

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos ir Geomokslų fakultetas



Biochemijos studijų programos IV kurso studentė

Miglė ČIURINSKAITĖ

Bakalaurinis darbas

Rekombinantinio *tau* baltymo gryninimas ir agregacijos tyrimas

Darbo vadovas: Vytautas Smirnovas

Konsultantas: Tomas Šneideris

Vilnius 2017

Rekombinantinio *tau* baltymo gryninimas ir agregacijos tyrimas

Darbas atliktas VU Biotechnologijos instituto, Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Miglė Čiurinskaitė

/parašas/

Darbo vadovas:

Vytautas Smirnovas

/parašas/

Konsultantas:

Tomas Šneideris

/parašas/

Santrumpų sąrašas:

AA - Akrilamidas

Amr. - aminorūgštys

BAA - Bis-akrilamidas

DTT - Ditioteritolis

EDTA - Etilenodiaminotetraacetatinė rūgštis FR

HEPES - 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-yl]etanosulfoninė rūgštis

MAP - su mikrovamzdeliais asocijuotas baltymas

MES - 2-N-morfolinoetanosulfoninė rūgštis

mRNR - Matricinė ribonukleino rūgštis

NDS - Natrio dodesilsulfatas

NDS-PAAG - Natrio dodesilsulfato poliakrilamidinis gelis

PMSF - Fenilmetansulfonil fluoridas

Sėkla - jau susiformavęs baltymo agregacijos centras

TEMED - Tetrametiletilendiaminas

ThT - Tioflavinas T

TRIS - 2-Amino-2-hidroksimetil-propano-1,3-diolis

Turinys

Santrumpų sąrašas:	3
Įvadas	6
1. Literatūros apžvalga.....	7
1.1. Amiloidiniai baltymai	7
1.2. <i>Tau</i> baltymas.....	8
1.3. MAPT geno mutacijos	11
1.4. Mikrovamzdeliai ir tau baltymo funkcija	11
1.5. Tau baltymo modifikacijos	13
1.5.1. Fosforilinimas	14
1.5.2. Izomerizacija.....	15
1.5.3. Nefermentinis glikozilinimas.....	15
1.5.4. Nitrinimas	15
1.5.5. Acetilinas	15
1.5.6. Oksidacija	16
1.5.7. Sumoilinimas	16
1.5.8. Proteolitinis skilimas.....	16
1.6. <i>Tau</i> agregacija.....	16
1.7. Tioflavinas T.....	17
2. Medžiagos ir metodai.....	18
2.1. Medžiagos:.....	18
2.2. Laboratorinė įranga.....	18
2.3. Tirpalai ir buferiai	19
2.3.1. Gryninimo buferiniai tirpalai	19
2.3.2. Mitybinės terpės.....	19
2.3.3. Tirpalai.....	20
2.4. Metodai	20
2.4.1. Kompetentinių ląstelių transformacija.....	20
2.4.2. Rekombinantinio baltymo ekspresija.....	21
2.4.3. Baltymų elektroforezės mėginių ruošimas.....	21
2.4.4. NDS-PAAG elektroforezė	22
2.4.5. Biomasės paruošimas chromatografijai	22
2.4.6. Priemaišinių baltymų termoišsodinimas.	23
2.4.7. Gryninimas- katijonų mainų chromatografija.....	23
2.4.8. Išsodinimas amonio sulfatu	23
2.4.9. Gelfiltracija	23

2.4.10. Koncentravimas ir koncentracijos matavimas	24
2.4.11. Sorbentų regeneravimas.....	24
2.4.12. Tau baltymo agregacijos tyrimai fluorescencinės spektroskopijos būdu.....	24
2.4.13. Duomenų apdorojimas	25
2.4.14. Atominės jėgos mikroskopija	26
3. Rezultatai	27
3.1. Transformacijos optimizavimas.....	27
3.2. Biomasės auginimo optimizavimas.	28
3.3. Priemaišinių baltymų išsodinimas	29
3.4. Jonų mainų chromatografijos optimizavimas	30
3.5. Gelfiltracijos optimizavimas.....	31
3.6. Agregacijos tyrimai.....	33
3.6.1. Agregacijos laiko priklausomybė nuo temperatūros.....	34
3.6.2. Agregacijos laiko priklausomybė nuo heparino koncentracijos	34
3.6.3 Agregacijos laiko priklausomybė nuo baltymo koncentracijos.	34
3.6.4. Agregacijos laiko priklausomybė nuo joninės jėgos.....	35
3.6.5. Agregacijos laiko priklausomybė nuo skirtingų sėklos koncentracijų.....	35
3.6.6. Skirtingų izoformų agregacija.....	36
3.6.7. Sąveika tarp 1N4R IR 2N4R izoformų.....	37
Išvados:	38
Literatūros šaltiniai:	39

Įvadas

Alzheimerio liga – neurodegeneracinė liga, kuria dažniausiai serga senyvo amžiaus žmonės. Ligos atvejų paskutiniaus dešimtmečiais stipriai padidėjo, tad jos tyrimai tapo itin aktualūs. Alzheimerio liga negrįžtamai pažeidžia nervų sistemą. Ji pasižymi progresuojančia neuronų degradacija, kognityviniais sutrikimais ir elgesio pasikeitimais. Alzheimerio liga siejama su dviejų tipų baltyminėmis sankauptomis smegenyse:

- senatvinių plokštelių - amiloido β agregatų, kurie yra tarpląstelinėje erdvėje
- neurofibrilinių klosčių - hiperfosforilinto *tau* baltymo amiloidinių agregatų, kurios yra neuronų viduje.

Neurofibrilinės klostės susidaro savaiminės baltymo agregacijos metu. Proceso metu susiformuoja stabilios, β klostėmis turtingos struktūros. *Tau* baltymas turi 6 izoformas, kurios skiriasi pasikartojančiomis sekomis, atsirandančiomis dėl alternatyvaus splaisingo. Didžioji dalis *tau* koduojančio MAPT geno mutacijų keičia alternatyvų splaisingą, dėl ko kinta *tau* izoformų santykis, todėl svarbu palyginti kaip agreguoja skirtingos *tau* izoformos.

Bakalaurinio darbo tikslas: palyginti skirtingų *tau* baltymo izoformų agregaciją.

Tikslui pasiekti iškelti šie uždaviniai:

1. Optimizuoti *tau* baltymo gryninimo procesą ir išsigryninti kelias *tau* baltymo izoformas.
2. Parinkti tinkamas sąlygas kiekvienos *tau* izoformos agregacijai.
3. Patikrinti ar vienos iš izoformų agregaciją skatina kitos izoformos amiloidinės fibrilės .

1. Literatūros apžvalga

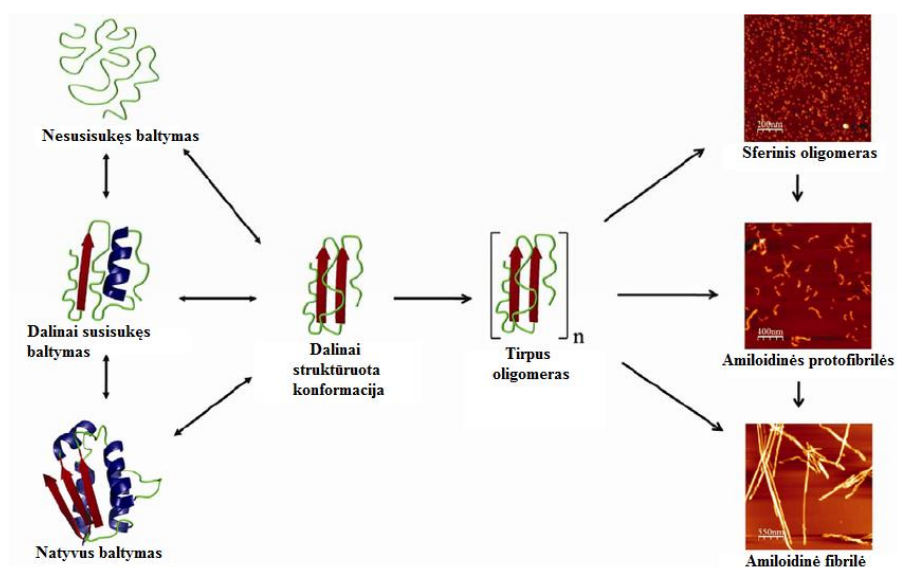
1.1. Amiloidiniai baltymai

Amiloidozė – baltymų klaidingo susisukimo sutrikimas, kai tirpūs baltymai savaime agreguoja į netirpias baltymų fibriles. Tokios sankaupos pažeidžia audinius, sutrikdo jų funkcijas (Serpell et al., 2000). Maždaug 20 amiloidinės kilmės baltymų sukelia įvairias neurodegeneracines ligas (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Neurodegeneracinės ligos (Knowles et al., 2014).

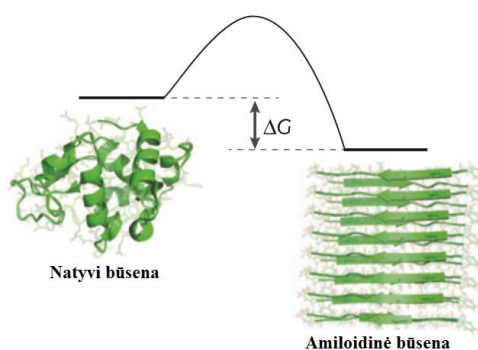
Liga	Agreguojantis baltymas ar peptidas
Alzheimerio liga	Amiloidas β ir <i>tau</i> baltymas
Parkinsono liga	Sinukleinas α
Amiotrofinė lateralinė sklerozė	Superoksido dismutazė
Kempinligė	Prioniniai baltymai ir jų fragmentai
Hantingtono liga	Hantingtono fragmentai
2 tipo diabetas	Amilinas

Amiloidinės fibrilės – savaime iš tirpių amiloidinių baltymų susiformuojančios linijinės polipeptidinės struktūros. Jos pasižymi β klosčių gausa, o natyvūs baltymai dažniau sudaro α -spirales (Knowles et al., 2014). Fibrilės pailgos struktūros, kurių diametras apie 10 nanometrų (1.1 pav.). Suagregavusio baltymo β struktūra yra energetiškai palanki, tad fibrilės yra netirpios ir atsparios degradacijai. (Ha, 2014)



1.1 pav. Amiloidinių fibrilių formavimasis (Dovidchenko et al., 2014)

Konformaciniai baltymo pokyčiai reikalauja daug energijos (1.2 pav.), kadangi tam prieš tai turi būti suardyta natyvi baltymo struktūra (Ha, 2014), todėl dažnai amiloidines fibriles sudaro bestruktūriai baltymai, kurie nesudaro vienos stabilios struktūros, yra tirpūs. Bestruktūriai baltymai turi daug polinių ir įkrautų aminorūgščių, todėl stabiliai struktūrai sudaryti reikalinga itin daug energijos, tad ji nesudaroma. Tokie baltymai gali sąveikauti su keliais biologiniais elementais, todėl yra svarbūs signaliniams ir reguliaciniams keliams. (Tomba, 2003)

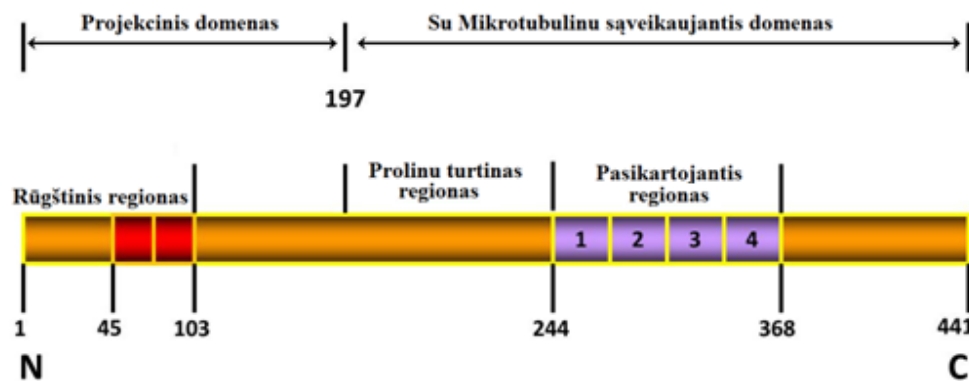


1.2 pav. Baltymo termodinaminiai pokyčiai. (Knowles et al., 2014)

Subrendusios fibrilės sudarytos iš keletos (2-6) protofibrilių, susisukusių aplink viena kitą. Protofibrilės sudarytos iš kryžminių β struktūrų, kurios yra β struktūros sąveikaujančios viena su kita vandenilinių ryšių. Amiloidinėse fibrilėse β struktūros išsidėsčiusios statmenai fibrilės ašiai. (Von Bergen et al., 2005)

