Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

Greta Musteikytė

METILENO MĖLIO ĮTAKOS ŽMOGAUS SUPEROKSIDO DISMUTAZĖS I IR INSULINO AMILOIDINEI AGREGACIJAI NUSTATYMAS

IMPACT OF METHYLENE BLUE ON SUPEROXIDE DISMUTASE I AND INSULIN AMYLOID AGGREGATION

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2019

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius
(Vardas, Pavardė)

(Data)

Greta Musteikytė

METILENO MĖLIO ĮTAKOS ŽMOGAUS SUPEROKSIDO DISMUTAZĖS I IR INSULINO AMILOIDINEI AGREGACIJAI NUSTATYMAS

IMPACT OF METHYLENE BLUE ON SUPEROXIDE DISMUTASE I AND INSULIN AMYLOID AGGREGATION

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovas dr. Vytautas Smirnovas _____ (Parašas) _____ (Data)

Konsultantas Tomas Šneideris _____ (Parašas) _____ (Data)

Konsultantas dr. Rūta Gruškienė _____ (Parašas) _____ (Data)

Lietuvių kalbos konsultantas dr. Aušra Žemienė _____ (Parašas) _____ (Data)

Vilnius, 2019

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, Pavardė)

(Data)

Technologijos mokslų sritis
Bioinžinerijos studijų kryptis
Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO UŽDUOTIS

.....Nr.....

Vilnius

Studentei **Gretai Musteikytei**

Baigiamojo darbo tema: **Metileno mėlio įtakos žmogaus superoksido dismutazės I ir insulino amiloidinei agregacijai nustatymas**

Patvirtinta 2019 m. kovo 19 d. dekano potvarkiu Nr. 154fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2019 m. gegužės 25 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Susintetinti ir išgryninti rekombinantinę žmogaus superoksido dismutazę I, atlikti agregacijos kinetikos tyrimus ir nustatyti metileno mėlio įtaką šio baltymo agregacijai. Atlikti insulino agregacijos tyrimus su metileno mėliu.

Konsultantas _____ dr. Rūta Gruškienė
(Parašas)

Konsultantas _____ Tomas Šneideris
(Parašas)

Vadovas _____ dr. Vytautas Smirnovas
(Parašas)

UŽDUOTĮ GAVAU

(Parašas)

Greta Musteikytė

(Vardas, Pavardė)

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk. .....
Data .....

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas: **Metileno mėlio įtakos žmogaus superoksido dismutazės I ir insulino amiloidinei agregacijai nustatymas**

Autorius **Greta Musteikytė** Vadovas **dr. Vytautas Smirnovas**

Kalba
Lietuvių
Užsienio

Anotacija

Amiotrofinė lateralinė sklerozė — nepagydoma neurodegeneracinė liga, kuria sergančių pacientų organizmuose žūva motoriniai neuronai. Pirmas atrastas ir dažniausiai su šia liga siejamas baltymas yra superoksido dismutazė I, kurios gausias β klostes turintys amiloidiniai agregatai randami ligonių nervų sistemoje. Skaičiuojama, kad ateityje dėl visuomenės senėjimo sergamumas šia liga didės, tad dedamos didžiulės pastangos siekiant sukurti vaistus jos gydymui. Vienas iš potencialių vaistų yra metileno mėlis; jau yra įrodytas šio junginio efektyvumas moduliuojant kitų amiloidinių baltymų agregaciją. Šio magistro darbo tikslas – patikrinti metileno mėlio įtaką superoksido dismutazės I ir modelinio baltymo insulino, dažnai naudojamo vaistų neurodegeneracinių ligų gydymui paieškoms, amiloidinei agregacijai.

Darbo metu chromatografiniais metodais išgryninta 1207 mg rekombinantinio superoksido dismutazės I baltymo. Baltymų agregacija stebėta fluorescencinės spektroskopijos metodu, agregatų antrinė struktūra tirta Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos, morfologija – atominės jėgos mikroskopijos metodais.

Nustatyta, kad veikiant metileno mėliu sulėtėja superoksido dismutazės I agregacijos kinetika, pakinta agregatų struktūra ir morfologija. Tuo tarpu junginys insulino agregacijai įtakos nedaro.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas; literatūros apžvalga ir analizė; prietaisai, medžiagos ir metodai; rezultatai ir jų aptarimas; išvados ir literatūros sąrašas; priedai.

Darbo apimtis: 65 lapai teksto be priedų, 35 paveikslai, 4 lentelės, 110 bibliografinių šaltinių. Atskirai pridedamas darbo priedas.

Prasminiai žodžiai: amiloidinė agregacija, insulinas, metileno mėlis, superoksido dismutazė I

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of **Fundamental Sciences**
Department of **Chemistry and Bioengineering**

ISBN ISSN
Copies No. .....
Date .....

Bioengineering study programme master thesis

Title: **Impact of methylene blue on superoxide dismutase I and insulin amyloid aggregation**

Author **Greta Musteikytė** Academic supervisor **dr. Vytautas Smirnovas**

Thesis language
Lithuanian
Foreign

Annotation

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) belongs to a group of neurodegenerative diseases and results in motor neuron death. Superoxide dismutase I (SOD1), forming β sheet rich deposits in human nervous system, is the most commonly associated protein with the disorder. It is estimated that the number of ALS cases will increase due to ageing of the population, therefore a lot of effort is being put in order to find an effective therapy for the disease. One of the potential drugs investigated is a small-molecule compound methylene blue, that has already been shown to effectively modulate aggregation pathways of other amyloidogenic proteins. Therefore the aim of this thesis is to determine the impact of methylene blue on aggregation of superoxide dismutase I and insulin, which is commonly used as a model protein in anti-aggregation drug screenings.

During preparation of the thesis 1207 mg of recombinant superoxide dismutase I was purified using liquid chromatography methods. Kinetics of protein aggregation was followed by the means of fluorescence spectroscopy; secondary structure of aggregates was established by using Fourier transform infrared spectroscopy and finally, atomic force microscopy was utilized to determine morphology of aggregates.

The study revealed that mehylene blue acts as an amyloid remodelling agent on SOD1 while insulin aggregation remains largely unaffected.

Structure of the thesis: introduction; literature review; materials and methods; results and discussion; conclusions; references; appendices.

Thesis consists of: 65 p. text without appendices, 35 figures, 4 tables, 110 bibliographical entries. Appendice added separately.

Keywords: amyloid aggregation, insulin, methylene blue, superoxide dismutase I

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo organizavimo tvarkos aprašo
2 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Greta Musteikytė, 20170916

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIfm-17

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2019 m. gegužės 25 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Metileno mėlio įtakos žmogaus superoksido dismutazės I ir insulino amiloidinei agregacijai nustatymas“ patvirtintas 2019 m. kovo 19 d. dekano potvarkiu Nr. 154fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Parenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: daktaras Rūta Gruškienė, Tomas Šneideris. Mano darbo vadovas daktaras Rūta Gruškienė.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs (-usi).

(Parašas)

Greta Musteikytė

(Vardas ir pavardė)

Turinys

ĮVADAS **12**

1. LITERATŪROS APŽVALGA IR ANALIZĖ **13**
1.1. Superoksido dismutazė I . . . 13
1.2. Amiotrofinė lateralinė sklerozė . . . 14
1.2.1. SOD1 vaidmuo ALS . . . 15
1.3. Amiloidinė agregacija . . . 16
1.3.1. Veiksniai, turintys įtakos baltymų agregacijai . . . 17
1.3.2. Amiloidinės fibrilės . . . 18
1.4. Vaistų kūrimo principai amiloidinėms ligoms gydyti . . . 19
1.5. SOD1 agregacijos slopikliai . . . 20
1.6. Insulinas . . . 22
1.7. Insulino agregacijos slopikliai . . . 23
1.8. Metileno mėlis . . . 24
1.8.1. Junginio panaudojimas, fizikinės ir farmakokinetinės savybės . . . 24
1.8.2. Taikymas amiloidinių ligų gydymui . . . 25
1.8.3. Metileno mėlis ir SOD . . . 26
1.8.4. Metileno mėlio veikimas nervų sistemoje . . . 27
1.9. Metodai amiloidinei agregacijai tirti *in vitro* . . . 28

2. PRIETAISAI, MEDŽIAGOS IR METODAI **30**
2.1. Prietaisai . . . 30
2.2. Medžiagos . . . 30
2.2.1. Konstruktas . . . 31
2.2.2. Kompetentinės ląstelės . . . 31
2.2.3. Mitybinės terpės . . . 31
2.2.4. Tirpalai . . . 31
2.3. Metodai . . . 32
2.3.1. Plazmidinės DNR transformacija . . . 32
2.3.2. Ląstelių kultūros paruošimas šaldymui . . . 32
2.3.3. SOD1 baltymo sintezė . . . 32
2.3.4. Baltymų elektroforezė . . . 32
2.3.5. Baltymo gryninimas . . . 32
2.3.6. Baltymo koncentracijos nustatymas . . . 33
2.3.7. Amiloidinių fibrilių gamyba . . . 33
2.3.8. Agregacijos kinetikos tyrimai . . . 33
2.3.9. Fluorescencinių dažų jungimo tyrimai . . . 34
2.3.10. Infraraudonųjų spindulių spektroskopija . . . 34
2.3.11. Tyrimai su mikrodializės celėmis . . . 34
2.3.12. Atominės jėgos mikroskopija . . . 35

2.3.13. Duomenų apdorojimas 36

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 37

3.1. Baltymo gryninimas 37

3.2. Metileno mėlio įtaka SOD1 agregacijos kinetikai 37

3.2.1. Metileno mėlio įtaka SOD1 spontaninei agregacijai 38

3.2.2. Metileno mėlio įtaka SOD1 agregacijai su „sėkla" 40

3.2.3. Metileno mėlio gebėjimo ardyti fibriles nustatymas 42

3.3. Metileno mėlio jungimasis prie SOD1 monomero ir fibrilių 44

3.4. Agregatų gebėjimo jungti SOD1 baltymo monomerus tyrimas 45

3.4.1. A tipo agregatų veikimas 45

3.4.2. B tipo agregatų veikimas 46

3.4.3. C tipo agregatų veikimas 48

3.5. Metileno mėlio įtaka insulino agregacijos kinetikai 49

3.5.1. Metileno mėlio įtaka insulino agregacijai pH 1,8 sąlygomis 49

3.5.2. Metileno mėlio įtaka insulino agregacijai pH 2 sąlygomis 50

3.5.3. Metileno mėlio įtaka insulino agregacijai pH 2,4 sąlygomis 52

4. APIBENDRINIMAS 54

IŠVADOS 55

LITERATŪROS SĄRAŠAS 65

PRIEDAS i

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS

Paveikslų sąrašas

1.1 SOD1 erdvinė struktūra . . . 13
1.2 FDA patvirtinti vaistai ALS gydymui . . . 15
1.3 Su ALS susijusios mutacijos SOD1 gene . . . 16
1.4 Amiloidinės agregacijos etapai . . . 17
1.5 Bendra baltymų agregacijos schema . . . 18
1.6 Amiloidinių fibrilių struktūra . . . 19
1.7 Žmogaus insulino struktūros . . . 22
1.8 Insulino agregacijos mechanizmas . . . 23
1.9 Metileno mėlio formos . . . 24
1.10 ThT struktūra ir optinės savybės . . . 29
2.1 Mikrodializės celės . . . 35
2.2 Sigmoidinės kreivės grafikas . . . 36
3.1 SOD1 gryninimas nikelio jonų gimiringumo chromatografija . . . 37
3.2 Spontaninė SOD1 agregacija su metileno mėliu . . . 38
3.3 Agregatai, gauti spontaniškai agreguojant SOD1 su metileno mėliu . . . 39
3.4 Agregatų gebėjimas jungti amiloidų detekcijai naudojamus dažus . . . 40
3.5 SOD1 agregacijos su „sėkla" kinetika . . . 41
3.6 Agregatai, gauti agreguojant SOD1 su „sėkla" . . . 42
3.7 Agregatų gebėjimas jungti amiloidų detekcijai naudojamus dažus . . . 42
3.8 Fibrilių morfologija ir antrinė struktūra . . . 43
3.9 Fibrilių gebėjimas jungti amiloidų detekcijai naudojamus dažus . . . 44
3.10 Metileno mėlio jungimasis prie SOD1 baltymo ir fibrilių . . . 45
3.11 Agregatų savireplikacijos savybių tyrimo schema . . . 46
3.12 A tipo agregatais inicijuotos SOD1 agregacijos kinetika . . . 46
3.13 A tipo agregatais ir fibrilėmis inicijuotų agregatų AFM nuotraukos . . . 47
3.14 B tipo agregatais inicijuotos SOD1 agregacijos kinetikos kreivės . . . 47
3.15 B tipo agregatais ir fibrilėmis inicijuotų agregatų AFM nuotraukos . . . 48
3.16 C tipo agregatais inicijuotos SOD1 agregacijos kinetikos kreivės . . . 48
3.17 C tipo agregatais ir fibrilėmis inicijuotų agregatų AFM nuotraukos . . . 49
3.18 Insulino agregacijos pH 1,8 sąlygomis kinetika . . . 50
3.19 Insulino fibrilių, suformuotų pH 1,8 sąlygomis, AFM nuotraukos . . . 51
3.20 Insulino agregacijos pH 2 sąlygomis kinetika . . . 51
3.21 Insulino fibrilių, suformuotų pH 2 sąlygomis, AFM nuotraukos . . . 52
3.22 Insulino agregacijos pH 2,4 sąlygomis kinetika . . . 53
3.23 Insulino fibrilių, suformuotų pH 2,4 sąlygomis, AFM nuotraukos . . . 53

Lentelių sąrašas

1.1 Su ALS susiję genai ir baltymai 15
1.2 Polifenoliai, darantys įtaką SOD1 agregacijai 20
1.3 Kiti junginiai, darantys įtaką SOD1 agregacijai 21
1.4 Amiloidų detekcijai naudojami dažai 28

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

Aβ	–	Amiloidas β
AFM	–	Angl. *atomic force microscopy*, atominės jėgos mikroskopija
ALS	–	Amiotrofinė lateralinė sklerozė
BMR	–	Branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija
CD	–	Apskritiminis dichroizmas
CR	–	Kongo raudonasis
DLS	–	Angl. *dynamic light scattering*, dinaminė šviesos sklaida
DMSO	–	Dimetilsulfoksidas
DSC	–	Diferencinė skanavimo kalorimetrija
DSF	–	Diferencinė skanavimo fluorimetrija
DTT	–	Ditiotreitolis
EDTA	–	Etilendiamintetraacto rūgštis
FDA	–	Angl. *Food and Drug Administration*, maisto ir vaistų administracijos tarnyba
FTIR	–	Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija
MM	–	Metileno mėlis
MS	–	Masių spektrometrija
NADPH	–	Nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas
NDS	–	Natrio dodecilsulfatas
NDS-PAGE	–	Natrio dodecilsulfato poliakrilamidinių gelių elektroforezė
NMDA	–	N-metil-D-aspartatas
NR	–	Nilo raudonasis
pFTAA	–	Pentamerinė formiltiofeno acto rūgštis
PGR	–	Polimerazės grandininė reakcija
ROS	–	Angl. *reactive oxygen species*, reaktyvios deguonies formos
SAXS	–	Angl. *small angle X-ray scattering*, mažo kampo rentgeno spindulių difrakcija
SEC	–	Angl. *size exclusion chromatography*, gelfiltracija
TEM	–	Transmisinė elektroninė mikroskopija
TEMED	–	Tetrametiletilendiaminas
ThT	–	Tioflavinas T
WT	–	Angl. *wild-type*, laukinis tipas
XRD	–	Angl. *X-ray diffraction*, rentgenostruktūrinė analizė

ĮVADAS

Neurodegeneracinės ligos – nervų sistemos ligos, kuriomis sergantiems žmonėms būdingi įvairūs nervų sistemos veiklos – atminties, kalbos, judesių, mąstymo sutrikimai. Keletas tokio tipo ligų pavyzdžių – Alzheimerio, Parkinsono, Hantingtono, prioninės ligos (Kroicfeldo-Jakobo liga, kuru, transmisinė spongiforminė encefalopatija ir kitos). Dažniausiai šio tipo ligomis suserga vyresnio amžiaus žmonės. Visas šias ligas sieja amiloidinių agregatų kaupimasis nervų sistemos ląstelėse ir už jų ribų. Tokio tipo baltymų sankaupos sutrikdo normalią ląstelių veiklą ir jos galiausiai žūva.

Amiloidiniai agregatai – natyvią formą praradusių baltymų sankaupos, kuriose gausu β klostytų struktūrų (Stroo et al., 2017; Wolfe and Cyr, 2011). Tokio tipo agregatai pasižymi daliniu atsparumu proteinazėms, detergentams ir specifiškai jungia tam tikras molekules (dažus) ir keičia jų optines savybes (pvz. tioflaviną T, Kongo raudonąjį dažą, dapoksilą). Dažniausiai pacientų nervų sistemos audiniuose randami agregatai yra savitos formos – kelių nm pločio, iki kelių µm ilgio pailgos amiloidinės fibrilės (Chan et al., 2013).

Viena iš amiloidinių neurodegeneracinių ligų yra amiotrofinė lateralinė sklerozė (ALS), kuria sergančių pacientų organizmuose žūva ir savo funkcijos nebeatlieka motoriniai neuronai. Kol kas vaistų, visiškai išgydančių ALS, nėra. Su šia liga dažniausiai siejama antioksidacinio fermento superoksido dismutazės I (SOD1) agregacija; tad magistro darbo metu tiriama potencialaus slopiklio metileno mėlio įtaka SOD1 agregacijos kinetikai ir agregatų struktūrai.

Kadangi amiloidinius agregatus sieja panaši struktūra – β klostės, manoma, kad egzistuoja junginys ar jų grupė, slopinanti įvairių baltymų agregaciją (Ow et al., 2015; Sneideris et al., 2015a). Tokiems junginiams surasti naudojami ne tik tiesiogiai su ligomis susiję baltymai, bet ir modeliniai, pavyzdžiui, insulinas, kurių agregacijos mechanizmai *in vitro* yra gerai ištyrinėti (Muzaffar and Ahmad, 2011; Surmacz-Chwedoruk et al., 2014). Tad atliekant šį darbą bus tikrinama hipotezė, ar metileno mėlis gali veikti kelių baltymų – SOD1 ir žmogaus insulino agregacijos procesus.

Amiloidinių agregatų susidarymą patogu stebėti naudojant fluorescencinį dažą tioflaviną T; tad fluorescencinės spektroskopijos metodas ir buvo naudojamas agregacijos kinetikos tyrimams, aprašytiems šiame darbe. Agregatų morfologija vertinama itin jautriu, aukštos skiriamosios gebos atominės jėgos mikroskopijos metodu, o antrinė struktūra – Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos metodu. Tyrimams naudotas iš tiekėjų įsigytas insulinas, o rekombinantinė SOD1 sintetinta ir gryninta šio darbo metu.

Darbo tikslas – ištirti metileno mėlio įtaką SOD1 ir žmogaus insulino amiloidinei agregacijai.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti rekombinantinės žmogaus Cu, Zn superoksido dismutazės sintezę ir ją išgryninti.
2. Atlikti SOD1 ir insulino agregacijos kinetikos eksperimentus su metileno mėliu.
3. Ištirti SOD1 agregatų struktūrą ir morfologiją.
4. Atlikti metileno mėlio jungimosi prie SOD1 baltymo ir fibrilių tyrimus.

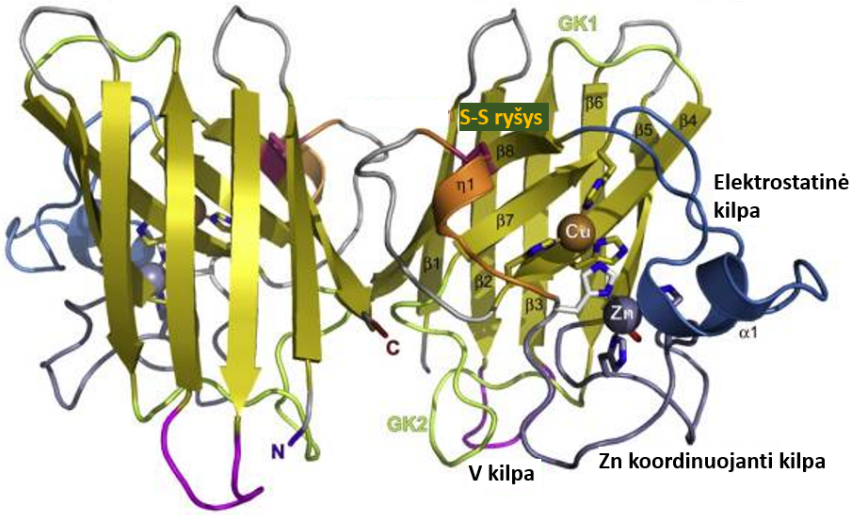
1. LITERATŪROS APŽVALGA IR ANALIZĖ

1.1. Superoksido dismutazė I

Superoksido dismutazė I (SOD1) – antioksidacinis fermentas, priklausantis superoksido dismutazių šeimai. SOD1 – 32 kDa homodimeras, randamas eukariotinių ląstelių citozolyje, turintis po 1 Cu^{2+} ir Zn^{2+} joną kiekviename subvienete (McCord and Fridovich, 1969). Superoksido dismutazių šeimos baltymai katalizuoja superoksido jono virtimą į vandenilio peroksidą ir deguonį:

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

Superoksido dismutazė yra vienas iš efektyviausių fermentų, jos katalitinė konstanta – 2×10^9 $M^{-1}s^{-1}$, tai yra 10 % difuzijos ribojamo maksimalaus reakcijos greičio (Getzoff et al., 1983). Tokį fermento efektyvumą lemia jo struktūra (1.1 pav.). Fermentas sudarytas iš dviejų identiškų subvienetų, kurių kiekviename yra po β statinę, sudarytą iš antilygiagrečių β klosčių. Dvi leucino aminorūgštys, esančios graikiško rakto motyvą turinčiose kilpose, veikia kaip „kamščiai“ statinės galams užkišti. Cys^{57} ir Cys^{146} sujungti disulfidiniu ryšiu, šis ryšys stabilizuoja natyvią baltymo struktūrą. Metalų jonai lokalizuoti β statinės išorėje. Cu^{2+} yra koordinuojamas keturių histidinų, Zn^{2+} – trijų histidinų ir aspartato, esančių Zn kilpoje (IV β statinės kilpa). Vieno histidino imidazolo žiedas yra bendras ligandas abiems metalams. Zn kilpa kartu su elektrostatine kilpa (VII β statinės kilpa) dalyvauja nukreipiant substratą į aktyvųjį centrą, kur piltuvėlio formos struktūros dugne yra vario jonas (Perry et al., 2010; Sheng et al., 2014). Tokia struktūra lemia aukštą SOD1 lydymosi temperatūrą (92 °C) ir atsparumą denatūrantams (iki 8 M karbamido ir 1 % NDS, Sheng et al. (2014)). Iš viso citozolinė SOD1 sudaro 1–2 % visų centrinės nervų sistemos baltymų (Bunton-Stasyshyn et al., 2014).



1.1 pav. SOD1 erdvinė struktūra. Ruda spalva pažymėtas vario jonas, mėlyna – cinko, paryškintos aminorūgštys, koordinuojančios metalų jonus. Pritaikyta pagal Perry et al. (2010)

Kitos superoksido dismutazės – SOD2 (turinti Mn^{3+} joną aktyviame centre, homotetrame-

ras), randama mitochondrijose. Taip pat į ląstelės išorę sekretuojama SOD3 (tetramerinė Cu, Zn superoksido dismutazė), irgi randama eukariotuose. Ni SOD (tetrameras) randama *Streptomyces* genties bakterijose (Barondeau et al., 2004). Fe joną aktyviajame centre turinčios SOD randamos tik primityviuose organizmuose ir augalų chloroplastuose. Taip pat pastebėta, kad bakterijų ir archėjų SOD gali turėti tiek Fe, tiek Mn joną aktyviame centre ir tinkamai atlikti savo funkciją, todėl dažnai šie fermentai vadinami tiesiog Fe/Mn superoksido dismutazėmis (Miller, 2012). Nepaisant struktūrinių skirtumų, visos SOD atlieka tą pačią funkciją – apsaugo ląsteles nuo reaktyvių deguonies formų poveikio. Taip pat pastebėta, kad SOD1 ir SOD3 turi peroksidazinį aktyvumą (Hink et al., 2002), katalizuodamos vandenilio peroksido virtimą į hidroksilo radikalą.

1.2. Amiotrofinė lateralinė sklerozė

Viena iš amiloidinių neurodegeneracinių ligų yra amiotrofinė lateralinė sklerozė, dar vadinama Lou Gehrig'o liga. Ja sergančių pacientų organizmuose žūva ir savo funkcijos nebeatlieka viršutiniai motoriniai neuronai, esantys motorinėje žievėje. Pirminiai šios ligos simptomai – sunkumas atlikti valingus raumenų judesius (judėti), jaučiamas raumenų silpnumas, ligai progresuojant vis daugiau neuronų žūva, pacientui tampa sunku ryti, kvėpuoti, kalbėti, kol galiausiai žmogus visiškai paralyžuojamas. ALS susergama vidutiniškai esant 55-erių metų (Taylor et al., 2016), o nuo pirmųjų ligos požymių atsiradimo iki mirties praeina 3–5 metai (Peters and Brown Jr, 2015; Zarei et al., 2015). ALS sergančių žmonių intelektas išlieka nepakitęs, tačiau kartu su liga pasireiškia ir kitų psichologinių sutrikimų, tokių kaip nevalingas kalbėjimas ar juokas, asocialus elgesys, požymiai (Cruz, 2018). ALS sirgo tokie žymūs žmonės kaip amerikietis beisbolo žaidėjas Lou Gehrig'as ir anglų fizikas Steven'as Hawking'as.

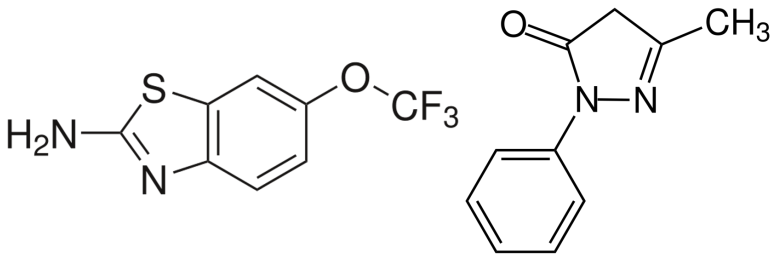
90–95 % atvejų ALS atsiranda spontaniškai, tuo tarpu likusiais 5–10 % atvejų liga paveldima ir yra susijusi su genetinėmis mutacijomis. Atrasta 50 genų, kurių mutacijos siejamos su ALS. Šie genai reikalingi proteostazės ir baltymų taisyklingo susilankstymo palaikymui, RNR stabilumo palaikymui ir metabolizmui, citoskeleto virsmams motoriniuose neuronuose ir autofagijai (Taylor et al., 2016). Pagrindiniai su ALS susiję genai ir jų funkcijos apibendrinti 1.1 lentelėje.

Pagal statistikos duomenis ALS suserga 1,9 žmogaus iš 100 000. 2015 m. pasaulyje šia liga sirgo 222 801 pacientas ir manoma, kad ligonių skaičius 2040 m. dėl visuomenės senėjimo padidės iki 376 674 (Arthur et al., 2016). Kol kas vaistų, visiškai išgydančių ALS, nėra. Pacientams skiriami preparatai yra tik riluzolas (Rilutek®, 1.2 pav. kairėje), kainuojantis 10 000 JAV dolerių pacientui metams ir prailginantis jų gyvenimo trukmę keliais mėnesiais (Fang et al., 2018; Miller et al., 2012) ir 2017 m. FDA patvirtintas edaravonas (Radicava®, 1.2 pav. dešinėje) (Cruz, 2018; Rothstein, 2017). Riluzolas slopina neuromediatoriaus gliutamato išskyrimą iš neuronų, tai vyksta blokuojant įtampos valdomus natrio kanalus gliutamaterginėse neuronų dalyse. Vaistas taip pat blokuoja NMDA receptorius. Toks veikimo pobūdis lemia gliutamato ekscitotoksiškumo sumažinimą ir apsaugo neuronų aksonus nuo degeneracijos (Doble, 1996). Tikslus edaravono veikimo mechanizmas nėra žinomas. Manoma, kad junginys veikia

1.1 lentelė. Su ALS susiję genai ir baltymai (pagal Smith et al. (2017); Taylor et al. (2016))

Genas	Baltymas	Vaidmuo ląstelėje
SOD1	Cu, Zn superoksido dismutazė	Oksidacinio streso mažinimas
VCP	Endoplazminio tinklo ATPazė	Proteostazė
ANG, TARDBP, FUS, C9orf72, HNRNPA1, MATR3	Angiogeninas, TDP-43, FUS, C9orf72, hnRNP A1, matrinas III	Sąveika su RNR
DCTN1, PFN1, TUBA4A	Dinaktino subvienetas I, profilinas I, tubulino α4A grandinė	Citoskeleto virsmai
OPTN, UBQLN2, SQSTM1, TBK1	Optineurinas, ubikvilinas II, sekvestosoma I, Ser-Thr kinazė TBK1	Autofagija
CHCHD10	Spiralių motyvus turintis baltymas	Sąveika su mitochondrijomis
ANXA11	Aneksinas A11	Pūslelių transporto reguliacija

kaip antioksidatorius ir mažina oksidacinį stresą ląstelėse (Cruz, 2018). Deja, abu šie vaistai tik pailgina pacientų gyvenimo trukmę ir švelnina ligos simptomus (Dash et al., 2018; Jaiswal, 2019).

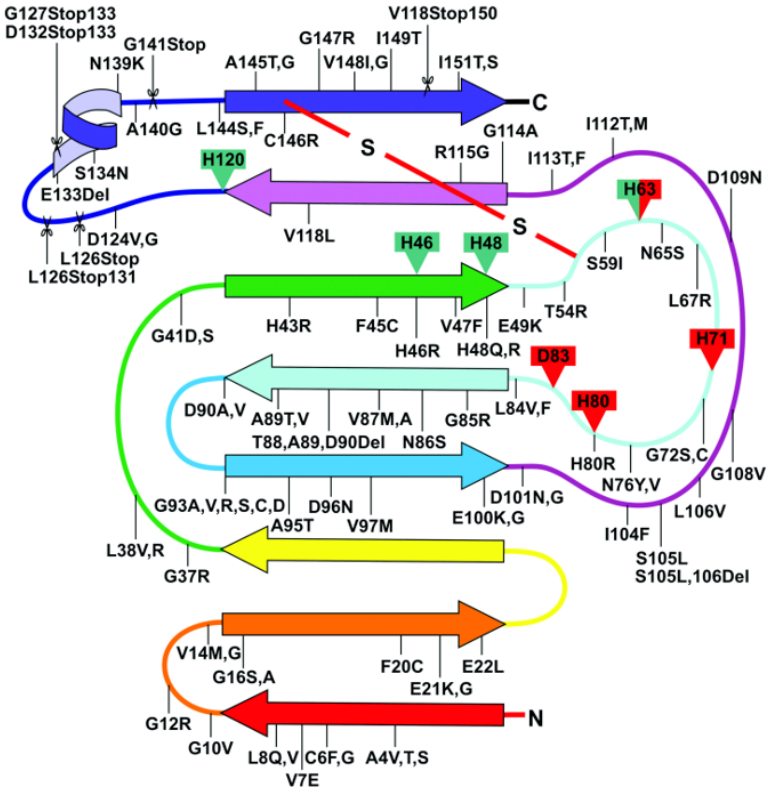


1.2 pav. FDA patvirtinti vaistai ALS gydymui. Kairėje – riluzolo, dešinėje – edaravono struktūrinės formulės

1.2.1. SOD1 vaidmuo ALS

Baltymų agregatai, randami ALS sergančių pacientų audiniuose, dažniausiai sudaryti iš superoksido dismutazės I. 20–25 % paveldimos ALS atvejų susiję su mutacijomis *SOD1* gene, kurių nustatyta virš 180 (Pansarasa et al., 2018; Taylor et al., 2016). Su ALS susijusių SOD1 mutacijų žemėlapis pateiktas 1.3 pav. Ligos fenotipo pasireiškimas nesusijęs su fermento neaktyvumu, kadangi dalį su liga susijusių mutacijų turinčios SOD1 pilnai atlieka savo katalitinę funkciją.

Struktūrą turinčiuose baltymuose labiausiai linkę agreguoti hidrofobiniai regionai yra pa-



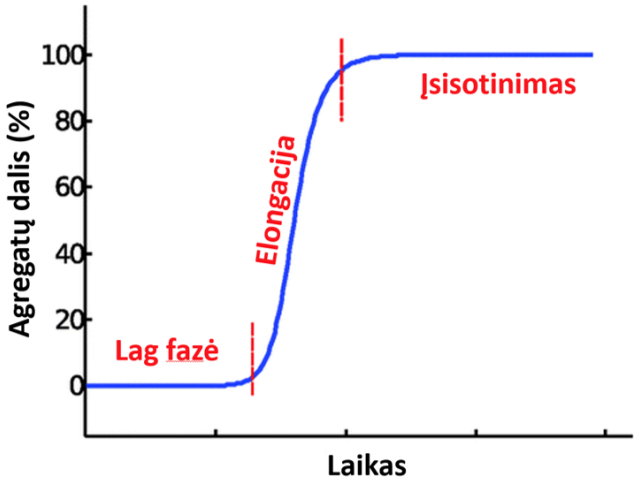
1.3 pav. Su ALS susijusios mutacijos SOD1 gene (pritaikyta pagal Valentine et al. (2005)).

slėpti jų viduje. Toks baltymas pirmiausia turi prarasti savo erdvinę struktūrą (išsivynioti), ir tik tada gali agreguoti į kitokią struktūrą turinčius darinius. Buvo pastebėta, jog kai kurie SOD1 mutantai, praradę Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonus, gali agreguoti į tarpmolekulinę β klostytą struktūrą turinčius filamentus ir tuščiavidurius vamzdelius, sudarytus iš globulinės struktūros nepraradusių baltymų (Banci et al., 2005; Elam et al., 2003). Tokiu atveju visas baltymas neturi išsivynioti, pakanka kelių hidrofobinių segmentų, eksponuojamų į išorę; šie segmentai ir leidžia molekulėms sukibti. Vėliau tokios struktūros persitvarko, virsta oligomerais ir galiausiai fibrilėmis. Laukinio tipo ir metalų jonus turintys SOD1 baltymai į tokius darinius neagreguoja; tai padaryti jiems trukdo elektrostatinės stūmos jėgos tarp elektrostatinės ir cinko kilpų, kurios laukinio tipo ir metalus koordinuojančiame baltyme yra tvirtos struktūros (Elam et al., 2003).

1.3. Amiloidinė agregacija

Baltymai ląstelėje gali įgyti daugybę konformacijų nuo to momento, kai yra susintetinami ribosomose, iki degradacijos. Būdami tam tikros konformacijos, pavyzdžiui, kuomet į išorę eksponuojamos baltymo grandinės dalys, kurios taisyklingai susilanksčiusiame baltyme yra paslėptos jo viduje, jie gali tapti labiau linkusiais agreguoti. Apsaugai nuo nepageidaujamos agregacijos yra skirti šaperonai – kiti baltymai ir jų kompleksai, prisijungiantys prie atidengtų baltymo vietų ir neleidžiantys šioms baltymo grandinės dalims sąveikauti tarpusavyje (Alam et al., 2017).

Amiloidinei baltymų agregacijai aprašyti ir paaiškinti sukurta daug mechanizmų, tačiau visiems jiems būdingi šie esminiai žingsniai. Pirmiausiai kartu sukimba keletas baltymo mo-



1.4 pav. Amiloidinės agregacijos etapai (pritaikyta pagal Arosio et al. (2015))

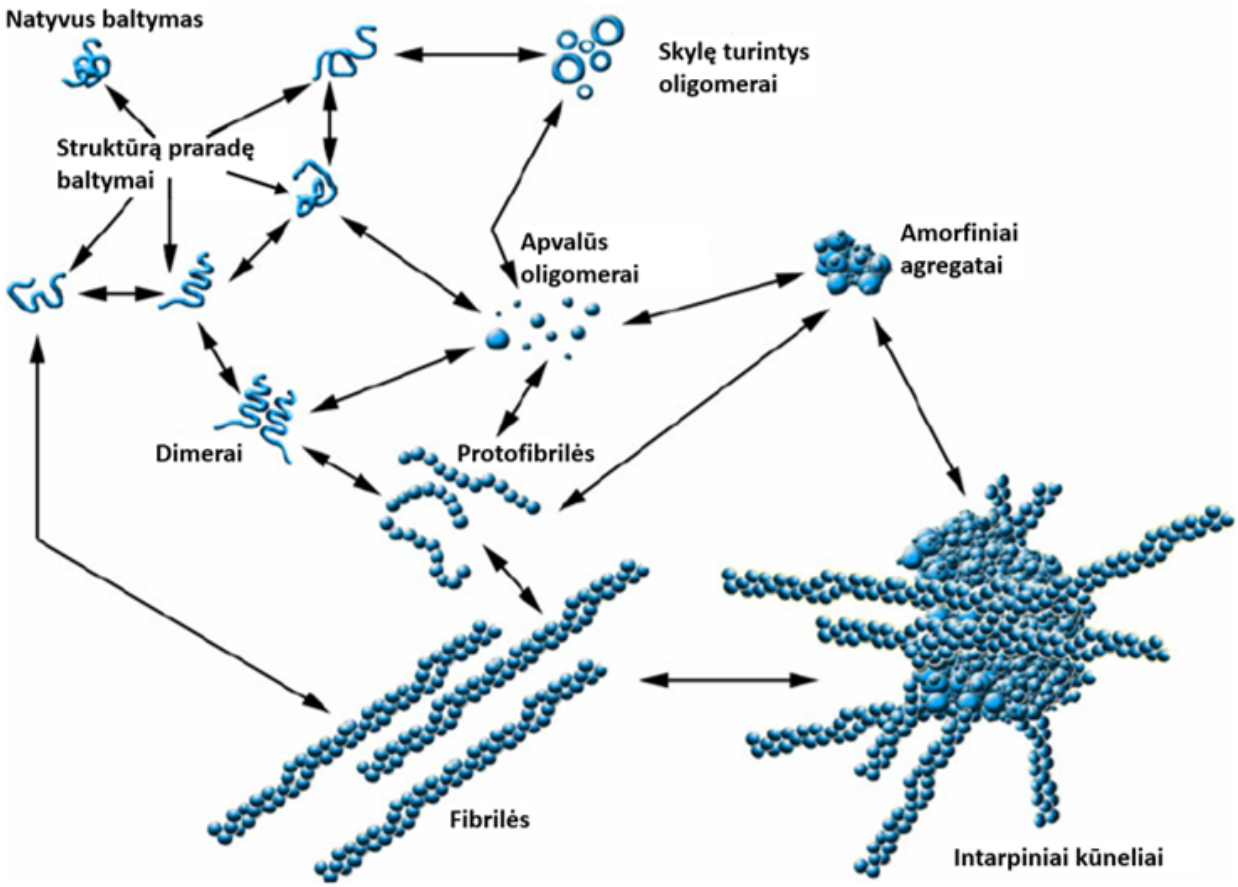
lekulių, sudarydamos bestruktūrius, dalinai struktūrą turinčius ir struktūrizuotus agregatus, kurie susidaro atitinkamai iš bestruktūrių baltymo monomerų, dalinę struktūrą turinčių ir natyvių monomerų. Tokie agregatai yra nestabilūs ir gali lengvai iširti į baltymo monomerus, nes juos jungiančių ryšių yra mažai. Ši stadija trunka ilgiausiai ir *in vitro* tyrimuose yra apibūdinama *lag* laiku (1.4 pav.). Agregacijai vykstant toliau, dariniai persitvarko ir įgyja tvirtesnę β klostytą struktūrą. Šie oligomerai toliau jungia monomerus, didėja, įvyksta persitvarkymas ir esant kritiniam oligomero dydžiui ir struktūrai jis ima didėti ne visu paviršiaus plotu, o ilgėja tik dviem kryptimis, kol galiausiai susidaro tvirta, tvarkinga β klostytą struktūrą turinti amiloidinė fibrilė (agregacijos schema pateikta 1.5 pav.). Šis etapas vadinamas elongacija (1.4 pav.). Įsisotinimo fazė pasiekiama, kai visi galintys agreguoti baltymo monomerai suagreguoja ir susidaro maksimalus fibrilių kiekis. Ne visi oligomerai virsta fibrilėmis; oligomeras gali jungti kitus monomerus ir didėti, neįgydamas jokios griežtos struktūros – taip susidaro amorfiniai agregatai arba agregatai, sudaryti iš natyvių, struktūros nepraradusių baltymų (angl. *native-like assemblies*) (Chiti and Dobson, 2017).

Šiandien žinomi 37 peptidai/baltymai, kurių agregacija yra susijusi su ligomis; 7 iš jų siejami su neurodegeneracinėmis ligomis. Dauguma jų yra maži (iki 100 aminorūgščių), tiek bestruktūriai, tiek struktūrą turintys ir nepasižymi aminorūgščių sekos panašumu (Chiti and Dobson, 2017).

1.3.1. Veiksniai, turintys įtakos baltymų agregacijai

Pagrindiniai veiksniai, skatinantys neurodegeneracinių ligų vystymąsi ir baltymų agregaciją ląstelėje, yra oksidacinis stresas ir mutacijos baltymų polipeptidinėse grandinėse. Oksidacinio streso sąlygomis aminorūgščių šoninės grupės oksiduojamos – dėl to pakinta jų krūviai ir gebėjimas sudaryti ryšius su kitomis aminorūgštimis. Mažiau ryšių savo struktūros palaikymui sudarantis baltymas destabilizuojamas ir yra labiau linkęs agreguoti. Su neurodegeneracinėmis ligomis siejamos mutacijos taip pat turi įtakos baltymo struktūrai ir dažnu atveju jį destabilizuoja (Alam et al., 2017).

Svarbus aplinkos veiksnys, turintis įtakos baltymo stabilumui ir su tuo tiesiogiai susijusiam



1.5 pav. Bendra baltymų agregacijos schema (pritaikyta pagal Lotz and Legleiter (2013))

agregatyvumui, yra pH. Baltymai – amfoterinės medžiagos, turinčios tiek teigiamai, tiek neigiamai įkrautų grupių. Kai aplinkos pH lygus baltymo pI, teigiamų ir neigiamų krūvių suma baltymo molekulėje lygi 0, palengvėja baltymo molekulių tarpusavio sąveika ir lengviau vyksta agregacija.

Baltymai taip pat lengviau agreguoja esant didelei jų koncentracijai. Fiksuotame tirpalo tūryje esant daugiau molekulių, jos susiduria dažniau – taip padidėja tikimybė formuoti agregatus. Svarbus veiksnys – temperatūra. Esant aukštai temperatūrai, baltymas denatūruoja; į išorę labiau eksponuojamos hidrofobinės baltymo dalys. Šių dalių eksponavimas lemia greitesnę baltymo agregaciją. Druskos taip pat turi įtakos baltymo stabilumui; esant aukštoms druskų koncentracijoms, didelė dalis tirpiklio panaudojama druskų jonų tirpinimui. Tokiu būdu sumažinamas baltymo tirpumas ir jis tampa labiau linkusiu agreguoti (Alam et al., 2017).

1.3.2. Amiloidinės fibrilės

Amiloidinės fibrilės yra 7–13 nm pločio, kelių mikrometrų ilgio dariniai, kurių skiriamasis bruožas – tarpmolekulinė β klostyta struktūra (1.6 pav.), esanti išilgai fibrilės ašies. Išilgai fibrilės ašiai aminorūgščių šoninės grupės susijungusios vandeniliniais ryšiais, kurie susidaro tarp skirtingų polipeptidinių grandinių; atstumas tarp jų – 4,7 Å. Fibrilės tvirtumą statmenai jos ašiai palaiko įvairaus tipo (elektrostatiniai, vandeniliniai, Van der Valso, hidrofobinė sąveika) ryšiai tarp peptidinių grandinių šoninių grupių. Atstumas tarp jų – 10 Å. Vieną fibrilę sudaro

1–8 protofilamentai. Tokia struktūra lemia didelį amiloidinių fibrilių atsparumą denatūrantams, proteinazėms, temperatūrai ir kitiems veiksniams (Chiti and Dobson, 2017; Eisenberg and Sawaya, 2017).



1.6 pav. Amiloidinių fibrilių struktūra (pritaikyta pagal Sawyer et al. (2012))

1.4. Vaistų kūrimo principai amiloidinėms ligoms gydyti

Neurodegeneracinėms ligoms gydyti pasitelkiamos pačios įvairiausios strategijos, nuo ląstelių terapijos (Kumar et al., 2017; Sugaya and Vaidya, 2018) iki vaistų mažų molekulių pavidalu, kurie mažina agregatyvaus baltymo raiškos lygį, stabilizuoja natyvios struktūros baltymus, lengvina netaisyklingą struktūrą įgijusių baltymų skaidymą ar stabdo patį agregacijos procesą (Alam et al., 2017; