai kinta ir optinio tankio intensyvumas. Išmatavus optinį tankį 5-ioms tikslioms tioflavino T koncentracijoms – 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, nubrėžiama kalibracinė kreivė. Ji naudojama nustatyti tioflavino T ekstinkcijos koeficientui ir patikrinti ar didinant tioflavino T koncentraciją optinis tankis kinta tiesiškai. Ekstinkcijos koeficientas  $\varepsilon$  (1·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) skaičiuojamas pagal lygtį:

$$\varepsilon = \frac{A}{C \cdot l} \tag{1}$$

C – žinoma tioflavino T koncentracija (mol/l), l – šviesos kelias (1cm), A – optinio tankio intensyvumas. Ekstinkcijos koeficientas naudojamas nustatyti ThT koncentracijai kai yra

žinomas tik optinio tankio intensyvumas. Iš dializės kamerų gautų tioflavino T mėginių koncentracija nustatoma išmatavus optinio tankio intensyvumą ir suskaičiuojant pagal lygtį:

$$C = \frac{\varepsilon \cdot A}{l} \tag{2}$$

# 2.2.10. Jungimosi konstantos $k_b$ ir jungimosi santykio n nustatymas

Nustatant tioflavino T jungimosi konstantą buvo braižomas Scatchard grafikas. Buvo naudojamos iš dializės celės duomenų išskaičiuotos prisijungusio ir laisvo tioflavino T koncentracijos ir pradinė insulino fibrilių koncentracija. Grafike ant abscisių ašies atidedama prisijungusio tioflavino T ir bendra insulino fibrilių koncentracijų santykio  $C_b/C_p$  vertės ( $C_b - prisijungusio$  tioflavino T koncentracija,  $C_p - bendra insulino fibrilių koncentracija). Ant ordinačių ašies atidedama <math>C_b/C_p$  vertės padalintos iš po prisijungimo likusios laisvos tioflavino T koncentracijos  $C_f$ , ( $C_b/C_p$ )/ $C_f$ . Grafike atidedamos atitinkamos reiškmės ir vykdoma jų aproksimacija į tiesę. Gaunama tiesės lygtis:

$$y = ax + b \tag{3}$$

Iš jos išreiškiame tiesės krypties koeficientą a:

$$a = \frac{y-b}{x} \tag{4}$$

Scatchard grafike tiesės krypties a koeficientas atitinka neigiamą k<sub>b</sub> reikšmę:

$$k_b = -a \tag{5}$$

Taip pat Scatchard grafiko pagalba nustatoma tioflavino T ir insulino fibrilių jungimosi sričių santykis n. Jungimosi santykio reikšmė 6 n lygi x reikšmei, kai aproksimuota tiesė kerta abscišių ašį, t.y. y = 0:

$$n = \frac{-b}{a} \tag{6}$$

#### 2.2.11. FT-IR spektroskopija

FT-IR spektrai registruojami naudojant "Bruker ALPHA" spektroskopą. Neardytų ultragarsu fibrilių mėginys, kurio tūris V=30 μL įpilamas į CaF<sub>2</sub> matavimo celę. Ši celė pasižymi labai maža infraraudonos šviesos sugertimi 4000 – 1200 cm<sup>-1</sup> ruože, todėl spektrai registruojami šiame intervale. FT-IR spektras registruojamas su 2 cm<sup>-1</sup> 256 kartus ir iš užregistruotų spektrų išvedamas vidurkis. Prieš registruojant spektrus yra užregistruojami oro spektras, kuris sukelia triukšmus dėl jame esančių vandens molekulių, ir užregistruojamas sunkiojo vandens spektras, kurie yra vėliau panaudojami apdorojant gautus mėginių spektrus.

#### 2.3. Duomenų apdorojimas

#### 2.3.1. FT-IR spektro duomenų apdorojimas

Užregistruoti mėginių spektrai yra apdorojami tam, kad būtų paprasčiau juos palyginti tarpusavyje. Spektrai apdorojami GRAMS/AI 8 programa. Spektrų apdorojimas vyksta šia tvarka:

1. Atimamas sunkiojo vandens D<sub>2</sub>O spektras.

2. Atimamas oro spektras.

3. Padaroma bazinės linijos pataisymas. Sukuriama nauja bazinė linija 1700 - 1570 cm<sup>-1</sup> intervale.

4. Bazinė linija nuleidžiama iki nulinės y ašies reikšmės.

5. Spektras su nuleista bazine linija normalizuojamas padalinant spektrą iš jo paties 1700-1570 cm<sup>-1</sup> ploto.

#### 2.3.2. Insulino agregacijos kinetikos duomenų apdorojimas

Spontaninę insulino agregaciją galima aprašyti sigmoidiniu modeliu (**2.3 pav.**), kuris susideda iš trijų fazių. Per pirmąją (*lag*) fazę natyvus insulino baltymas destabilizuojasi ir pakeičia savo struktūrą. Destabilizavęs insulinas formuoja pirminius monomerus, kurie jungiasi į agregacijos branduolius. Pirmosios fazės metu, kol dar yra susiformavę tik agregacijos branduoliai tioflavino T fluorescencijos intensyvumas nedidėja ir išlieka minimalus. Antrosios fazės (augimo) metu, prasideda eksponentinis branduolių ilgėjimas, formuojasi ilgos insulino fibrilės. Šios fazės metu fluorescencijos intensyvumas auga, nes tioflavinas T prisijungia prie vis daugiau susidarusių fibrilių. Paskutinės trečios fazės metu (agregacijos pabaiga) agregacija sustoja, nes nebelieka laisvų insulino molekulių, todėl tioflavino T fluorescencijos intensyvumas stabilizuojasi ir nekinta.



2.3 pav. Insulino fibilių agregaciją rodanti schema.

Tam, kad duomenis būtų galima lyginti tarpusavyje, jie normalizuojami pagal formulę 8:

$$y_n = \frac{y - y_{min}}{y_{max} - y_{min}} \tag{8}$$

kur,  $y_n$  – nomalizuotas fluorescencijos intensyvumas,  $y_{min}$  – minimali fluorescencijos reikšmė,  $y_{max}$  – maksimali fluorescencijos vertė. Normalizuotų duomenų reikšmės nebūna mažesnės už 0 ir nedidesnės už 1.

Iš normalizuotų duomenų, eksponentinę krievės dalį aproksimuojame į tiesę.  $A_1$  reikšmę gauname, kai tiesė kerta abscišių ašį,  $A_2$  reikšmė gaunama, kai tiesė pasiekia reikšmę lygią 1. Apskaičiuojame  $t_{1/2}$  reikšmę, kuri parodo po kiek laiko nuo agregacijos pradžios yra pasiekiama pusė maksimalios fluorescensijos vertės ir naudojama agregacijos greičiui įvertinti.  $t_{1/2}$  reikšmė Normalizuoti duomenys gluodinami Boltzmann'o sigmoide (Banerjee, Das, 2012), kuri aprašoma lygtimi 9.

$$y = \frac{A_1 + A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}} + A_2 \tag{9}$$

# REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

# 3.1 Insulino fibrilių struktūrų nustatymai atominės jėgos mikroskopu

Pradinis tyrimų uždavinys yra pasigaminti insulino fibrilių AB ir FB tirpaluose. Insulino kristalai ištirpinami skirtinguose buferiniuose tirpaluose. Insulino koncentracija AB ir FB tirpaluose 4,64 mg/ml. Insulinas agreguojamas 24 val. 60 °C.

Po spontaninės insulino agregacijos, kuri buvo vykdoma AB ir FB tirpaluose, buvo norima nustatyti ar insulinas suformavo fibrilių tipo agregatus tiek AB, tiek ir FB tirpaluose. Insulino agregatai tikrinami pasinaudojant atominės jėgus mikroskopu (**3.1 pav.**).



**3.1 pav.** Atominės jėgos mikroskopu padarytos nuotraukos. A – 800  $\mu$ m ultragarsu neskaldytų insulino agregatų suformuotų FB tirpale nuotrauka. B – 800  $\mu$ m ultragarsu neskaldytų insulino agregatų nuotrauka suformuotų AB tirpale. Nuotraukos plotis 5  $\mu$ m.

Iš atominės jėgos mikroskopu padarytų nuotraukų (**3.1 pav.**) matome, kad insulinas po spontaninės agregacijos FB ir AB tirpaluose suformuoja panašias, įvairaus ilgio, nešakotas, 4-10 nm skersmens fibriles, linkusias sukibti tarpusavyje ir sudaryti didesnius agregatų darinius. Taip pat matome, kad AB tirpale insulino fibrilių yra daugiau negu FB tirpale. AB tirpale fibrilės pasižymi didesniu skersmeniu ir labiau linkusios sudaryti didesnius agregatų darinius, nei insulino fibrilės FB tirpale. Atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos taip pat parodo, kad po spontaninės agregacijos tiek FB, tiek ir AB tirpaluose insulinas suformuoja į fibrilės panašias struktūras.

#### 3.2 Insulino struktūrų palyginimas naudojant FT-IR spektroskopiją

Skirtumų nustatymui fibrilių antrinėje struktūroje tarp skirtinguose FB ir AB tirpaluose suformuotų fibrilių buvo naudojama FT-IR spektroskopija. Naudojant FT-IR spektroskopiją ir išmatavus infraraudonos šviesos sugerties spektrus nuo 1700 cm<sup>-1</sup> iki 1570 cm<sup>-1</sup> galima nustatyti ar yra struktūrinių skirtumų  $\beta$ -klostėse. Infraraudonos šviesos, insulino fibrilių suformuotų FB ir AB tirpaluose, sugerties spektrai pavaizduoti **3.2 pav.** 



**3.2 pav.** FT-IR infraraudonos šviesos sugerties spektrų palyginimas. Žalia linija – fibrilių, suformuotų AB tirpale, infraraudonos šviesos sugerties spektras. Raudona linija - fibrilių, suformuotų FB tirpale, infraraudonos šviesos sugerties spektras.

Paveikslas vaizduoja fibrilių suformuotų AB ir FB tirpaluose, infraraudonosios šviesos sugertį amido I ruože. Fibrilių suformuotų FB tirpale sugerties spektro maksimumas yra ties 1629 cm<sup>-1</sup>, fibrilių suformuotų AB tirpale infraraudonosios šviesos sugerties maksimumas yra ties 1627 cm<sup>-1</sup>. Matome, kad tarp skirtinguose tirpaluose suformuotų insulino fibrilių yra 2 cm<sup>-1</sup> spektrų poslinkis. Taip pat matome, kad nuo 1680 cm<sup>-1</sup> iki 1650 cm<sup>-1</sup> yra infraraudonos šviesos spektrų išsiskyrimas. Šie šviesos sugerties spektrų poslinkiai ir išsiskyrimai amido I ruože parodo, kad insulino fibrilės suformuotos AB tirpale ir insulino fibrilės suformuotos FB tirpale skiriasi savo fibrilių struktūra. Todėl galima teigti, kad insulinas 20% acto rūgštyje suformuoja kitokios struktūros fibriles, nei insulino fibrilės suformuotos fosfatiniame buferiniame tirpale.

# 3.3. Tioflavino T poveikio insulino fibrilių susidarymo kinetikai nustatymas

Tioflavino T poveikio insulino fibrilių susidarymo kinetikai tyrimai buvo atliekami naudojant "Qiagen Rotor-Gene Q" įrenginį. Buvo paruošti 6 skirtingi mėginių mišiniai. Pirmi 3 mėginiai pagaminti FB tirpale, kuriame buvo 100  $\mu$ M insulino. 1 mėginyje įdėta 12,5  $\mu$ M, 2 mėginyje 25  $\mu$ M, 3 mėginyje 37,5  $\mu$ M tioflavino T. Likę 3 mėginiai pagaminti AB tirpale, kuriame buvo 100  $\mu$ M insulino. 4 mėginyje įdėta 12,5  $\mu$ M, 5 mėginyje 25  $\mu$ M, 6 mėginyje 37,5  $\mu$ M tioflavino T. Kiekvienas mėginys išpilstytas į 6 (200  $\mu$ l talpos) mėgintuvėlius.

Agregacija buvo vykdoma 20 valandų, 60 °C temperatūroje. Užregistruoti insulino agregacijos kinetikos duomenys normalizuoti ir pavaizduoti **3.3 pav.** 



**3.3 pav.** Normalizuoti insulino agregacijos kinetikos grafikai. Žydra, mėlyna ir juoda – insulinas ištirpintas FB tirpale. Žydra kreivė – tioflavino T koncentracija 12,5  $\mu$ M, mėlyna – 25  $\mu$ M, juoda – 37,5  $\mu$ M. Geltona, oranžinė ir raudona – insulinas ištirpintas AB tirpale. Geltona kreivė – tioflavino T koncentracija 12,5  $\mu$ M, oranžinė – 25  $\mu$ M, raudona – 37,5  $\mu$ M.

**3.3 pav.**Matome kaip keičiasi tioflavino T fluorecencijos emisijos intensyvumas agreguojant insulinui skirtinguose tirpaluose ir esant skirtingai tioflavino T koncentracijai. Iš šių duomenų išskaičiuojame agregacijos puslaikio (laikas per kurį suagreguoja pesę insulino molekulių)  $t_{1/2}$  reikšmę. Gautos  $t_{1/2}$  reikšmės pavaizduojamos grafiškai **3.4 pav.** 



**3.4 pav.**  $t_{1/2}$  reikšmės priklausomybė nuo tioflavino T koncentracijos ir tirpalo, kuriame buvo ištirpintos insulino molekulės. Mėlyni stulpeliai – insulinas ištirpintas FB tirpale, oranžiniai – insulinas ištirpintas AB tirpale.

Iš pav.3.4. matome, kad insulino agregacijos puslaikis FB tirpale nepriklauso nuo tioflavino T koncentracijos ir svyruoja nuo 550 minučių iki 700 minučių. Taip pat iš **3.4 pav.** galime nustatyti, kad insulinas greičiau agreguoja AB tirpale. Insulinas AB tirpale agreguoja priklausomai nuo tioflavino koncentracijos. Esant 12,5 µM tioflavino T pusė insulino molekulių suagreguoja per 280 minučių, esant 25 µM per 406 minutes, esant 37,5 µM per 453 minutes. Agregacijos puslaikio skirtumas tarp įdėto 12,5 µM ir 25 µM tioflavino T yra 126 minutės, o tarp įdėto 12,5 µM ir 37,5 µM tioflavino T yra 173 minutės. Agregacijos vidutinis skirtumas tarp įdėto 25 µM ir 37,5 µM tioflavino T yra 47 minutės. Todėl galime manyti, kad insulino agregacijos greitis AB tirpale priklauso nuo tirpale esančios tioflavino T koncentracijos. Didinant tioflavino T koncentraciją insulino agregacija sulėtėja. Todėl galime teigti, kad tioflavinas T AB tirpale tiesiogiai stabdo insulino agregaciją, trukdydamas prisijungti insulino molekulėms prie besiformuojančių fibrilių.

#### 3.4. Tioflavino T prisijungusio prie insulino fibrilių fluorescencijos tyrimas

Buvo tiriama tioflavino T, prisijungusio prie ultragarsu skaldytų insulino fibrilių, fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybė nuo tioflavino T koncentracijos mėginyje. Tioflavino T fluorescencijos emisijos intensyvumas buvo matuojamas spektrofluorimetru. Į kiuvetę, kurioje buvo įpilta 70 µl insulino fibrilių tirpalo, buvo pilamas didelės koncentracijos tioflavino T tirpalas (1 mM) ir matuojama jo fluorescencija. Nubraižomi grafikai vaizduojantys



tioflavino T fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybę nuo jo koncentracijos (**3.5 pav.** ir **3.6 pav.**).

**3.5 pav.** Tioflavino T, prisijungusio prie fibrilių suformuotų FB tirpale, fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo Tioflavino T koncentracijos. Mėlyna kreivė – ThT fluorescencijos intensyvumas, kai pradinė insulino koncentracija 200  $\mu$ M, žalia kreivė – pradinė insulino koncentracija 400  $\mu$ M, oranžinė kreivė – pradinė insulino koncentracija 800  $\mu$ M. Vertikalios tiesės vaizduoja tioflavino T koncentraciją ir fluorescencijos emisijos intensyvumas, kai yra pasiekiama 98% maksimalios fluorescencijos vertės.

Nubraižius fluorescencijos emisijos priklausomybės grafikus (**3.5 pav.**), apskaičiuojama tioflavino T koncentracija, kai pasiekiama 98% maksimalios fluorescencijos vertės. Prisijungusio tioflavino T fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybės nuo jo koncentracijos tyrimas atliktas su 3-jomis skirtingomis pradinėmis insulino fibrilių su formuotų FB tirpale, koncentracijomis. Esant pradinei 200  $\mu$ M insulino fibrilių koncentracijai (galutinė koncentracija 162,3  $\mu$ M), 98% fluorescencijos emisijos intensyvumo vertė pasiekiama kai tioflavino T koncentracija yra 68  $\mu$ M. Mėginyje esant pradinei 400  $\mu$ M insulino fibrilių koncentracijai (galutinė koncentracija 324,6  $\mu$ M), 98% fluorescencijos emisijos intensyvumo vertė pasiekiama kai tioflavino T koncentracija yra 87  $\mu$ M. Mėginyje esant pradinei 800  $\mu$ M insulino fibrilių koncentracijai (galutinė koncentracija 649,1  $\mu$ M), 98% fluorescencijos intensyvumo intensyvumo vertė pasiekiama kai tioflavino T koncentracija fibrilių koncentracija yra 109  $\mu$ M. Pradinė insulino fibrilių koncentracija skiriasi nuo galutinės fibrilių koncentracijos, nes prieš kiekvieną flurescencijos matavimą yra pridedama tik tioflavino T tirpalo, todėl bendras tūris kiuvetėje didėja, o insulino fibrilių koncentracija mažėja (pradinis V=70  $\mu$ l, galutinis V=86,28  $\mu$ I).

Prisijungusio tioflavino T prie insulino fibrilių fluorescencijos emsijos intensyvumo priklausomybės nuo jo koncentracijos tyrimas taip pat buvo pakartotas su insulino fibrilėmis, suformuotomis AB tirpale (**3.6 pav.**). Buvo naudojamos tos pačios pradinės insulino fibrilių koncentracijos (200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 800  $\mu$ M), kaip ir tyrime prieš tai, su insulino fibrilėmis kurios suformuotos FB tirpale.



**3.6 pav.** Tioflavino T, prisijungusio prie fibrilių suformuotų AB tirpale, fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybė nuo koncentracijos. Mėlyna kreivė – ThT fluorescencijos intensyvumas, kai pradinė insulino koncentracija 200  $\mu$ M, žalia kreivė – pradinė insulino koncentracija 400  $\mu$ M, oranžinė kreivė – pradinė insulino koncentracija 800  $\mu$ M. Vertikalios tiesės vaizduoja tioflavino T koncentraciją ir fluorescencijos intensyvumą, kai yra pasiekiama 98% maksimalios fluorescencijos vertės.

Nubraižomi fluorescencijos emisijos intensyvumo priklausomybės grafikai nuo tioflavino T ir insulino fibrilių koncentracijų (**3.6 pav.**). Apskaičiuojama tioflavino T koncentracija, kai pasiekiama 98% maksimalios fluorescencijos vertės. Esant pradinei 200 µM insulino fibrilių koncentracijai (galutinė koncentracija 162,3 µM), 98% fluorescencijos emisijos intensyvumo vertė pasiekiama kai tioflavino T koncentracija yra 60 µM. Mėginyje esant pradinei 400 µM insulino fibrilių koncentracijai (galutinė koncentracija 324,6 µM), 98% fluorescencijos emisijos intensyvumo vertė pasiekiama kai tioflavino T koncentracija yra 64 µM. Mėginyje esant pradinei 800 µM insulino fibrilių koncentracijai (galutinė koncentracija yra 64 µM. Mėginyje esant pradinei 800 µM insulino fibrilių koncentracijai (galutinė koncentracija yra 64 µM), 98% fluorescencijos emisijos intensyvumo vertė pasiekiama kai tioflavino T koncentracija yra 64 µM), 98%

**3.6 pav.** matome, kad didėjant tioflavino T koncentracijai mėginyje nuo 110  $\mu$ M iki 190  $\mu$ M, fluorescencijos emisijos intensyvumas mažėja. Fluorescencijos emisijos intensyvumas mažėja dėl dviejų priežasčių: insulino fibrilių koncentracijos mažėjimo mėginyje ir pasireiškusio tioflavino T vidinio filtro reiškinio. Fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas labiau pastebimas naudojant tioflaviną T, kuris buvo skiestas 20% acto rūgšties tirpalu (**3.6 pav.**), negu naudojant tioflaviną T, kuris buvo skiestas fosfatiniu buferiniu tirpalu (**3.5 pav.**). Tai yra dėl to, kad 20% acto rūgšties tirpale skiestas tioflavinas T pasižymi didesniu optiniu tankiu 380- 450 nm diapazone negu tioflavinas T skiestas fosfatiniu buferiniu tirpalu (**3.8 pav.**), todėl vidinio filtro reiškinys pasireiškia stipriau tioflavinui T skiedžiamam su 20% acto rūgšties buferiniu tirpalu.

Apskaičiavus tioflavino T koncentracijas, kai pasiekiama 98% maksimalios fluorescencijos vertės, gautos koncentracijų reiškmės lyginamos tarp fibrilių suformuotų FB tirpale ir fibrilių suformuotų AB tirpale (**3.7 pav.**)



**3.7 pav.** Tioflavino T koncentracijos, kai pasiekiama 98% maksimalios fluorescencijos vertės. Mėlyni stulpeliai – tioflavinas T jungiasi prie insulino fibrilių suformuotų FB tirpale, oranžinė – tioflavinas T jungiasi prie insulino fibrilių suformuotų AB tirpale. 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 800  $\mu$ M – pradinės insulino fibrilių koncentracijos.

Histogramoje (**3.7 pav.**) matome, kad 98% maksimalios fluorescencijos emisijos vertės pasiekiama esant didesnei ThT koncentracijai, kai jis jungiasi prie insulino fibrilių suformuotų FB tirpale lyginant su fibrilėmis suformuotomis AB tirpale. Šis tioflavino T koncentracijų skirtumas, pastebimas su visomis 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 800  $\mu$ M pradinėmis insulino fibrilių koncentraciją, tioflavino T koncentracijų

skirtumas, tarp tioflavino T prisijungusio prie fibrilių suformuotų FB tirpale ir insulino fibrilių suformuotų AB tirpale, taip pat didėja.

Keičiant pradinę insulino fibrilių koncentraciją taip pat keičiasi reikalinga tioflavino T koncentracija, norint pasiekti 98% maksimalios fluorescencijos vertės. Padidinus pradinę fibrilių koncentraciją didėja reikiama tioflavino T koncentracija. Bet reikiama tioflavino T koncentracija didėja nevienodai lyginant tarp fibrilių suformuotų FB tirpale ir fibrilių suformuotų AB tirpale. Padidinus insulino fibrilių koncentraciją suformuotų FB tirpale nuo 200  $\mu$ M iki 400  $\mu$ M tioflavino T koncentracijos pokytis yra 19±9  $\mu$ M, padidinus nuo 400  $\mu$ M iki 800  $\mu$ M tioflavino T koncentracijos pokytis yra 22±11  $\mu$ M, didinant nuo 200  $\mu$ M iki 800  $\mu$ M tioflavino T koncentracijos pokytis yra 41±12  $\mu$ M. Padidinus insulino fibrilių koncentraciją suformuotų AB tirpale nuo 200  $\mu$ M iki 400  $\mu$ M tioflavino T koncentracijos pokytis yra 4±7  $\mu$ M, padidinus nuo 400  $\mu$ M iki 800  $\mu$ M tioflavino T koncentracijos pokytis yra 8±5  $\mu$ M.

Remiantis tioflavino T, prisijungusio prie insulino fibrilių, fluorescencijos tyrimo duomenimis galime daryti išvadą, kad tioflavinas T skirtingai jungiasi prie insulino fibrilių suformuotų FB ir AB tirpaluose. Todėl galime teigti, kad insulino fibrilės suformuotos FB tirpale skiriasi savo struktūra ir tioflavino T prisijungimo sritimis, lyginant su fibrilėmis suformuotomis AB tirpale.

# 3.5. Tioflavino T jungimosi prie insulino fibrilių jungimosi konstantos $k_{\text{b}}$

#### nustatymas

Tioflavino T jungimosi konstantos nustatyme buvo naudojama pusiausvyrinės mikrodializės celė. Mėginiai, kurie buvo matuojami mikrodializės celėje, prieš ir po mikrodializės užregistruoti šviesos optinio tankio spektrai. Pirmiausiai, prieš pradedant atlikti tyrimus su mikrodializės cele, buvo išmatuoti gryno FB ir AB tirpaluose skiesto tioflavino T optinio tankio spektrai. Išmatuotos 5 skirtingos tioflavino T koncnetracijos: 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, spektrai pavaizduoti **3.7 pav.** 



**3.7 pav.** Tioflavino T optinio tankio spektrai. Matuotas optinis tankis nuo 330 nm iki 490 nm. Mėlynos linijos - tioflavino T, skiesto FB tirpale, optinio tankio spektrai, oranžinės linijos tioflavino T, skiesto AB tirpale. 1, 2, 3, 4, 5 – tioflavino T skiesto FB ir AB tirpaluose koncentracijos – 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M. Vertikali mėlyna tiesė – žymi tioflavino T skiesto FB tirpale šviesos bangos ilgį esant maksimaliam optiniam tankiui. Vertikali oranžinė tiesė – Tioflavino T skiesto AB tirpale šviesos bangos ilgį esant maksimaliam optiniam tankiui.

Užregistravus spektrus pastebėta, kad tioflavino T skiesto AB tirpale optinio tankio maksimumas pasistūmęs į dešinę pusę (**3.7 pav.**, vertikali oranžinė tiesė), link didesnio šviesos bangos ilgio, lyginant su tioflavino T skiesto FB tirpalu (**3.7 pav.**, vertikali mėlyna tiesė). Tioflavino T skiesto FB tirple optinio tankio maksimumas yra ties  $411\pm0,5$  nm, o tioflavino T skiesto AB tirpale, optinio tankio maksimumas yra ties  $418\pm0,5$  nm, o jų skirtumas lygus  $7\pm1$  nm.

Iš **3.7 pav.** duomenų, paimamos optinio tankio reikšmės, iš visų 5-ių tioflavino T koncentracijų ties 411 nm bangos ilgiu, kai ThT skiestas FB tirpale. Tas pats padaroma su ThT skiestu AB tirpale, tik optinio tankio reikšmės yra paimamos ties 418 nm. Šios reikšmės atidedamos grafiškai **3.8 pav.** Atidėtoms vertėms įvykdoma aproksimacija į 2 atskiras tieses – viena tiesė tioflavinui T skiestam AB tirpale ir kita tioflavinui T skiestam FB tirpale. Nustatomos tiesės lygtys ir koeficientas R<sup>2</sup>.



**3.8 pav.**Tioflavino T optinio tankio priklausomybė nuo jo paties koncentracijos. Mėlyna tiesė – tioflavino T skiesto FB tirpale optinio tankio priklausomybė ( $\lambda = 411$  nm). Oranžinė linija – tioflavino T skiesto AB tirpale optinio tankio priklausomybė ( $\lambda = 418$  nm).

Aproksimavus pasirinktas reikšmės į tiesę, gauname R<sup>2</sup> koeficientą. R<sup>2</sup> koeficientas rodo, kaip tiksliai reikšmės atitinką tiesę. Tioflavino T, skiesto FB tirpale, R<sup>2</sup> = 0,9998, o tioflavino T, skiesto AB tirpale R<sup>2</sup> = 0,9997. Abi R<sup>2</sup> reikšmės yra labai artimos 1, kai tioflavino T koncentracija neviršija 100  $\mu$ M. Todėl galime teigti, kad šiose tioflavino T koncentracijose optinio tankio intensyvumas tiesiškai priklauso nuo jo paties koncentracijos. Tai labai svarbu norint paskaičiuoti teisingą tioflavino T ekstinkcijos koeficientą. Ekstinkcijos koeficientas skaičiuojamas pagal (1) formulę. Naudojant kiekvieną tioflavino T, skiesto FB tirpale, optinio tankio vertę, apskaičiuojamas kiekvienos vertės ekstinkcijos koeficientas ir išvedamas vidurkis ε = 17923±11 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. Tokiu pačiu metodu apskaičiuojamas tioflavino T, skiestu AB tirpalu, ekstinkcijos koeficientas ε = 21814±14 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. Ekstinkcijos koeficientą naudosime nustatyti tioflavino T koncentracijai, išmatavus jo optinį tankį. Taip pat **3.8 pav.** matome, kad tioflavinas T, skiestas AB tirpale, pasižymi didesniu optiniu tankiu, negu tioflavinas T skiestas FB tirpale.

Po atliktų šviesos sugerties tyrimų su grynu tioflavinu T, pradedama naudoti mikrodializės cėlė. Jos pagalba buvo gauti tioflavino T prisijungusio prie insulino fibrilių optinio tankio spektrai. **3.9 pav.** pavaizduoti 4-ių, skirtingų pradinių mišinių kombinacijų optinio tankio spektrai, gauti naudojant pradinę 25  $\mu$ M tioflavino T ir insulino fibriles 100  $\mu$ M bei 200  $\mu$ M, suformuotas FB ir AB tirpaluose.



**3.9 pav**. Tioflavino T ir insulino fibrilių optinio tankio spektrai. Oranžinė linija – laisvų insulino fibrilių spektras, pilka linija – laisvo tioflavino T spektras, mėlyna linija – laisvo tioflavino T, susijungusio tioflavino T su insulino fibrilėmis ir laisvų insulino fibrilių suminis spektras. Geltona linija – laisvo ir susijungusio tioflavino T spektras. Žalia linija – susijungusio tioflavino T su insulino fibrilėmis optinio tankio spektras. A ir B – optinio tankio spektrai, kai tioflavinas T ir insulino fibrilės yra FB tirpale. A – insulino fibrilių koncentracija 100  $\mu$ M, B – 200  $\mu$ M. C ir D – optinio tankio spektrai, kai tioflavinas T ir insulino fibrilės yra AB tirpale. C – insulino fibrilių koncentracija 100  $\mu$ M, D – 200  $\mu$ M. A, B, C, D grafikuose laisvo tioflavino T koncentracija yra vienoda - 25  $\mu$ M.

Iš **3.9 pav.** matome, kad didinant pradinę insulino fibrilių koncentraciją, prisijungusio tioflavino T su insulino fibrilėms optinio tankio spektro intensyvumas taip pat auga tiek naudojant insulino fibriles suformuotas FB buferyje (**3.9 pav.** A-B), tiek naudojant fibriles suformuotas AB buferyje (**3.9 pav.** C-D). Tioflavino T susijungusio su insulino fibrilėmis optinio tankio maksimalus intensyvumas pasiekiamas ties 449±1 nm. Šis šviesos bangos ilgis kai optinis

tankis yra didžiausia yra vienodas tioflavino T susijungusio FB ir AB tirpaluose suformuotomis fibrilėmis. Anksčiau nustatėme, kad laisvas tioflavinas T FB ir AB tirpaluose optinio tankio maksimumas pasiekiamas ties skirtingais bangos ilgiais. Bet kai tioflavinas T prisijungia prie insulino fibrilių, jo optinio tankio maksimumas FB ir AB tirpaluose tampa vienodas. Todėl galime teigti, kad tioflavinas T tokiu pačiu būdu jungiasi prie insulino fibrilių nepriklausomai nuo to, kokiu buferiniu tirpalu jis buvo skiestas.

Atlikus daugiau koncentracijų nusistovėjimų bandymų su skirtingomis pradinėmis medžiagų koncentracijomis, buvo apskaičiuota kokia yra prisijungusio tioflavino T koncentracija, keičiant pradinę insulino fibrilių ar tioflavino T koncentraciją. Gauti duomenys pavaizduoti **3.10 pav.** 



**3.10 pav.** Prisijungusio tioflavino T koncentracijų grafikai, keičiant pradines koncentracijas. Mėlyni taškai – tioflavinas T jungiasi prie FB tirpale suformuotų fibrilių, oranžiniai taškai – tioflavinas T jungiasi prie AB tirpale suformuotų fibrilių. A grafikas – didinama pradinė insulino fibrilių koncentracija, tioflavino T koncentracija buvo pastovi 25  $\mu$ M. B grafikas – didinama pradinė tioflavino T koncentracija, insulino fibrilių koncentracija buvo pastovi 50  $\mu$ M.

**3.10 pav. A** matome, kad didinant insulino fibrilių, suformuotų FB ar AB tirpale, koncentraciją, prisijungusio tioflavino T koncentracija didėja. Taip pat prisijungusio tioflavino T koncentracija yra didesnė, kai jis jungiasi prie insulino fibrilių suformuotų FB tirpale. Didinant pradinę tioflavino T koncentraciją (**3.10 pav. B**) prisijungusio tioflavino T koncentracija taip pat didėja.

Pasinaudojant **3.10 pav. B** grafiko duomenimis nubraižomas Scatchard grafikas (**3.11 pav.**).



**3.11 pav.** Scatchard grafikas. Apskritimai – eksperimentiniai duomenys, tiesės – eksperimentinių duomenų aproksimavimas į tiesę. Mėlyna spalva – insulino fibrilės suformuotos FB tirpale. Oranžinė spalva – insulino fibrilės suformuotos AB tirpale.

Naudojant Scatchard grafiką (**3.11 pav.**) buvo gauta tioflavino T jungimosi konstanta ir jungimosi santykis. Grafike atidėtos reikšmės aproksimuojamos į dvi tieses. Gautos tiesių lygtys, bei atidėtų reikšmių atitikimo tiesei koeficientai  $R_{FB}^2 = 0,78$ ,  $R_{AB}^2 = 0,66$ . Matome, kad atikimo tiesei koeficientų reikšmės nėra artimos vienetui, todėl galime teigti, kad duomenys prastai atitinka tiesinę priklausomybę ir visi tolimesni skaičiavimai iš tiesės lygties gali turėti dideles paklaidas. Todėl iš tiesės lygčių galime nustatyti tik tam tikras tendencijas. Iš tiesės lygties nustatyta tioflavino T jungimosi konstanta, kai jis jungiasi prie insulino fibrilių suformuotų FB tirpale K<sub>b</sub> =30454 M<sup>-1</sup>. Kai tioflavinas T jungiasi prie insulino fibrilių, suformuotų AB tirpale, K<sub>b</sub> =8896 M<sup>-1</sup>. Matome, kad tioflavino T jungimosi konstanta yra didesnė kai jis jungiasi prie fibrilių suformuotų FB tirpale. Tioflavino T ir insulino fibrilių jungimosi santykis, kai ThT jungiasi prie fibrilių suformuotų FB tirpale n<sub>FB</sub>=0,17. Kai ThT jungiasi prie fibrilių suformuotų AB tirpale, jungimosi santykis yra n<sub>AB</sub>=0,26. Matome, kad tioflavino T jungimosi santykis tarp FB ir AB tirpaluose suformuotų fibrilių skiriasi.

Scatchard grafikas yra gan netikslus metodas nustatyti jungimosi konstantai bei jungimosi santykui, nes šis metodas labai jautrus eksperimentų metu gautų rezultatų paklaidoms. Bet neatsižvelgiant į galimas paklaidas galime teigti, kad tioflavinas T stipriau jungiasi prie insulino fibirlių susiformavusių fosfatiniame buferiniame tirpale nei prie 20% acto rugštyje suformavusių fibrilių.

# IŠVADOS

- 1. Atominės jėgos mikroskopu ir FT-IR nustatyti nedideli struktūriniai skirtumai tarp insulino fibrilių susidarusių fosfatiniame buferiniame tirpale ir 20% acto rugštyje.
- 2. 20% acto rugštyje tioflavinas T lėtina insulino agregaciją, o fosfatiniame buferiniame tirpale tiolfavinas T įtakos insulino agregacijai neturi.
- 3. Tioflavinas T prie fosfatiniame buferiniame tirpale susidariusių insulino fibrilių jungiasi stipriau nei prie insulino fibrilių, susidarusių acto rūgštyje.

# VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Lukas Gudiškis

Bakalauro baigiamasis darbas

## TIOFLAVINO T JUNGIMOSI PRIE INSULINO AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ TYRIMAS

#### SANTRAUKA

Daugumos amiloidinių baltymų formuojamų agregatų struktūra yra panaši – dominuoja pasikartojančios  $\beta$ -klostės, statmenos fibrilių ašiai. Tačiau skirtingose sąlygose net tas pats baltymas gali sudaryti skirtingo tipo agregatus, kurie skiriasi savo struktūra bei kitomis fizinėmis savybėmis. Rekombinantinis žmogaus insulinas dėl savo savybės lengvai formuoti amiloidines fibriles *in vitro* esant žemam pH ir aukštai temperatūrai, buvo pasirinktas kaip modelinis baltymas.

Darbo tikslas buvo nustatyti Tioflavino T jungimosi skirtumus tarp insulino amiloidinių fibrilių susidariusių 20 % acto rūgšties tirpale arba fosfatiniame buferiniame tirpale. Tyrimui atlikti naudoti matomosios šviesos sugerties, fluorescencinė ir FTIR spektroskopiniai metodai ir atominės jėgos mikroskopija. Darbe nustatyti struktūriniai skirtumai tarp fibrilių suformuotų skirtinguose tirpaluose. Naudojant pusiausvyrinės dializės celę pavyko atskirti tioflavino T prisijungusio prie insulino fibrilių spektrus. Rezultatai parodė, kad tioflavinas T lėtina insulino agregaciją 20 % acto rūgštyje. Taip pat nustatyta, kad tioflavinas T prie fosfatiniame buferiniame tirpale insulino susidariusių fibrilių jungiasi stipriau nei prie insulino fibrilių, suformuotų acto rūgštyje.

# VILNIUS UNIVERSITY LIFE SCIENCES CENTER INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Lukas Gudiškis

Bachelor thesis

# BINDING STUDY BETWEEN TIOFLAVIN T AND INSULIN AMYLOID-LIKE FIBRILS

#### SUMMARY

Most of amyloid-like protein aggregates have similar structure – it conssits of repeating  $\beta$ sheets which are perpendicular to the fibril axis. However, at different conditions even the same protein can form slightly different amyloid-like structures. Recombinant human insulin was used as model protein because of it's ability to easily form amyloid-like fibrils *in vitro* in low pH and high temperature.

The aim of the work was to identify the binding differences between thioflavin T and insulin amyloid-like fibrils formed either in 20 % acetic acid or in phosphate buffer. Visible absorbtion, fluorescence and FTIR spectroscopies and atomic force microscopy were used in the study. Structural differences between fibrils formed in different solutions were identified. Using equilibrium dialysis cell it was possible to get absorbance spectra of Thioflavin T bound to insulin amyloid-like fibrils. It was identified that T tioflavin can slow down insulin aggregation in 20% acetic acid, but has little impact in phosphate buffer. It was also found that insulin fibrils formed in phosphate buffer bind tioflavin T stronger than and insulin fibrils formed in 20% acetic acid.

Sipe JD, Cohen AS. Review: history of the amyloid fibril. J Struct Biol. 2000;130(2-3):88–98.

Maji SK, Wang L, Greenwald J, Riek R. Structure-activity relationship of amyloid fibrils. FEBS Lett. 2009;583(16):2610–7.

Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu Rev Biochem. 2006;75:333–66.

Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. Amyloid peptides and proteins in review. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2007;159:1–77.

Uversky VN, Fink AL. Protein Misfolding, Aggregation and Conformational Diseases. Vols. 1, 2. Kluwer Academic/PlenumAmaral MD. J. Mol. Neurosci. **2004;**23:41–48.

**Lomas DA, Carrell RW.** Serpinopathies and the conformational dementias Nat. Rev. Genet. **2002**; 3:759–68, 10.1038/nrg907.

Westermark P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B. Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Amyloid **2005**;12:1–4.

**Stefani M, Dobson CM.** Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. J. Mol. Med. **2003**;81:678–99.

**Uversky VN, Fink AL.** Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. Biochim. Biophys. Acta **2004**;1698:131–53.

Hortschansky P, Schroeckh V, Christopeit T, Zandomeneghi G, Fändrich M. The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. Protein Sci. 2005;14(7):1753–9.

**Foder`a V, Librizzi F, Groenning M, van de Weert M, Leone M.** Secondary nucleation and accessible surface in insulin amyloid fibril formation. J Phys Chem B. **2008**; 112(12):3853–8.

Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky VN, Fink AL. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. Biochemistry. **2001**a;40(28):8397–409.

**Kumar S, Udgaonkar JB.** Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. Curr Sci. **2010**;98:639–56.

**Milto K, Michailova K, Smirnovas V.** Elongation of mouse prion protein amyloid-like fibrils: effect of temperature and denaturant concentration. PLoS One. **2014**;9(4):e94469.

#### Smith, G. D., Swenson, D. C., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Reynolds, C. D.

Structural stability in the 4-zinc human insulin hexamer. Proceedingsof the National Academy of Sciences of the United States of America, *81*(November), **1984**; 7093–7097.

## Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN, Fink

**AL.** Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. Biochemistry. **2001**; 40(20):6036–46.

Ivanova, M. I., Sievers, S. a, Sawaya, M. R., Wall, J. S., Eisenberg, D. Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proceedings of the NationalAcademy of Sciences of the United States of America*, *106*, **2009**; 18990–18995.

**Porat, Y., Abramowitz, A. & Gazit, E.** 2006. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. Chem. Biol. Drug Des. **2006**; 67, 27–37.

**Fonin AV, Sulatskaya AI, Kuznetsova IM, Turoverov KK.** Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction. **2014**; PLoS ONE 9(7): e103878. doi:10.1371/journal.pone.0103878

Pham CL, Kwan a H, Sunde M. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose. Essays Biochem. 2014; 56: 207–219. doi: 10.1042/BSE0560207 PMID: 25131597

Jose L. Jimenez, Ewan J. Nettleton, Mario Bouchard, Carol V. Robinson, Christopher M. Dobson, and Helen R. Saibil. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. 2002. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.142459399

Liza Nielsen, Ritu Khurana, Alisa Coats, Sven Frokjaer, Jens Brange, Sandip Vyas, Vladimir N. Uversky, and Anthony L. Fink. Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism. 2001. DOI: 10.1021/bi002555c

Sneideris T, Darguzis D, Botyriute A, Grigaliunas M, Winter R, Smirnovas V. pH Driven Polymorphism of Insulin Amyloid-Like Fibrils. 2015. PLoS ONE 10(8): e0136602. doi:10.1371/journal. pone.0136602

Vestergaard, B., Groenning, M., Roessle, M., Kastrup, J. S., Van De Weert, M., Flink, J. M & Svergun, D. I. A helical structural nucleus is the primary elongating unit of insulin amyloid fibrils. 2007. PLoS Biol, 5(5), e134.