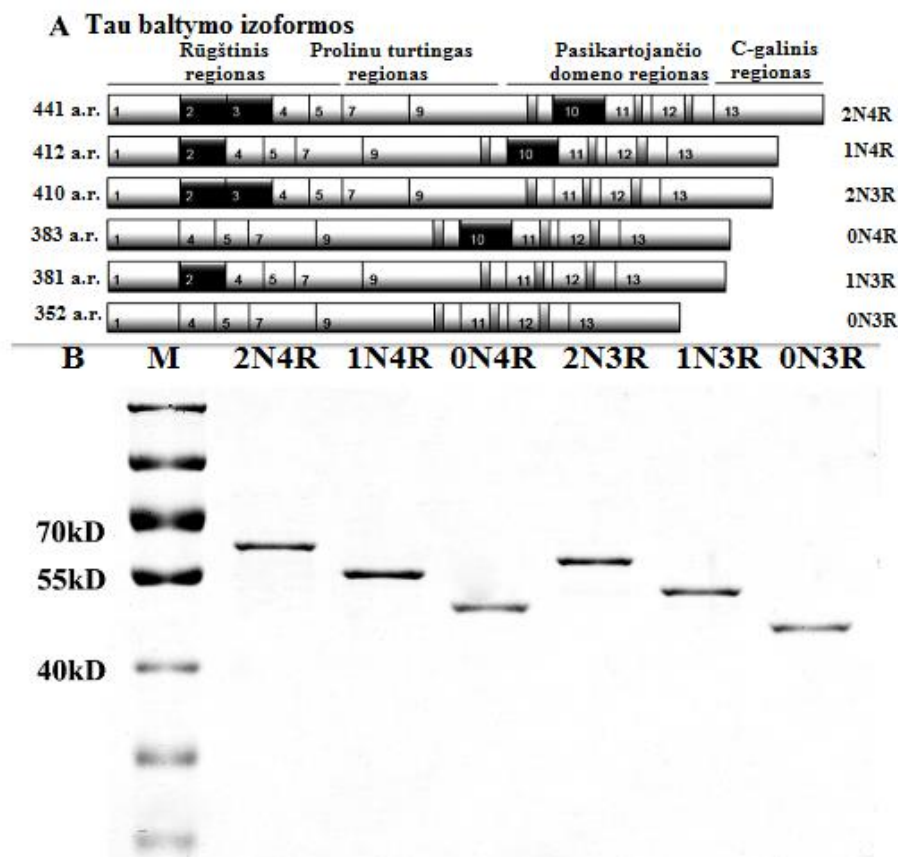
1.2. *Tau* baltymas

Tau baltymas yra hidrofilinis ir tirpus vandenyje. Jis stabilus rūgštinėje aplinkoje ir aukštoje temperatūroje. *Tau* baltymas bazinis, tačiau N gale (pirmos 120 amr.) dominuoja rūgštinės aminorūgštys, o sekančios 40 yra neutralios aminorūgštys. Tokia asimetrija svarbi sąveikai su mikrovamzdeliais bei kitomis struktūromis, susisukimui ir agregacijai. *Tau* baltymas skirstomas į projekcinį domeną ir su mikrovamzdeliais sąveikaujantį domeną (1.3 pav.). Projekcinis domenas turi daug rūgštinių amino rūgščių, todėl sąveikauja su kitais citoskeleto baltymais bei katijoninėmis medžiagomis. (Wang, Mandelkow, 2015)



1.3 pav. Tau baltymo domenai. (Luna-muñoz et al., 2013)

Žmogaus *tau* baltymas yra koduojamas vienakopijinio MAPT geno, turinčio 16 egzonų ir išsidėsčiusio 17 chromosomos ilgajame petyje, padėtyje 17q21. Dėl MAPT geno 2, 3 ir 10 egzonų alternatyvaus mRNR splaisingo galimos 6 *tau* baltymo izoformos (Buée et al., 2000; Sposito et al., 2015). Jų ilgis svyruoja nuo 352 iki 441 aminorūgščių. 10 egzono alternatyvus splaisingas nulemia 3 (3R) arba 4 (4R) pasikartojimus su mikrovamzdeliais sąveikaujančio domeno pasikartojančiame regione. Šie pasikartojimai panašūs, bet nėra identiški, yra 31-32 aminorūgščių ilgio. Pasikartojimai padalinti į 2 dalis: viena 18 aminorūgščių, geba prisijungti tubuliną. Kita mažiau konservatyvi, iš 13-14 aminorūgščių – vadinama vidiniu pasikartojimu. Projekcinio domeno rūgštiniame regione galimas 29 arba 54 aminorūgščių intarpas, arba intarpo gali ir nebūti, pagal tai izoformos 0N, 1N arba 2N (Falcon et al., 2015; Wang, Mandelkow, 2015). Taigi, viso yra 6 *tau* baltymo izoformos: 0N3R; 0N4R; 1N3R; 1N4R; 2N3R; 2N4R (1.4 pav.). *Tau* splaisingas reguliuojamas priklausomai nuo vystymosi stadijos ir audinio tipo. Augančio vaiko smegenyse dominuoja 3R izoformos, tačiau suaugusiojo smegenyse 3R ir 4R santykis yra maždaug lygus. (Ghetti et al., 2015).



1.4 pav. *Tau* baltymo izoformų skirtumai schematiškai ir NDS gelyje. (Ghetti et al., 2015)

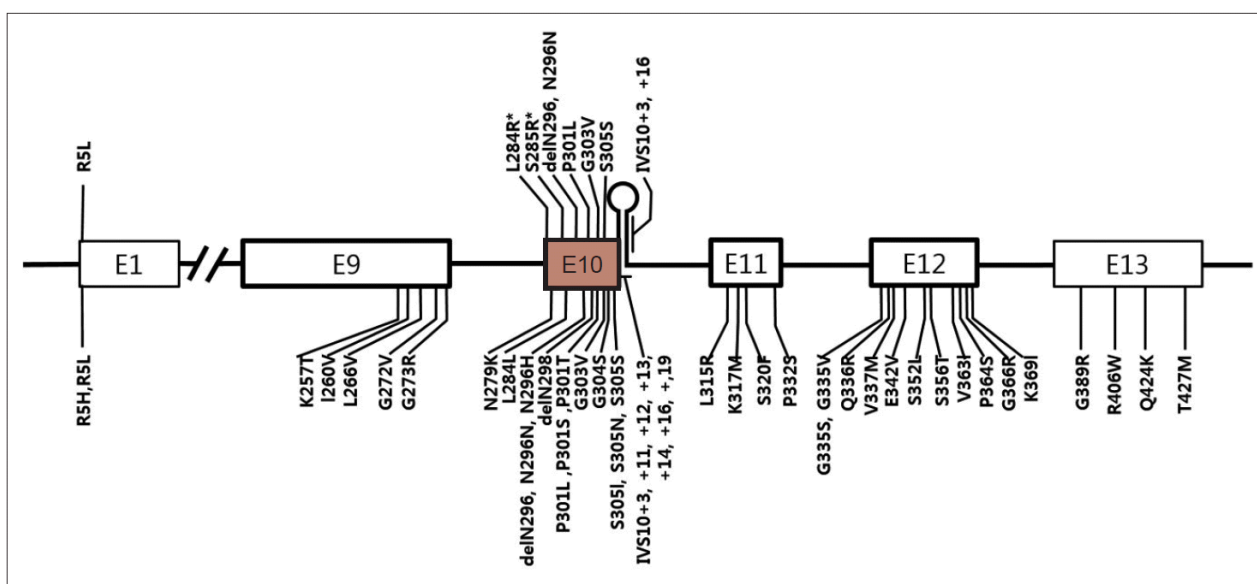
Tau agregacijai svarbūs su heparinu sąveikaujantys KKXK arba PPXXP motyvai, o sąveikai su plazmine membrana svarbūs PXXP motyvai, kurie randami prolinu turtingame regione ir sąveikauja su baltymais, turinčiais SH3 domenų.

Pasikartojimai pasikartojančiame regione prisijungia prie mikrovamzdelių ir skatina jų persitvarkymą. *Tau* gali prisijungti prie mikrovamzdelių dviem būdais: jungtis prie išorinio mikrovamzdelio paviršiaus, jei jungimasis vyksta prieš mikrovamzdelių persitvarkymą arba prie vidinio vamzdelio paviršiaus, kai *tau* būna sumaišomas su tubulinu ir tada pertvarkomas. Nors 3R ir 4R izoformos naudoja tą patį jungimosi prie mikrovamzdelių mechanizmą, tau 4R izoformos pasižymi didesniu giminingumu mikrovamzdeliams ir gali pakeisti jau prisijungusius prie mikrovamzdelių 3R. Tačiau, 4R pasikartojimai turi daugiau heksapeptidinių motyvų, kurie linkę sudaryti β struktūras, kurios formuoja centrinę agregacijos ašį. (Avila et al., 2004), todėl pakitęs 3R : 4R izoformų santykis smegenyse (4R>3R) siejamas su padidėjusia Alzheimerio ligos rizika. Su tubulinu sąveikaujanti *tau* baltymo sritis yra homologiška kitiems baltymams, pavyzdžiui MAP (MAP2 ar MAP3/MAP4), kurių funkcija panaši – sąveikauti su

mikrovamzdeliais. Keletas motyvų yra randami ir kitokios funkcijos baltymuose, pvz.: PGGGSVQIY 301 – 310 yra randamas tiek *tau*, tiek nukleozidų fosfotazėje. Į *tau* panašūs baltymai yra randami žemesniuose eukariotuose, pavyzdžiui *C. elegans* ar drozofilose. (Wang, Mandelkow, 2015)

1.3. MAPT geno mutacijos

MAPT gene, koduojančiame *tau* baltymą, randama daugiau nei 80 mutacijų (1.5 pav.). Pakitimai galimi tiek egzonuose, tiek intronuose. Mutacijos skirstomos į pakeičiančias *tau* baltymo seką ir keičiančias *tau* baltymo izoformų santykį – alternatyvų splaisingą. Dauguma mutacijų vyksta šalia su mikrovamzdeliais sąveikaujančio domeno. Tokios mutacijos mažina *tau* giminingumą mikrovamzdeliams ir skatina agregaciją. Mutacijų pavyzdžiai: G272V, N279K, ΔK280, P301L, V337M ir R406W. Įdomu, jog mutacija A152T skatina oligomerų, bet ne fibrilių formavimąsi. Dauguma *tau* splaisingo mutacijų yra šalia 10 egzono, kurio splaisingas apsprendžia pasikartojimų skaičių su mikrovamzdeliais sąveikaujančiame domene (3R ar 4R). Dauguma splaisingo mutacijų didina 4R : 3R izoformų santykį, tačiau yra kelios mutacijos (ΔK280, L266V ir G272V) mažinančios 4R:3R santykį. (Wang, Mandelkow, 2015)

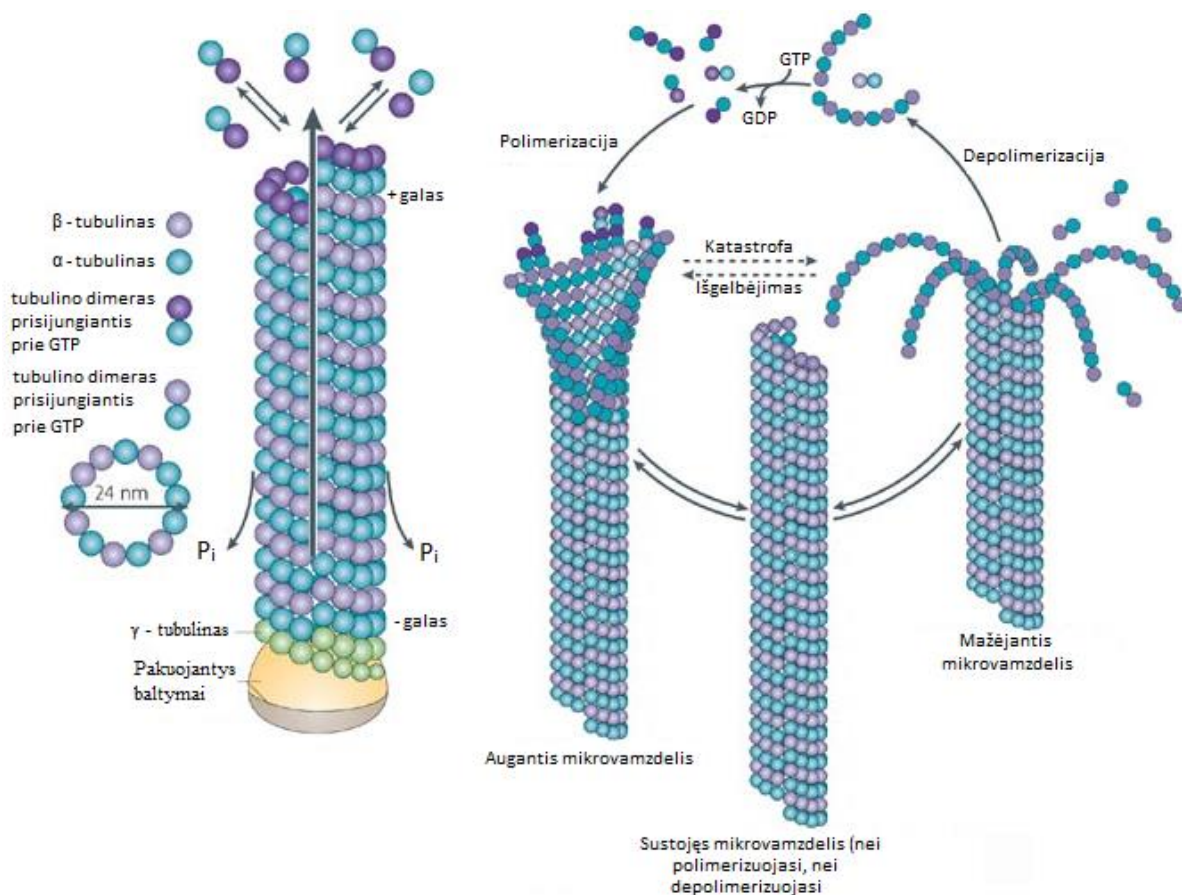


1.5 pav. MAPT geno mutacijos (Im et al., 2015)

1.4. Mikrovamzdeliai ir tau baltymo funkcija

Ląstelės citoskeletas sudarytas iš 3 komponentų: mikrovamzdelių, mikrofilamentų ir tarpinių filamentų. Mikrovamzdeliai reguliuoja ląstelės augimo, dalijimosi, judrumo, viduląstelinio transporto procesus, pasižymi plačiu spektru medžiagų, su kuriomis gali sąveikauti, bei yra itin svarbūs aksonams, išlaiko jų stabilumą. Mikrovamzdeliai sudaryti iš

tubulino heterodimerų, kurie polimerizuojasi į protofilamentus ir vėliau asocijuoja į mikrovamzdelius. Jų polimerizacija pasireiškia nukleacijos-elongacijos mechanizmu: grįžtamu, nekovalentiniu α - ir β - tubulino dimerų prijungimu abiejose mikrovamzdelių galuose (1.6. pav). Mikrovamzdelių galai nėra lygūs, + galas auga ir trumpėja greičiau nei - galas. (Lutz, 2015)



1.6. pav. Mikrovamzdeliai (Rochlin et al., 1999)

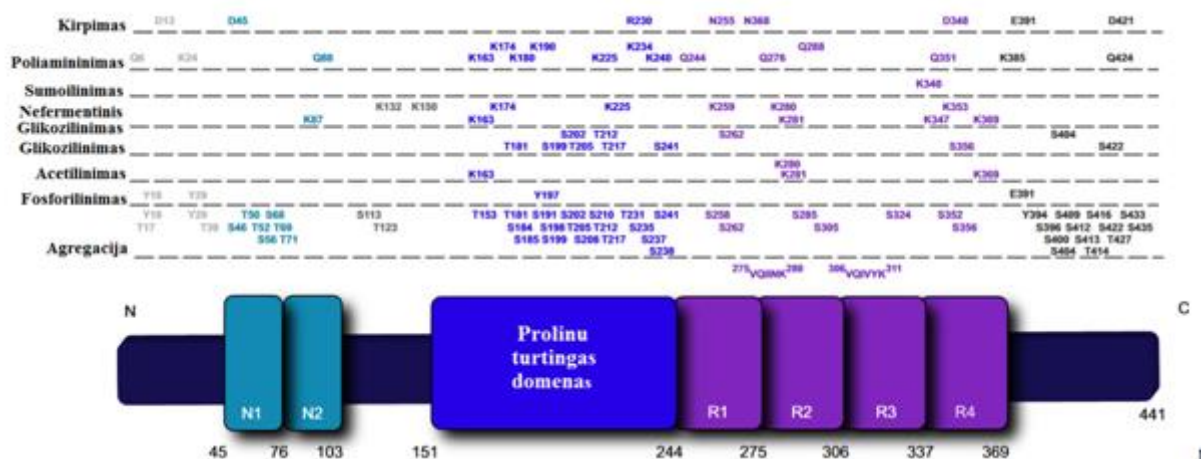
Mikrovamzdeliai yra dinamiškos struktūros, tad juos stabilizuoja prie mikrovamzdelių prisijungiantys baltymai MAP (MAP1A, MAP1B, MAP2) ir *tau* baltymas. Jie palaiko mikrovamzdelių struktūrą, dinamiškumą ir organizaciją. Klasikiniai MAP prisijungia prie mikrovamzdelių ir juos stabilizuoja, o +TIP (plus-end tracking proteins) baltymai specifiskai sąveikauja su augančiais (+) mikrovamzdelių galais, reguliuoja mikrovamzdelių judėjimą neuronuose. *Tau* baltymas skatina aksono mikrovamzdelių formavimąsi, juos stabilizuoja ir padeda neuronams augti (Crowe et al., 2007). *Tau* jungiasi su mikrovamzdeliais per pasikartojantį domeną. Kai *tau* disocijuoja nuo mikrovamzdelių, jis savaime agreguoja per heksapeptidinį motyvą pasikartojančiame domene. Tos pačios *tau* baltymo sekos yra atsakingos už prisijungimą prie mikrovamzdelių ir už agregaciją. *Tau* projekcinis domenas su prolinu turtingu regionu išlieka pakankamai lankstus kai *tau* jungiasi prie mikrovamzdelių ar

agreguoja. *Tau* jungiasi α ir β tubulino heterodimerų sąveikos vietose vidiniame paviršiuje, prie nedidelių aminorūgščių grupių padėtyse 224–237, 245–253, 275–284 ir 300–317, kadangi šios aminorūgštys mikrovamzdeliuose išlieka lanksčios. 269–284 ir 300–310 aminorūgštys turi heksapeptidinius motyvus VQIINK ir VQIVYK, kurie svarbūs *tau* agregacijai, ir prisijungę, prie mikrovamzdelių sudaro plaukų segtuko struktūrą, taip trukdydami *tau* agregacijai. (Kadavath et al., 2015; Wang, Mandelkow, 2015) *Tau* reguliuoja ir aksoninį transportą, vykdomą baltymų dineino ir kinezino. *Tau* konkuruoja su šiais motoriniais baltymais dėl prisijungimo prie mikrovamzdelių vietos, taip mažina motorinių baltymų prisijungimo dažnį, tad ir jų judrumą bei medžiagų pernešimo greitį. *Tau* sumažina krovinių nešančių baltymų skaičių: krovinsys *tau* konkuruoja su kitais kroviniais dėl laisvo kinezino, reguliuoja krovinių pūslelių sąveiką su kinezino grandine, aktyvuodamas PP1 ir glikogeno sintazės kinazę, prisijungia prie dinaktino, o tai palengvina dinaktino sąveiką su mikrovamzdeliais, kas stabilizuoja dineino ir mikrovamzdelių sąveiką. (Kadavath et al., 2015) Nors *tau* ir siejamas su aksoninio transporto reguliavimu, visgi tyrimai su pelėmis parodė, jog *tau* delecija ar padidinta raiška aksoniniam transportui turėjo nedaug įtakos (Wang, Mandelkow, 2015).

Tau fiziologinėmis sąlygomis randamas neuronų aksonuose, tačiau nedideliais kiekiais aptinkamas ir glijoje ar tarpląstelinėje erdvėje (Wang, Mandelkow, 2015). *Tau* vietos parinkimas neurone priklauso nuo neurono brandos, *tau* fosforilinimo bei mikrovamzdelių citoskeleto. Manoma, jog *tau* susijęs su dendrito struktūros palaikymu bei dalyvauja sinapsės sudaryme. Branduolyje *tau* siejamas su genominės DNR, citoplazminės RNR bei branduolinės RNR struktūros palaikymu.

1.5. *Tau* baltymo modifikacijos

Neurofibrilinių tinklų formavimasis apima *tau* baltymo fosforilinimą, konformacinius pokyčius ir baltymo skilimą. *Tau* baltymas pasižymi potransliacinių modifikacijų gausa (1.7. pav.). Tai: serino, treonino ir tirozino fosforilinamas, izomerizacija, nitrinimas, O-GlcNAcetilinas, nefermentinis glikozilinimas, acetilinimas, oksidacija, poliamininimas, sumoilinimas ir proteolitinis skėlimas. (Mietelska-Porowska et al., 2014) Potransliacinės modifikacijos yra pagrindinė priežastis, kodėl *tau* tampa nefunkcionalus ir agreguoja. Plačiau apžvelgsiu kiekvieną iš šių modifikacijų, iš kurių svarbiausia laikomas fosforilinimas.



1.7. pav Tau baltymo potransliacinės modifikacijos. (Fontaine et al., 2015)

1.5.1. Fosforilimas

Tau vidutiniškai turi 85 galimo fosforilimo vietas iš kurių 45 serino (53%), 35 treonino (41%) ir tik 5 tirozino (6%). Fosforilimo vietas yra prolinu turtinguose regionuose (172-251 amr.) ir C galo regione (368-441 amr.). Sveikose, Alzheimeriu nesergančio žmogaus smegenyse Tau fosforilimas S199, S202, T231, S262 ir S404 pozicijose, tačiau hiperfosforilintas tau siejamas su neuronų nesugebėjimu atsakyti ir teisingai perduoti stimulą (Mondragón-Rodríguez et al., 2014). Hiperfosforilinus sumažėja tau afiniškumas mikrovamzdeliams, ko pasekoje tau atsijungia, mikrovamzdeliai destabilizuojami ir stimuliuojamas tau fosfatazių aktyvumas: dar daugiau baltymo atsijungia nuo mikrovamzdelių.

Fosforilina tau kinazės, kurios skirstomos į:

- 1) Su prolinu sąveikaujančias baltymų kinazes (PDPK), specifines serinui ir treoninui.
- 2) Ne su prolinu sąveikaujančios baltymų kinazes (non-PDPK)
- 3) Tirozino baltymų kinazes (TPK)

Kinazių aktyvumas daugiausiai reguliuojamas fosforilinant, pavyzdžiui: glikogeno sintazės kinazė-3 (GSK-3) inaktyvuojama fosforilinant S21 (GSK - 3 α), S9 ar S389 (GSK - 3 β), o aktyvuojama fosforilinant : Y279 (GSK-3 α) ar Y216 (GSK-3 β). Nuo ciklino priklausomos penktos kinazės (cdk5) aktyvumas reguliuojamas ne tik fosforilinant, bet ir prijungiant aktyvuojantį subvienetą (p25 arba p35), kuris sukeliant nuo kalpains priklausomą proteolitinį aktyvumą. Šios kinazės Alzheimeriu sergančių pacientų smegenyse randamos tose pačiose zonose, kaip ir amilodiniai agregatai. (Mietelska-Porowska et al., 2014)

1.5.2. Izomerizacija

Prolinas gali sukurti sąlygas polipeptidinės grandinės cis/trans konformacijos pasikeitimui, nes ši konformacija gali pasikeisti aplink peptidil-prolino ryšį, kai procesą katalizuoja peptidil-prolino cis-trans izomerazė. pSer/Thr-Pro motyvų izomerizacija labai svarbi ląstelės ciklo reguliavimui, kadangi šie motyvai yra vienintelė vieta, kurioje gali fosforilinti Cdk kinazė. Pin-1 tipo peptidil-prolino izomerazė vienintelė yra savitai specifinė pSer/Thr – Pro motyvams.

1.5.3. Nefermentinis glikozilinimas

Tau nefermentinis glikozilinimas skatina agregaciją. Modifikacija vyksta anksčiau nei kitos modifikacijos ir skatina fosforilinimą. Kai tau baltymas yra glikozilintas, papildomai yra fosforilinamos S324, S404 ir S400 padėtys. (Liu et al., 2016)

1.5.4. Nitrinimas

Tau nitrinimas tirozinas. Prasmė nėra iki galo išaiškinta. Manoma, jog tau nitrinimas yra atsitiktinis reiškinys, kilęs dėl neurodegeneratyvinio proceso metu atsiradusių laisvų radikalų. Alzheimerio ligos metu reaktyvios azoto ir deguonies formos yra verčiamos į peroksinitritą (ONOO), kuris gali nitrinti tiroziną. Svarstoma, kad galbūt tau nitrinimas yra funkciškai svarbus procesas, panašiai kaip viščiuko embrione esantys aktinas ir tubulinas yra diferencijuotai nitrinami, siekiant išlaikyti baltymo funkcijas. Tau savo sekoje turi 5 tirozinus, kurie ilgiausioje 2N4R izoformoje yra išsidėstę 18, 29, 197, 310 ir 394 pozicijose (2N4R yra sudaryta iš 441 amino rūgščių). *In vitro*, tau nitrinamas selektyviai: labiausiai nitrinamos amino rūgštys esančios arčiau N galo (Y18, Y29), procesas žymiai rečiau pastebimas Y197 ir Y394 pozicijose. Nitrinimas Y310 pozicijoje yra itin retai pastebimas, nes 310 tirozinas yra hidrofobiniame su mikrovamzdeliais sąveikaujančio regiono pasikartojančiame domene. (Horiguchi et al., 2003; Reyes et al., 2011).

1.5.5. Acetilinimas

Tau acetilinimas specifinėse lizino padėtyse stiprina tau sąveiką su mikrovamzdeliais ir slopina tau agregaciją (Min et al., 2010). Svarbiausias taikiny – 280 lizinas, kadangi jis yra su mikrovamzdeliais sąveikaujančiame domene. Tai vieta, į kurią yra nukreipta daug Alzheimerio gydymui orientuotų tyrimų. (Lee, 2011).

1.5.6. Oksidacija

Tai procesas, kurio metu oksiduojami cisteinai, susidaro sulfidinis ryšys ir slopinamas amiloidinių fibrilių susidarymas. Modifikuojant 4R izoformas susidaro vidumolekulinis ryšys. 3R izoformos turi tik 1 cisteiną, tad oksiduojant susidaro tarpmolekuliniai ryšiai. (Crowe et al., 2013)

1.5.7. Sumoilinimas

Sumo – tai mažas į ubikvitiną panašus modifikatorius, kuris prisijungęs prie baltymo reguliuoja jo vietą ląstelėje, aktyvumą bei stabilumą. Prisijungus sumo prie baltymo, jie kartu keliauja į proteosomas, kur yra degraduojami. Sumo jungiasi prie hiperfosforilinto tau, atsijungusio nuo mikrovamzdelių ir jį sunaikina, stabdydamas amiloidinių fibrilių formavimąsi. (Dorval, Fraser, 2006)

1.5.8. Proteolitinis skilimas

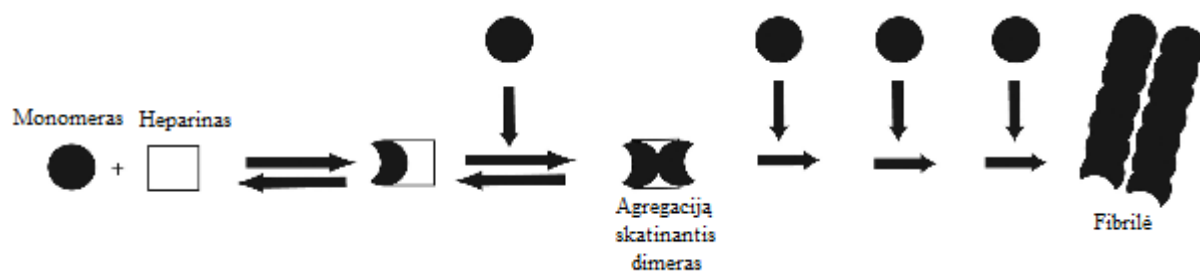
Proteolitiškai nuskeliama 20 tau baltymo peptidinės grandinės aminorūgščių nuo C galo, ties 421 aspartatu. Toks nukirptas baltymas agreguoja geriau nei viso ilgio tau, tad ši modifikacija siejama su agregacijos skatinimu. Žmonių sirgusių Alzheimeriu smegenyse randama daug D421 nukirpto baltymo. (Gamblin et al., 2003)

1.6. Tau agregacija

Smegenyse agreguoja hiperfosforilintas *tau*. Dėl fosforilinimo *tau* giminingumas mikrovamzdeliams sumažėja, *tau* disocijuoja nuo mikrovamzdelių ir gali agreguoti. *Tau* amiloidinių fibrilių formavimasis yra labai lėtas procesas, jei mišinyje nėra polianijonų. Polianijonai mažina aktyvacijos energiją: neutralizuoja teigiamą baltymo krūvį, prisirišdami baltymą atidengia hidrofobines sekas bei stabilizuodami vandenilinius ryšius tarp vandens molekulių skatina hidrofobinę sąveiką.

Pagrindinis ir dažniausiai naudojamas kofaktorius yra heparinas. Smegenyse heparino nerandama, tačiau plazminėje membranoje yra randamas heparino sulfatas, kuris taip pat randamas ir amiloidinių baltymų sankaupose. (Ramachandran, Udgaonkar, 2011)

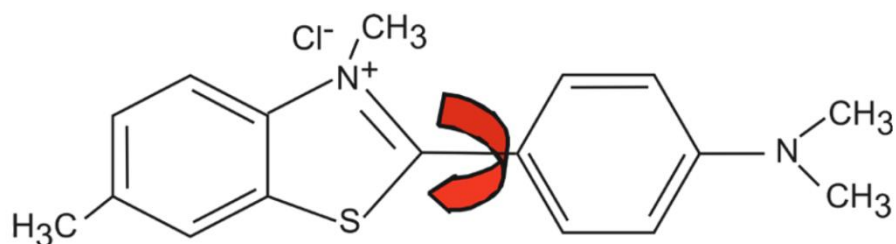
Tau agregacija vyksta pagal nuo nukleacijos priklausomą mechanizmą, pirmiausiai formuojasi agregaciją skatinantys dimerai, o po jos seka fibrilių ilgėjimo etapas (1.8. pav). (Xu et al., 2010)



1.8 pav Heparino įtaka tau agregacijai, pagal (Ramachandran, Udgaonkar, 2011)

1.7. Tioflavinas T

Fluorescencinė spektroskopija yra labiausiai paplitusi technika amiloidinių fibrilių detekcijai. Norint aptikti fibriles audiniuose, šie yra dažomi su Tioflavinu S arba Kongo raudonoju, o tyrimuose *in vitro* naudojamas Tioflavinas T. ThT jungiasi išilgai fibrilių esančiame griovyje, kuris susidaro dėl pasikartojančių sekų β klosčių struktūros. Benzilamino ir benzotiazolo žiedai, esantys ThT molekulėje, gali laisvai suktis apie centrinę C-C ryšį (1.9. pav). Dėl šio sukimosi sužadinimas greitai nugesinamas, todėl ThT prastai fluorescuoja. Kai ThT prisijungia prie fibrilių, žiedai tampa fiksuotais, dėl to žymiai išauga fluorescencijos maksimumas. (Younan, Viles, 2015) Prieš prisijungiant amiloidines fibriles ThT sužadinamas ties 385 nm, o emisijos maksimumas 445 nm. Kai ThT prisijungia prie amiloidinių fibrilių sužadinimo ir emisijos maksimumai atitinkamai tampa 450 ir 482 nm. (Stsiapura et al., 2008) Dažas pasižymi specifiskumu amiloidinėms fibrilėms, tačiau kiti hidrofobiniai dariniai taip pat gali didinti ThT fluorescenciją, pavyzdžiui: hidrofobinės globulinių baltymų spiralinės. (Younan, Viles, 2015)



1.9. pav Tioflavinas T. (Held, 2014)

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos:

- TRIS, ROTH, >99 %
- MES, Fisher Scientific, >98 %
- HEPES, ROTH, >99 %
- CH₃COOH , Across Organic, >99,5 %
- Tioflavinas T, Sigma Aldrich
- Heparinas, Across organic
- EDTA, Fisher Scientific, >99 %
- Triptonas, Fisher Scientific
- Mielių ekstraktas, Oxoid
- NaH₂PO₄, Across Organic, >99 %
- Na₂HPO₄, Across Organic >99 %
- KH₂PO₄, ROTH, >99 %
- K₂HPO₄, >99 %
- NH₄Cl, Across Organic, 99,6 %
- Na₂SO₄, Across Organic, 99,6 %
- MgSO₄·7 H₂O, Fisher Scientific
- Glicerolis, Across Organic, >99 %
- Dekstrozę, Fisher Scientific, 99,8 %
- HCl, Across Organic, 37 %
- NaOH, Across Organic
- DTT, Fisher Scientific
- NDS, Fisher Scientific, >99 %
- Glicinas, Fisher Scientific, >98,5 %
- (NH₄)₂SO₄, Across Organic, 99,5 %
- PMSF, ROTH, >99 %
- TEMED, Fisher Scientific
- APS, Across Organic, 99,5 %

2.2. Laboratorinė įranga

- „PCB“ analitinės svarstyklės d=0,01, KERN

- „IB-15G“ termostatas, Fisher Scientific
- „Rotor-Gene Q real-time PGR“ cikleris, QIAGEN
- „AS 4500“ rotorius, Herolab
- „UV-1800“ spektrofotometras, Shimadzu Scientific
- „Techno Maxi“ centrifūga, Fisher Scientific,
- Kolonėlė „XK-26“, GE Healthcare
- Kolonėlė „Triton 10/600“, GE Healthcare
- „AKTA“ chromatografinė sistema, GE Healthcare
- „Mini Dry Bath“ termostatinė vonelė, Fisher Scientific
- „ARE“ magnetinė maišyklė, VELP Scientific
- „AF 6500“ rotorius, Herolab
- „AF 8.50.2“ rotorius, Herolab
- „KS 4000i“ purtyklė, IKA
- „HiCen SR superspeed“ centrifuga, Herolab
- Homogenizavimo zondas „VS70T“, Bandelin
- Ultragarsinis homogenizatorius „Sonopuls HD 3100“, Bandelin
- Atominės jėgos mikroskopas „Dimension Icon“, Bruker.

2.3. Tirpalai ir buferiai

2.3.1. Gryninimo buferiniai tirpalai

- A: 50 mM Na₂HPO₄, 10 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,1 mM PMSF pH 6,4
- B: 1 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 10 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,1 mM PMSF pH 6,4.
- C: 20 mM Na₂HPO₄, 10 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,1 PMSF pH 7,4
- D: 50 mM MES pH 6

2.3.2. Mitybinės terpės

- ZYM-5052: 10 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 3,55 g Na₂HPO₄, 3,4 g KH₂PO₄, 2,675 g NH₄Cl, 0,7 g Na₂SO₄, 0,49 g MgSO₄ × 7 H₂O tirpinami 800 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje. 5 g glicerolio, 0,5 g dekstrozės (D-gliukozės), 2 g laktozės tirpinama 200 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje. Abu komponentiniai tirpalai sumaišomi prieš užsėjant terpes.

- LB (Luria Broth): 10 g NaCl, 10 g baltymų hidrolizato, 5 g mielių ekstrakto ištirpinama 1 L dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.
- Minimali mitybinė terpė: 5 g gliukozės, 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, 0,12 g MgSO₄, 0,01 g CaCl₂ tirpinama 1 L dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.
- S.O.C.: 2 g peptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės. Peptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami 97 ml dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje. Ataušinus iki kambario temperatūros, pridedama Mg druskų ir gliukozės ir steriliai nufiltruojama.

2.3.3. Tirpalai

- 50 mM MES pH 6,
- 50 mM CH₃COOH pH 5
- 50 mM HEPES pH 7,41
- 50 mM TRIS 50mM pH 8,84
- 10 mM ThT
- 2,7 g/ml Heparino
- 1 M NaOH
- 1 M HCl

2.4. Metodai

2.4.1. Kompetentinių ląstelių transformacija

- a) Naudojama reikiamą izoformą koduojantį geną turinti plazmidė pRK172, kurios 1 µL įpilamas į 30 µL kompetentinių ląstelių BL 21 Star (DE3) ir laikoma ledo vonioje 30 min.
- b) Vykdomas termo šokas: 90 s inkubuojama 42 °C temperatūroje.
- c) Ledo vonioje laikoma 2 min.
- d) Pašalinti ląstelės stresui į transformacijos mišinį pridedama 400 µL S.O.C. terpės. 37 °C temperatūroje. Pastoviai purtant (220 aps./min) inkubuojama 45 min.
- e) 100 µL transformacijos mišinio išsėjama ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu petri lėkštelėje.
- f) Auginama 16 h, esant 37 °C temperatūrai.

2.4.2. Rekombinantinio baltymo ekspresija

a) Ruošiama naktinė kultūra. Į 100 ml LB mitybinės terpės, kurioje yra 100 µM/mL ampicilino užsėjama viena kolonija nuo petri lėkštelės ir auginama 16 h esant 37 °C temperatūrai ir pastoviam purtymui (220 aps./min).

b) 20 ml naktinės kultūros persėjama į kolbą, kurioje yra 400 mL LB terpės su 100 µg/mL ampicilino. Auginama esant 37 °C temperatūrai ir pastoviam purtymui 220 aps./min, kol optinis tankis, esant 600 nm bangos ilgiui, pasiekia 0,6-1 optinius vienetus. Tuomet vykdoma indukcija IPTG.

c) Viso auginimo metu kas valandą yra imami mėginiai, kurie vėliau analizuojami NDS-PAAG metodu.

d) Baigus auginimą kultūrinis skystis centrifuguojamas 35 min 6000 aps./min. Supernatantas nupilamas, o biomasė surenkama ir užšaldoma -20 °C.

2.4.3. Baltymų elektroforezės mėginių ruošimas

a) Gautų po biomasės auginimo

Reikalingas kultūrinio skysčio mėginių tūris apskaičiuojamas pagal optinį tankį. Po vienos valandos paimame 1000 µL mėginį. Dar po valandos imant mėginį pamatuojamas optinis tankis ir mėginio tūris apskaičiuojamas pagal formulę (1):

$$V_2 = \frac{OD_2 \times V_1}{OD_1} \quad (1)$$

V_1 – paimto pirmo mėginio tūris.

V_2 – paimto antro mėginio tūris.

OD_1 – optinis tankis pirmo mėginio ėmimo metu.

OD_2 – optinis tankis antro mėginio ėmimo metu.

Mėginiai centrifuguojami esant 6000 aps./min 2 min. Supernatantas nusiurbiamas, o nuosėdos resuspenduojamos 40 µL 4x dažo. Kaitinama 10 min esant 98 °C temperatūrai.

b) Gautų po chromatografijos

Chromatografijos metu gauti mėginiai maišomi atitinkamu santykiu su 4x dažu (pvz.: 30 µL baltymo + 10 µL dažo). Kaitinama 10 min esant 98 °C temperatūrai.

2.4.4. NDS-PAAG elektroforezė

a) Gelis ruošiamas sumaišant 1 lentelėje nurodytus reagentus pagal surašytą eiliškumo tvarką. Pirmiausia sumaišomi reagentai reikalingi skiriamajam geliui. Mišinys supilamas tarp elektroforezės plokštelių ir užsluoksniuojamas H₂O. Skiriamojo gelio polimerizacija vyksta apie 40 min.

2.1 lentelė. Elektroforezės gelio reagentai.

Skiriamasis gelis	Koncentruojamasis gelis
dH ₂ O 2,55 mL	dH ₂ O 1,27 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 1,53 mL	1 M Tris-HCl pH 6,8 500 µL
40 % AA/BAA 1,83 mL	40 % AA/BAA 201 µL
10 % NDS 61 µL	10 % NDS 20 µL
APS 30,5 µL	APS 10 µL
TEMED 3,65 µL	TEMED 2 µL

b) Taip pat kaip ir skirstomasis sumaišomas koncentruojamasis gelis ir supilamas ant skirstomojo gelio tarp elektroforezės plokštelių. Supylus gelį įstatomos šukos, kad susiformuotų šulinėliai ir polimerizuojama 30 min.

c) Susipolimerizavus geliui plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą ir užpildoma elektroforezės buferiniu tirpalu. Ištraukiamos šukos, suleidžiami mėginiai ir paleidžiama srovė (I=30 mA).

2.4.5. Biomasės paruošimas chromatografijai

a) Iš šaldiklio ištraukta biomasė užpilama 50 ml buferinio tirpalo A ir atitirpinama. Biomasė perkeliama į homogenizatorių ir jame smulkinama. Homogenizuota biomasė praskiedžiama 50 mL buferinio tirpalo A ir įstatoma į ledo vonią.

b) Ardoma ultragarsu 17 min 60 s darbo ir 60 s poilsio intervalais, esant 70 % amplitudei, naudojamas VS70T homogenizavimo zondas.

c) Suardyta biomasė centrifuguojama 35 min esant 17000 aps./min, taip pašalinamos ląstelių nuolaužos.

2.4.6. Priemaišinių baltymų termoišsodinimas.

- a) Ląstelių lizatas kaitinamas 45 minutes 85 °C temperatūroje.
- b) Centrifuguojama 4 °C temperatūroje 35min 17000 aps./min greičiu.

2.4.7. Gryninimas- katijonų mainų chromatografija

a) 30 mL sorbento „CM Sepharose Fast Flow™“ pusiausvyrinamas stiklinėlėje buferiniu tirpalu A vis nupilant seną buferinį tirpalą ir užpilant naują, tol kol sorbento tirpalo pH bus 6,4.

b) Nupusiusvyrinus sorbentą ant jo užpilamas supernatantas gautas po terminio išsodinimo ir inkubuojama 30 min, lengvai maišant. Po inkubacijos sorbentas su prisirišusiais baltymais supilamas į XK-26 kolonėlę. Pakrauta kolonėlė prijungiama prie AKTA chromatografinės sistemos.

c) 3 ml/min greičiui leidžiant buferinį tirpalą A vykdomas 40 min 0-40 % buferinio tirpalo B gradientas.

2.4.8. Išsodinimas amonio sulfatu

a) Po katijonų mainų chromatografijos frakcijos turinčios tikslinį baltymą išsodinamos amonio sulfatu per naktį, naudojamas 30 % įsisotinimas.

b) Nuosėdos centrifuguojamos 20 min esant 17000 aps./min ir resuspenduojamos 1,6 mL buferinio tirpalo C.

2.4.9. Gelfiltracija

a) 60 mL sorbento „Superdex 200 Prep Grade“ praplaunama distiliuotu vandeniu ir supilama į Tricorn 10/600 kolonėlę prie kurios yra prijungtas papildomas 10/300 rezervuaras. Supylus sorbentą vieną valandą 1 mL/min greičiu distiliuotu vandeniu plaunamas ir tuo pačiu pakuojamas sorbentas.

Praėjus valandai 10 min leidžiama 3 mL/min greičiu, kad dar stipriau susipakuotų sorbentas. Sorbentui susispaudus nuimamas papildomas rezervuaras ir viršutinis adapteris perkliamas ant Tricorn 10/600 kolonėlės. Tada dar 10 min sorbentas pakuojamas esant 3 mL/min greičiu. Baigus susipakavimui greitai nuleidžiamas viršutinis adapteris iki pat sorbento. Kolona pusiausvyrinama buferiniu tirpalu C.

b) Naudojamas 1 mL/min greitis ir užnešama po 0,4 mL mėginio. Surenkamos frakcijos po 1 mL.

2.4.10. Koncentravimas ir koncentracijos matavimas

a) Po gelfiltracijos atliekamas koncentravimas. Baltyminis tirpalas supilamas į „Amicon® Ultra–15“ koncentratorių ir centrifuguojamas 20 min 5000 aps./min greičiu.

b) Koncentratas užpilamas 10 mM MES pH 6,4 buferiniu tirpalu ir vėl centrifuguojama. Taip pakeičiamas buferinis tirpalas.

2.4.11. Sorbentų regeneravimas

a) Jonų mainų sorbentai regeneruojami iškrovus juos iš kolonos. Pirmiausia sorbentas užpilamas 0,1 M NaOH tirpalu ir laikomas 1 val, po to gerai atplaunamas vandeniu. Ta pati veiksmų seka kartojama su ir 0,1 M HCl.

b) Gelfiltracinis sorbentas gerai atplaunamas H₂O, atjungiamas nuo chromatografo ir įstatomas į stovą.

2.4.12. Tau baltymo agregacijos tyrimai fluorescencinės spektroskopijos būdu

Fluorescencijos priklausomybei nuo laiko naudojamas realaus laiko PGR aparatas „Qiagen Rotor-Gene Q“. Naudojamas žaliasis aparato kanalas t. y. sužadinimas 470 nm, o emisija detektuojama 510 nm. Rotoriuje patalpinti mėginiai sukasi 400 aps./min greičiu ir emisija matuojama kas 1 min, palaikant pastovią temperatūrą.

Agregacijai įvertinti atlikti šie eksperimentai:

a) Agregacijos greičio priklausomybė nuo buferinio tirpalo.

Ieškomos sąlygos, kuriose tau geriausiai agreguoja. Naudojama 40 μM baltymo, 50 μM ThT 67,5 μg/mL heparino. Išbandyti buferiniai tirpalai: 50 mM CH₃COOH pH 5; 50 mM, MES pH 6; 50 mM, HEPES pH 7; 50 mM Tris pH 8; 50 mM Na₂HPO₄ pH 6,4. Vykdoma 50 °C temperatūroje.

b) Agregacijos greičio priklausomybė nuo heparino koncentracijos.

Mažos heparino koncentracijos *tau* agregaciją skatina, o didelės – slopina. Tyrimo metu ieškoma optimalios heparino koncentracijos. Naudojama 40 μM baltymo, 50 μM ThT, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir heparino koncentracijos: 33,75 μg/mL, 67,5 μg/mL, 135 μg/mL. Vykdoma 50 °C temperatūroje.

c) Agregacijos greičio priklausomybė nuo joninės jėgos.

Norima sužinoti, kokią įtaką agregacijai daro NaCl. Naudojama 40 µM baltymo, 50 µM ThT, 67,5 µg/mL heparino, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir NaCl koncentracijos: 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM. Vykdoma 50 °C temperatūroje.

d) Agregacijos greičio priklausomybė nuo baltymo koncentracijos.

Naudojama, 50 µM ThT, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir baltymo koncentracijos: 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM, kurioms atitinkamai 10 mg/mL baltymo -16,6 µg/mL heparino, 20 mg/mL -33,2 mg/mL. Vykdoma 50 °C temperatūroje.

e) Agregacijos greičio priklausomybė nuo temperatūros.

Siekama rasti labiausiai agregacijai tinkamą temperatūrą. Naudojama 40 µM baltymo, 50 µM ThT, 67,5 µg/mL heparino, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas. Vykdoma 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C temperatūrose.

f) Agregacijos greičio priklausomybė nuo „sėklos“ koncentracijos.

„Sėkla“ tai jau susiformavę agregatai – fibrilės, kuriomis užkrečiamas dar nesuagragavęs baltymas. . Tirta 4 etapais:

1) Naudojama 40 µM 1N4R, 50 µM ThT, 67,5 µg/mL heparino, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir 2,5 %, 5 % ir 10 % 1N4R „sėklos“. Vykdoma 50 °C temperatūroje.

2) Naudojama 40 µM 2N4R, 50 µM ThT, 67,5 µg/mL heparino, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir 2,5 %, 5 % ir 10 % 2N4R „sėklos“. Vykdoma 50 °C temperatūroje.

3) Naudojama 40 µM 1N4R, 50 µM ThT, 67,5 µg/mL heparino, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir 2,5 %, 5 % ir 10 % 2N4R „sėklos“. Vykdoma 50 °C temperatūroje.

4) Naudojama 40 µM 2N4R, 50 µM ThT, 67,5 µg/mL heparino, 50 mM MES pH 6 buferinis tirpalas ir 2,5 %, 5 % ir 10 % 1N4R „sėklos“. Vykdoma 50 °C temperatūroje.

2.4.13. Duomenų apdorojimas

Rotor Gene Q aparatas fiksuoja fluorescencijos intensyvumą kas minutę. Gauti duomenys normalizuojami pagal (1) formulę ir brėžiami fluorescencijos priklausomybės nuo laiko grafikai. Grafike pateikiami visi pakartojimai.

$$I/I_{max} = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \quad (1)$$

Matematinis modelis nepritaikytas duomenų gluodinimui, nes esant skirtingoms sąlygoms gaunama skirtinga kreivių forma. Vienu atveju labiau hiperbolinė, kitu labiau sigmoidinė.

2.4.14. Atominės jėgos mikroskopija

Atominės jėgos mikroskopija 30 µL mėginio užnešama ant aukščiausios kokybės V1 1 cm diametro žėručio disko. Mėginys palaikomas 30 min. ant žėručio Vėliau žėrutis švelnia srove nuplaunamas 1 mL MilliQ vandens ir nudžiovinamas po švelnia suspausto azoto srove. Mikroskopavimas atliekamas „Dimension Icon“ atominės jėgos mikroskopu dinaminiam virpančiojo zondo režime (angl. *Tapping mode*). Skenavimui naudotas „RTESPA-300“ zondas, kurio virpėjimo dažnis ~300 kHz. Skenavimo greitis 0,5-1 Hz, maksimali skenavimo kokybė 1024×1024 taškų.

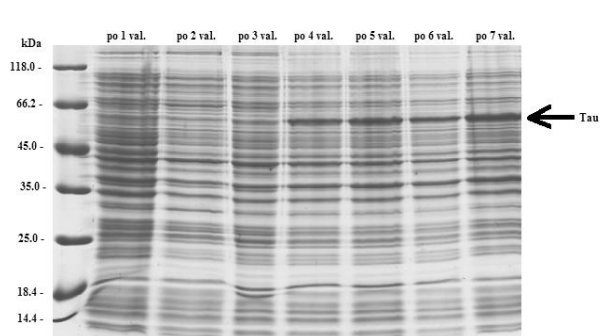
3. Rezultatai

Bakalaurinį darbą galima suskirstyti į 2 dalis: *Tau* baltymo gryninimą ir agregacijos tyrimus. Gryninimo dalies tikslas ir pagrindinė problema buvo gauti *tau* baltymą su kuo mažiau priemaišų. *Tau* baltymas yra bestruktūris, citozolinis ir tirpus, baltymo aminorūgščių sekoje yra cisteino, tad gryninimas yra itin kompliktuotas. Gryninant gaunami nedideli baltymo kiekiai: iš 1600 mL LB terpės išauginami vidutiniškai 7-8 g biomasės, iš kurios gryninant gaunami 6-7 mg baltymo. Baigiamojo darbo metu buvo išbandytos įvairios gryninimo sąlygos, gryninimas buvo optimizuotas, optimizavus gauti etapai: ląstelių suardymas ultragarsu, termoišsodinimas, katijoninė chromatografija bei gelfiltracija, po kurios baltymai sukonzentruojami. Visi optimizavimo darbai atlikti su 2N4R izoforma. Praktikos metu buvo išgrynintos 5 *tau* baltymo izoformos: 0N3R; 1N3R; 1N4R; 2N3R; 2N4R. Viso buvo atlikti 32 gryninimo procesai.

Antrasis etapas *Tau* baltymo agregacijos tyrimai. Buvo ieškoma labiausiai 2N4R izoformos agregacijai tinkamų sąlygų. Vėliau geriausiomis sąlygomis agreguotos ir palygintos visos turimos izoformos. Tam nubrėžti normalizuoti grafikai.

3.1. Transformacijos optimizavimas

Atlikta transformacija į *E. coli* BL21 Star (DE3) ir *E. coli* BL21 (DE3) kamienus. BL21 Star pasižymi stabilesnes mRNR, todėl jam būding didesnė raiška, nei BL21 kamiene. Buvo nuspręsta išbandyti abu variantus. Po transformacijos abiejų kamienų bakterijos augintos LB terpėje. Abiejų transformatų Lac operono indukcija vyksta po trijų valandų, gauti biomasės kiekiai panašūs. Auginimo metu kas valandą paimti mėginiai išanalizuoti NDS-PAAG elektroforezes metodu (3.1, 3.2 pav). BL21 Star (DE3) kamiene baltymo sintetinta daugiau.



3.1. pav. Baltymo sintezė BL21 Star (DE3) kamiene auginant LB terpėje. NDS-PAAG metodu analizuoti kas valanda auginimo metu imami mėginiai.

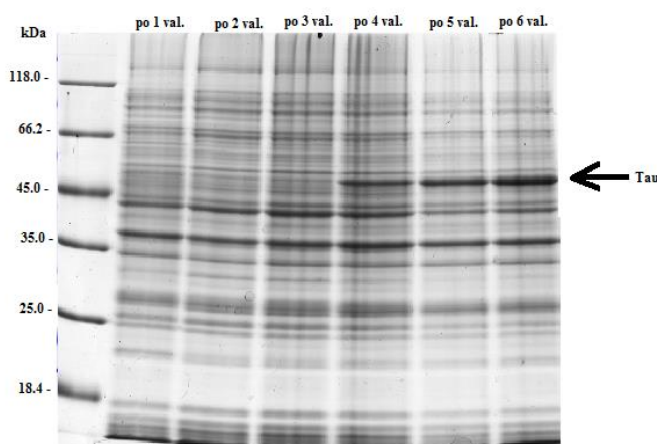


3.2. pav. Baltymo sintezė BL21 (DE3) kamiene auginant LB terpėje. NDS-PAAG metodu analizuoti kas valanda auginimo metu imami mėginiai.

Vėliau, jau išgryninus *tau* baltymą buvo pastebėta, jog nors ir baltymo grynumas abiem atvejais panašus, iš tokio pat kiekio biomasės iš BL21 (Star) kamieno buvo gauta apie 15 % daugiau *tau* baltymo, tad šis kamienas pasirinktas *tau* baltymo sintezei.

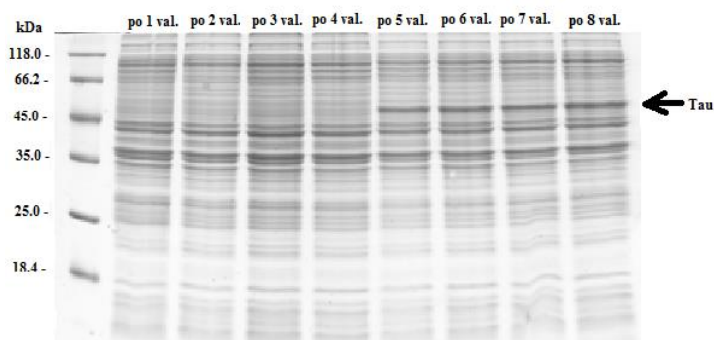
3.2. Biomasės auginimo optimizavimas.

Išbandytos mitybinės terpės: LB, minimali bei autoinduktyvi ZYM. Kai transformantai auginami LB terpėje baltymo ekspresija indukuojama IPTG, kai optinis tankis esant 600 nm bangos ilgiui pasiekia 0,6–1 optinius vienetus (3.1. pav.). Transformantai auginti ir autoinduktyvioje ZYM terpėje. Po kiekvieno auginimo tikslinio baltymo ekspresija analizuota NDS – PAAG elektroforezės būdu. Matoma, jog ZYM tikslinio baltymo sintezė indukuojama po 3-4 valandų, taip pat, kaip ir LB terpės atveju (3.3. pav.).



3.3. pav. *Tau* sintezė ZYM terpėje naudojant BL21 Star (DE3) kompetentines ląsteles. NDS-PAAG metodu analizuoti kas valanda auginimo metu imami mėginiai.

Auginta minimalioje terpėje, norint sumažinti priemaišų procentą. Deja, rezultatas nepagerėjo, o procesas pasunkėja, ilgiau reikia laukti indukcijos, auginimo metu gaunama mažiau baltymo (3.4. pav.).



3.4 pav. *Tau* sintezė minimalioje terpėje, naudojant BL21 Star (DE3) kompetentines ląsteles. NDS-PAAG metodu analizuoti kas valanda auginimo metu

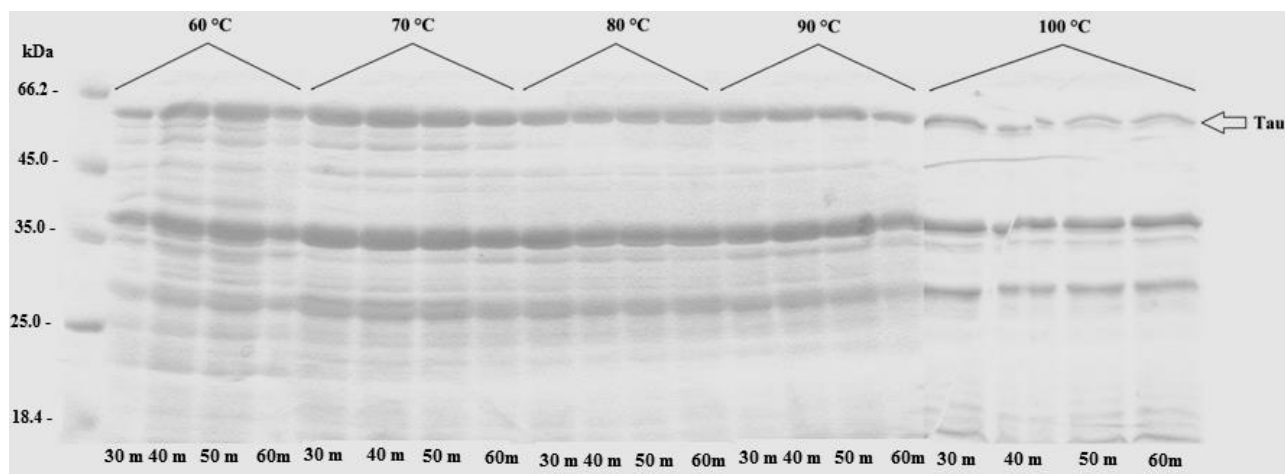
3.3. Priemaišinių baltymų išsodinimas

Buvo išbandyti 2 pirminio gryninimo etapai: priemaišinių baltymų pašalinimas kaitinant arba anijoninė chromatografija naudojant DEAE sefarozę ir surenkant tik pratekėjimą. Tau baltymas termostabilus, tad kaitinant nepasikeičia. Tyrimai parodė, jog termo išsodinimo metu pavyksta atsikratyti daugiau priemaišų, tačiau abiejų etapų vykdyti nėra verta, kadangi eksperimentiškai patikrinta, jog bendras rezultatas įvykdžius abu etapus nepasikeičia (3.9. pav.). Siekta rasti geriausias sąlygas kaitinimui, nes per maža temperatūra ar kaitinimo laikas gali pašalinti ne visus priemaišinius baltymus, o per didelė temperatūra gali paveikti ir *tau* baltymą. Tad buvo atliktas tyrimas, mėginiai kaitinti, kaip parodyta 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Termo išsodinimo optimizavimo tyrimas

Kaitinimo temp.	Kaitinimo laikas	Kaitinimo temp.	Kaitinimo laikas
60 °C	30 min	90 °C	30 min
	40 min		40 min
	50 min		50 min
	60 min		60 min
70 °C	30 min	100 °C	30 min
	40 min		40 min
	50 min		50 min
	60 min		60 min
80 °C	30 min		
	40 min		
	50 min		
	60 min		

Visi mėginiai centrifuguoti, o supernatantai tirti NDS-PAAG elektroforezės metodu. Rezultatai (3.5. pav.) rodo, jog ir 30 minučių kaitinimo visiškai pakanka, ilgiau kaitinant rezultatas nepasikeitė. Tačiau kaitinant aukštesnėje nei 70 °C temperatūroje, pasišalina nedaug nei *tau* mažesnės molekulinės masės priemaišos, kurių nepavyksta atskirti vykdant chromatografijas. 100 °C temperatūra kaitinimui yra per didelė, dalis *tau* baltymo šioje temperatūroje denatūruoja. Tad buvo pasirinkta kaitinti 30 minučių 80 °C temperatūroje.



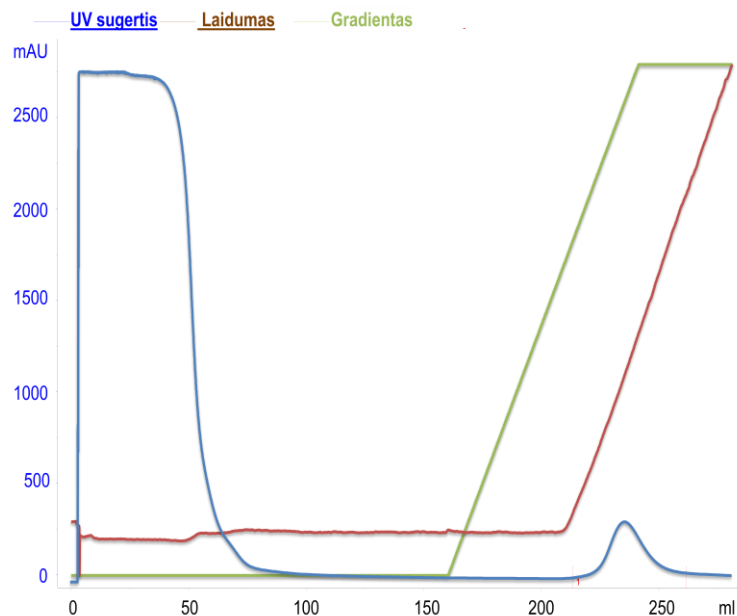
3.5. pav. Termo išsodinimo priklausomybė nuo laiko analizuota NDS-PAAG elektroforezės metodu.

3.4. Jonų mainų chromatografijos optimizavimas

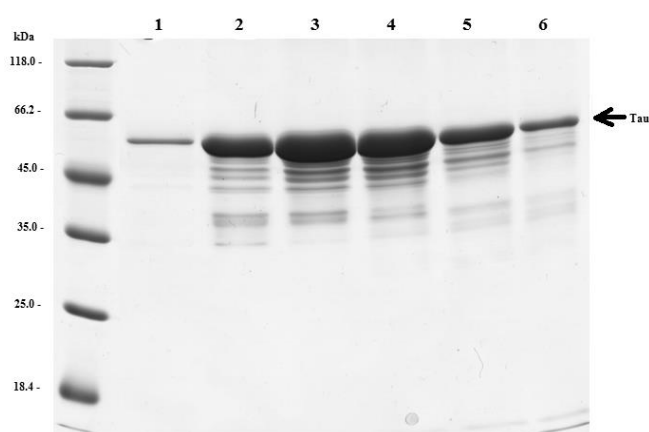
Vykdyta katijoninė chromatografija. Naudoti sorbentai: CM, SP ir Capto MMC. CM sorbente prie sefarozės yra prijungta karboksimetil ($-\text{OCH}_2\text{COO}^-$) grupė, tai silpnas katijonitas. SP sorbente prie sefarozės prijunta sulfopropil ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_4^-$) grupė, sorbentas stiprus katijonitas. Nesvarbu kurį sorbentą panaudosime, išgryninto baltymo kokybė nepasikeitė, taigi pasirinkta CM sefarozė.

Capto MMC - mišrus sorbentas, kuris turi prijungtas tiek teigiamai įkrautas, tiek hidrofobines grupes, todėl vienu metu vykdoma katijoninė ir atvirkščių fazių chromatografija. Buvo išbandyti įvairūs pH ir druskų gradientai, tačiau Capto MMC pritaikyti *tau* baltymo gamybai nepavyko. Išgryninti pavyko, bet panaudojus Capto MMC tik kaip silpnos katijoninės chromatografijos sorbentą.

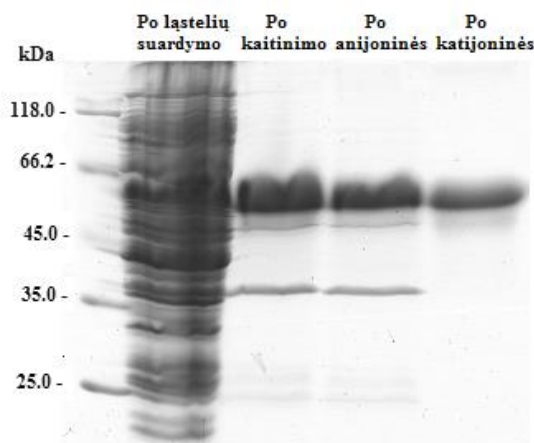
Jonų mainų chromatografija gali būti vykdoma skirtingais tekėjimo greičiais, įvairiais gradientais. Buferio tekėjimo greitis buvo keičiamas tam, jog pavyktų atskirti labai panašiu metu išeinančius baltymus. Tiek bandant didžiausią 3 mL/min, tiek mažiausią 0,5 mL/min tekėjimo greitį, rezultatai reikšmingai nesiskyrė, tad buvo parinktas patogiausias 3 mL/min tekėjimo greitis (Išbandyti buvo 0,5 mL/min, 1 mL/min, 2 mL/min, 3 mL/min tekėjimo greičiai). Mažinant gradientą jokių reikšmingų rezultatų negauta. Pateikta tiesinės eliuacinė chromatograma gleidžiant 3 mL/min greičiu, 40 % A→B per 27 minutes (3.6 pav.) bei NDS-PAAG elektroforezės metodu gautą mėginių analizę (3.7 pav., 3.8 pav.).



3.6 pav. Katijoninė chromatograma



3.7 pav. Katijoninės chromatogramos metu gautų mėginių analizė NDS-PAAG elektroforezės metodu



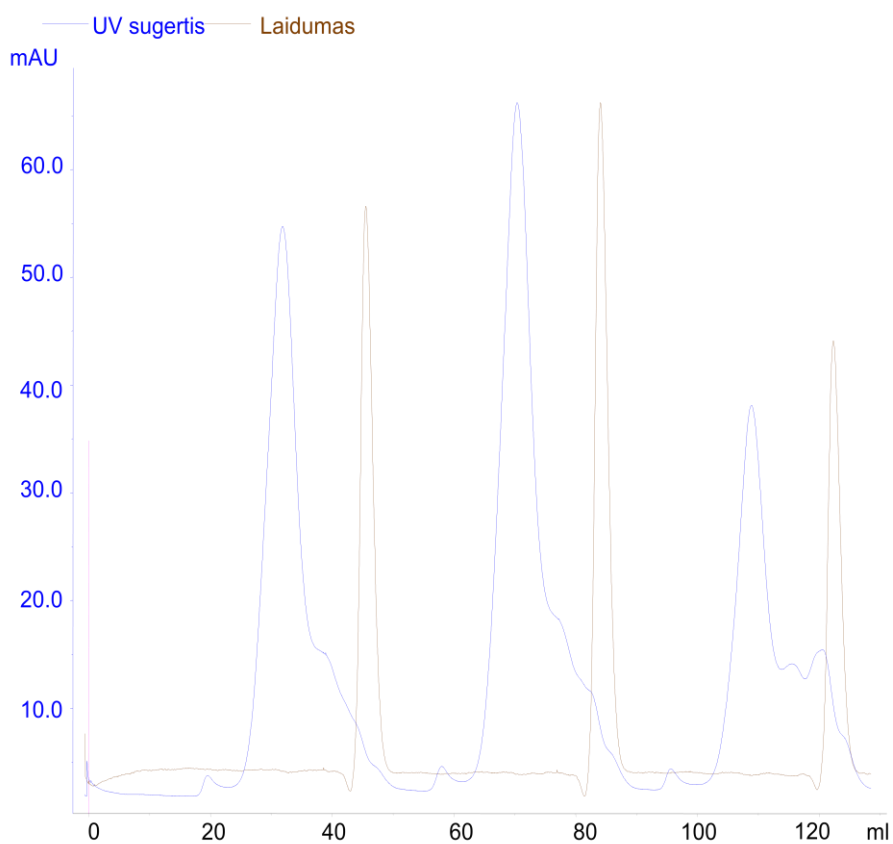
3.8 pav. Įvairių gryninimo etapų mėginių analizė NDS-PAAG elektroforezės metodu

Jonų mainų chromatografijoje labai svarbus pH. Vykdam katijoninę chromatografiją rekomenduojamas buferio pH turėtų būti 2 vienetais mažesnis nei baltymo pI, tačiau naudojami ir kiti variantai. Tau izoformų pI svyruoja apie 8,2. Išbandyti pH 6,4, 6,5, 7,4, iš kurių pasirinktas 6,4.

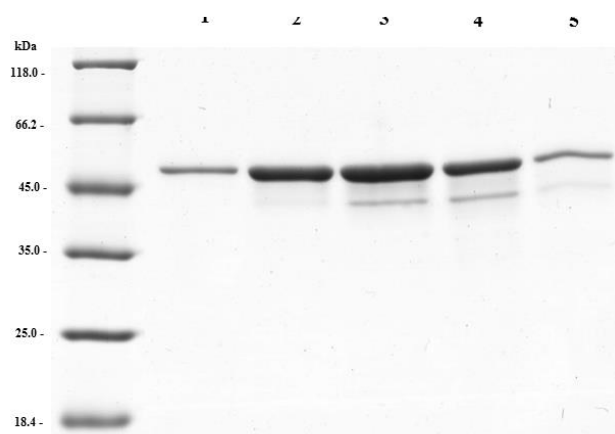
3.5. Gelfiltracijos optimizavimas

Gelfiltracijos metodas nors ir labai plačiai naudojamas, tačiau visgi nepasižymi dideliu atrankumu ar didelėmis optimizacijos galimybėmis. Optimizuoti bandyta keičiant tekėjimo greitį (1 mL/min, 0,5 mL/min). Galiausiai pasirinktas 1 mL/min tekėjimo greitis. Pateikta

chromatogramą, kurioje matomi 3 užnešimai (3.9 pav.) bei gautų frakcijų analizę NDS-PAAG metodu (3.10 pav.)



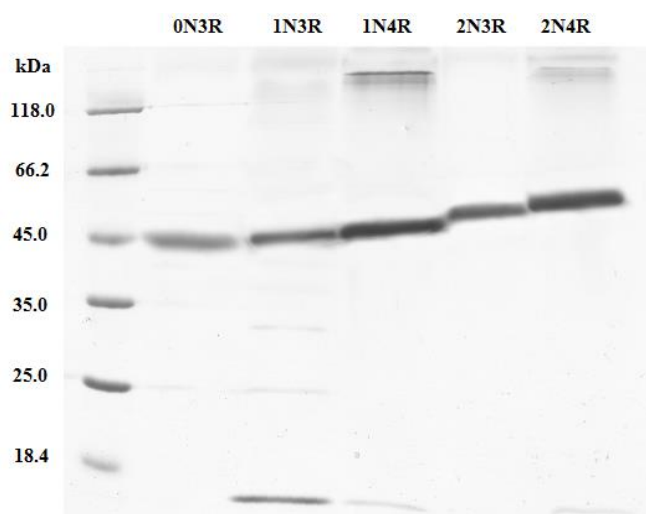
3.9 pav. Gelfiltracijos chromatograma



3.10 pav. Gelfiltracijos metu gautų frakcijų analizė NDS-PAAG elektroforezės metodu.

Tokiu būdu buvo išgrynintos 5 tau baltymo izoformas: 0N3R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R. (3.11 pav.) Viso gauta 123 mg. įvairių izoformų baltymo. Buvo atlikta masių

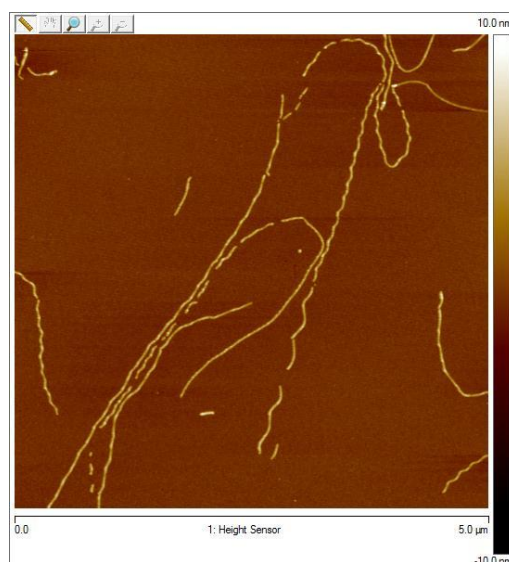
spektrometrijos analizė (atliko Dr. Vytautas Smirnovas), kuri patvirtino, jog išgrynintos tikrai šios izoformos.



3.11 pav. Įvairių izoformų analizė NDS-PAAG elektroforezės metodu

3.6. Agregacijos tyrimai

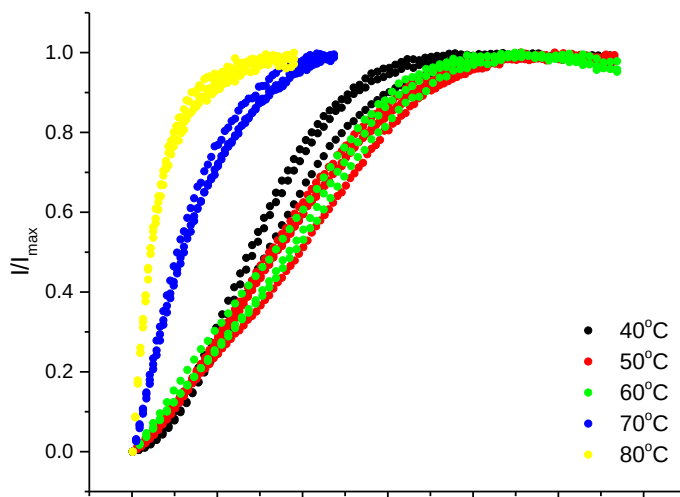
Neurodegeneracinėmis ligomis sergančių žmonių smegenyse randama baltymų agregatų. *Tau* agregatai siejami su Alzheimerio liga, tad agregacijos tyrimai yra itin aktualūs. Pirmiausiai parinktos sąlygos 2N4R agregacijai, vėliau agreguotos kitos izoformos, palygintos agregacijos kinetikos. Išbandyti įvairūs buferiniai tirpalai, kurių skirtingi pH, tačiau agregacija vyko tik MES buferyje, kurio pH 6. Agregacijos tyrimo metu gauti agregatai stebimi atominės jėgos mikroskopu. Nuotraukoje gautos ilgos fibrilės patvirtina, jog agregacijos eksperimentų metu tikrai stebimas amiloidinių fibrilių susidarymas.



3.12. pav. *Tau* fibrilių nuotrauka padaryta atominės jėgos mikroskopu.

3.6.1. Agregacijos laiko priklausomybė nuo temperatūros

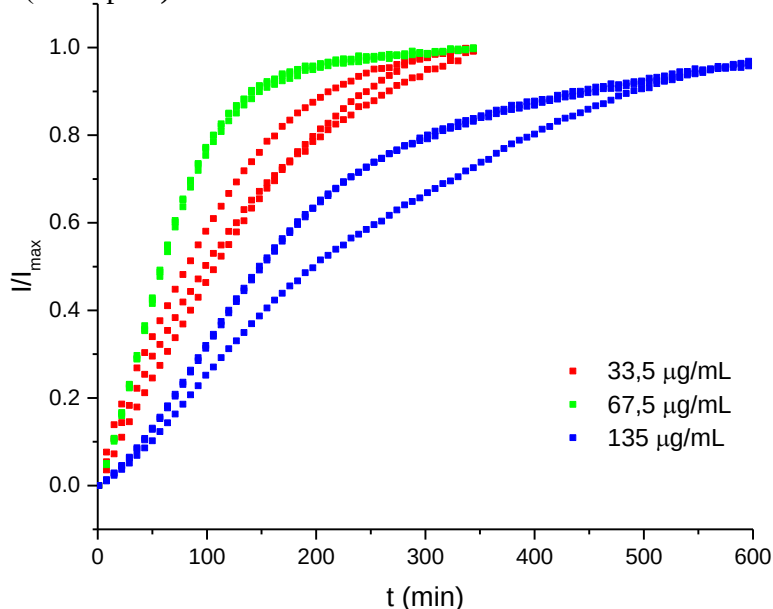
Agregacija vykdyta skirtingose temperatūrose. 60 °C temperatūroje agregacija lėčiausia, o tiek 40 °C, tiek 80 °C agregacija greitesnė (3.13. pav.).



3.13. pav. Agregacijos laiko priklausomybė nuo temperatūros.

3.6.2. Agregacijos laiko priklausomybė nuo heparino koncentracijos

Esant vienodai *tau* baltymo koncentracijai keičiama heparino koncentracija. Be heparino agregacija nevyksta, nedidelės heparino koncentracijos agregaciją skatina, o didelės slopina. Buvo svarbu rasti tokią koncentraciją, kuri maksimaliai greitina ir tokia koncentracija buvo 67,5 µg/mL (3.14. pav.).

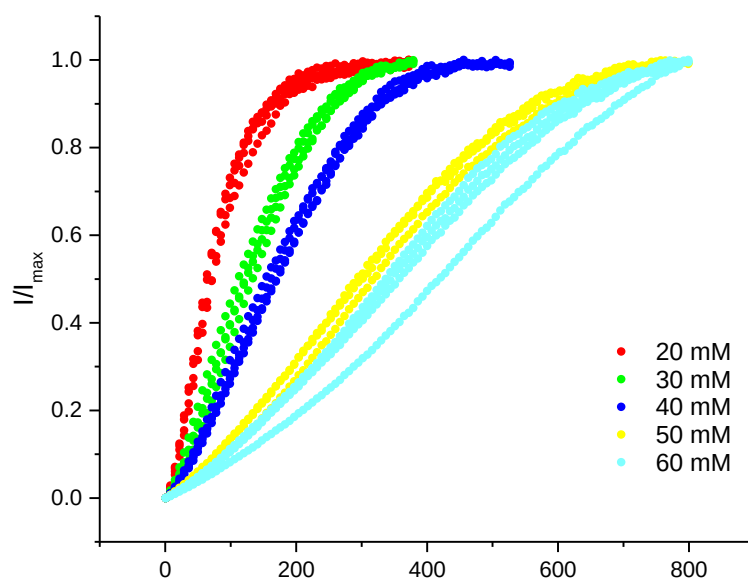


3.14. pav. Agregacijos laiko priklausomybė nuo heparino

3.6.3 Agregacijos laiko priklausomybė nuo baltymo koncentracijos.

Išlaikant pastovų heparino ir baltymo santykį buvo didinama baltymo koncentracija. Dažnai didinant baltymo koncentraciją agregacija greitėja, tačiau tau atveju matoma atvirkštinė

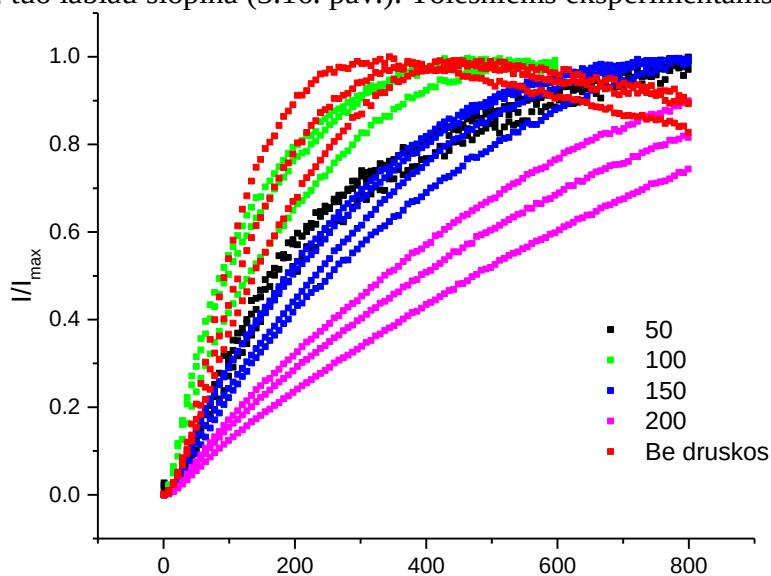
priklausomybė: didelės baltymo koncentracijos agreguoja lėčiau, nei nedidelės. Greičiausiai agreguoja 20 mM *tau* baltymo, lėčiausiai 60 mM (3.15. pav.).



3.15. pav. Agregacijos laiko priklausomybė nuo baltymo

3.6.4. Agregacijos laiko priklausomybė nuo joninės jėgos.

Joninė jėga stebima naudojant natrio chloridą. Druskos slopina agregaciją, kuo didesnės koncentracijos, tuo labiau slopina (3.16. pav.). Tolesniems eksperimentams NaCl nenaudotas.

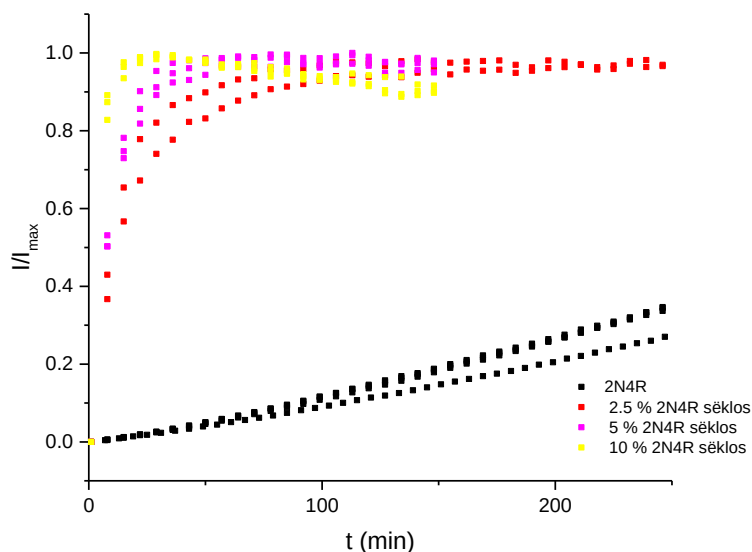


3.16 pav. Agregacijos laiko priklausomybė nuo joninės jėgos

3.6.5. Agregacijos laiko priklausomybė nuo skirtingų sėklos koncentracijų.

„Sėkla“ tai jau suagregavusios, ultragarsu suardytos amiloidinės fibrilės, veikiančios kaip agregacijos centras, nuo kurio gali toliau formuotis amiloidinės fibrilės, persokant nukleacijos etapą (lag fazę) ir iš karto vykstant elongacijos etapui. Bandytos sėklos koncentracijos: 2,5%, 5% ir 10%. Net 2,5% sėklos iš karto stipriai pagreitina *tau* baltymo

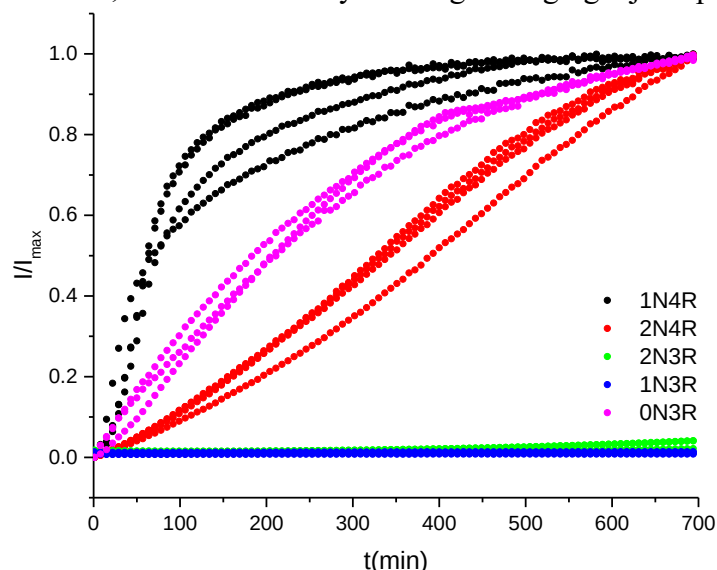
agregaciją, nebėra lag fazės (3.17. pav.). Matoma tiesinė priklausomybė: kuo „sėklos“ daugiau, tuo labiau pagreitinama agregacija.



3.17. pav. Agregacijos laiko priklausomybė nuo „sėklos“ koncentracijos.

3.6.6. Skirtingų izoformų agregacija

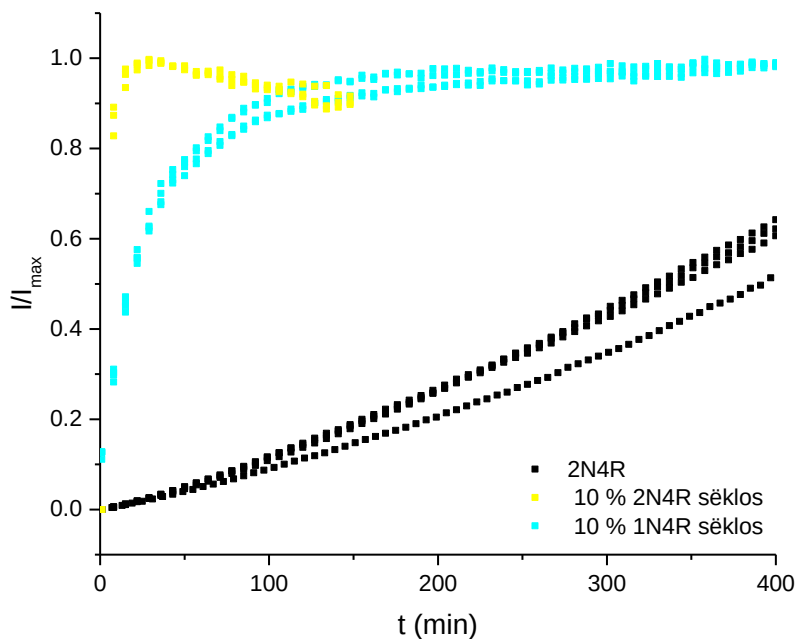
Agreguotos 5 izoformos: 0N3R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R. Izoformos skiriasi pasikartojimų skaičiumi su mikrovamzdeliais sąveikaujančio motyvo pasikartojančiame regione arba projekcinio domeno rūgštiniame regione. Pasikartojančiame regione esantys pasikartojimai turi heksapeptidinius motyvus, teoriškai jie skatina *tau* agregaciją. Gauti rezultatai tai patvirtina: 1N4R ir 2N4R agreguoja žymiai greičiau nei 1N3R ir 2N3R.(3.18. pav.), taigi galime daryti išvadą, jog 4R izoformos agreguoja greičiau nei 3R izoformos. Taip pat galima pastebėti, jog 0N agreguoja geriau nei 1N ar 2N. Svarstoma, jog taip gali būti dėl mažesnės izoformos masės, nes mažesni baltymai lengviau agreguoja tarpusavyje.



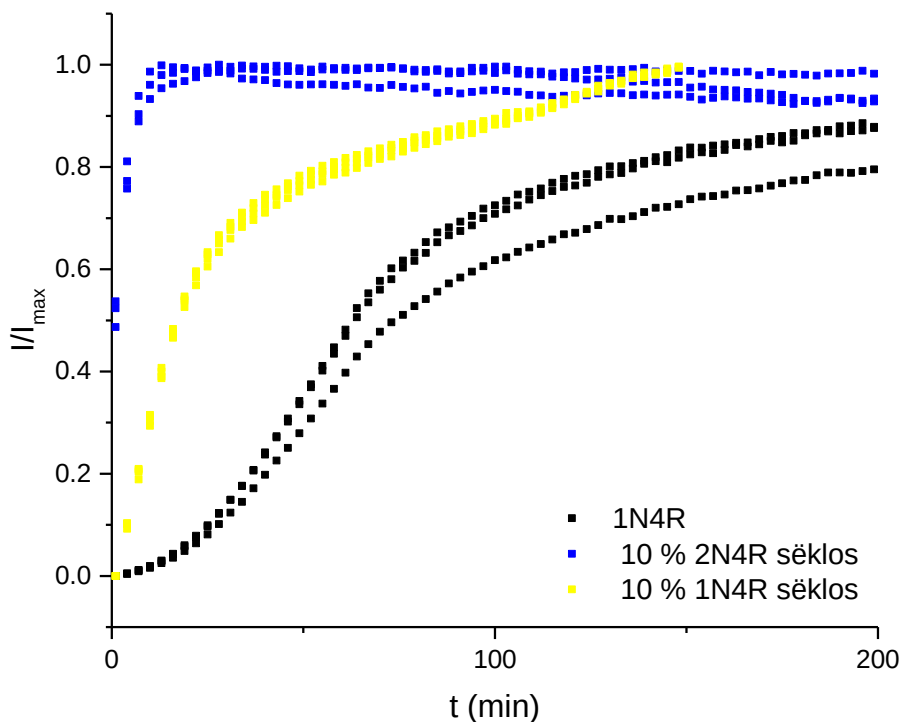
3.18. pav. Skirtingų *tau* izoformų agregacija.

3.6.7. Sąveika tarp 1N4R ir 2N4R izoformų

Šiam tyrimui buvo naudotos izoformos 2N4R ir 1N4R bei šių izoformų „sėklos“. Stebima, kaip 2N4R ir 1N4R agregacijos kinetiką veikia 2N4R ir 1N4R agregatai. „Sėkla“ visą laiką skatina agregacijos procesą. 2N4R atveju 2N4R (sava) „sėkla“ skatina agregaciją labiau, nei 1N4R „sėkla“ (3.18. pav.), o 1N4R atveju priešingai 2N4R „sėkla“ veikia geriau nei 1N4R (sava) „sėkla“ (3.19. pav.).



3.18. pav. 2N4R agregacijos laiko priklausomybė nuo 2N4R ir 1N4R sėklos.



3.19 pav. 1N4R agregacijos laiko priklausomybė nuo 2N4R ir 1N4R sėklos.

Išvados:

1. Optimizuotas *tau* baltymo gryninimo protokolas.
2. 4R izoformos agreguoja geriau nei 3R, o 0N izoformos agreguoja geriau nei 1N ar 2N.
3. 2N4R izoformos sėkla tiek 2N4R, tiek 1N4R agregaciją skatino labiau nei 1N4R sėkla.

Literatūros šaltiniai:

1. Avila, J., Lucas, J., Perez, M., Hernandez, F. 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. . *Physiol Rev.* , vol. 2, p. 361–384.
2. Buée, L., Bussiére, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P. R. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, vol. 33, p. 95–130.
3. Crowe, A., Ballatore, C., Hyde, E., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y. 2007. High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 358, p. 1–6.
4. Crowe, A., James, M. J., Virginia, M. Y. L., Smith, A. B., Trojanowski, J. Q., Ballatore, C., Brunden, K. R. 2013. Aminoethienopyridazines and methylene blue affect Tau fibrillization via cysteine oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, p. 11024–11037.
5. Dorval, V., Fraser, P. E. 2006. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, p. 9919–9924.
6. Dovidchenko, N. V., Leonova, E. I., Galzitskaya, O. V. 2014. Mechanisms of amyloid fibril formation. *Biochemistry (Moscow)*, vol. 79, p. 1515–1527.
7. Falcon, B., Cavallini, A., Angers, R., Glover, S., Murray, T. K., Barnham, L., ... Bose, S. 2015. Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, p. 1049–1065.
8. Fontaine, S. N., Sabbagh, J. J., Baker, J., Martinez-Licha, C. R., Darling, A., Dickey, C. A. 2015. Cellular factors modulating the mechanism of tau protein aggregation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 72, p. 1863–1879.
9. Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., ... Cryns, V. L. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, p. 10032–7.
10. Ghetti, B., Oblak, A. L., Boeve, B. F., Johnson, K. A., Dickerson, B. C., Goedert, M. 2015. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: A chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 41, p. 24–46.
11. Ha, T. 2014. Amyloid Fibrils: Formation, Polymorphism, and Inhibition.

12. Held, P. 2014. Analysis of α -Synuclein Fibril Formation in vitro using Fluorescence to Monitor Protein Aggregation in Microplates, p. 1–6.
13. Horiguchi, T., Uryu, K., Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., Lightfoot, R., Bellmann, C., ... Trojanowski, J. Q. 2003. Nitration of Tau Protein Is Linked to Neurodegeneration in Tauopathies. *The American Journal of Pathology*, vol. 163, p. 1021–1031.
14. Im, S. Y., Kim, Y. E., Kim, Y. J. 2015. Genetics of Progressive Supranuclear Palsy. *Journal of Movement Disorders*, vol. 8, p. 122–9.
15. Younan, N. D., Viles, J. H. 2015. A Comparison of Three Fluorophores for the Detection of Amyloid Fibers and Prefibrillar Oligomeric Assemblies. ThT (Thioflavin T); ANS (1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic Acid); and bisANS (4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic Acid). *Biochemistry*, vol. 54, p. 4297–4306.
16. Kadavath, H., Hofele, R. V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., ... Zweckstetter, M. 2015. Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, p. 7501–7506.
17. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. 2014. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, p. 496–496.
18. Lee, V. M. Y. 2011. Pathological Tau Aggregation.
19. Liu, K., Liu, Y., Li, L., Qin, P., Iqbal, J., Deng, Y., Qing, H. 2016. Glycation alter the process of Tau phosphorylation to change Tau isoforms aggregation property. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1862, p. 192–201.
20. Luna-muñoz, J., Harrington, C. R., Wischik, C. M., Flores-rodríguez, P., Avila, J., Zamudio, S. R., ... Floran-garduño, B. 2013. Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic , C- Terminally Truncated Tau in Alzheimer $\alpha\epsilon^{\text{TM}}$ s Disease. *Understanding Alzheimer's Disease*, p. 89–107.
21. Lutz, R. A. 2015. Regulation of Polarity by Microtubules.
22. Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., Niewiadomska, G. 2014. Tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, p. 4671–4713.
23. Min, S. W., Cho, S. H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W. W., ... Gan, L. 2010. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron*, vol. 67, p. 953–966.

24. Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Acevedo-Aquino, M. C., Williams, S. 2014. Phosphorylation of tau protein at sites Ser396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 40, p. 121–135.
25. Ramachandran, G., Udgaonkar, J. B. 2011. Understanding the kinetic roles of the inducer heparin and of rod-like protofibrils during amyloid fibril formation by tau protein. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, p. 38948–38959.
26. Reyes, J. F., Fu, Y., Vana, L., Kanaan, N. M., Binder, L. I. 2011. Tyrosine nitration within the proline-rich region of tau in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, vol. 178, p. 2275–2285.
27. Rochlin, M. W., Dailey, M. E., Bridgman, P. C. 1999. Polymerizing microtubules activate site-directed F-actin assembly in nerve growth cones. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 10, p. 2309–2327.
28. Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., Pepys, M. B., Fraser, P. E. 2000. The protofilament substructure of amyloid fibrils¹¹Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, vol. 300, p. 1033–1039.
29. Sposito, T., Preza, E., Mahoney, C. J., Setty-Salvia, N., Ryan, N. S., Morris, H. R., ... Wray, S. 2015. Developmental regulation of tau splicing is disrupted in stem cell-derived neurons from frontotemporal dementia patients with the 10 + 16 splice-site mutation in MAPT. *Human Molecular Genetics*, vol. 24, p. 5260–5269.
30. Stsiapura, V. I., Maskevich, A. A., Kuzmitsky, V. A., Uversky, V. N., Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K. 2008. Thioflavin T as a molecular rotor: Fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity. *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, p. 15893–15902.
31. Tompa, P. 2003. Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion. *BioEssays*, vol. 25, p. 847–855.
32. Von Bergen, M., Barghorn, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. 2005. Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1739, p. 158–166.
33. Wang, Y., Mandelkow, E. 2015. Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 17, p. 22–35.
34. Xu, S., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y. 2010. Characterization of tau fibrillization in vitro. *Alzheimer's and Dementia*, vol. 6, p. 110–117.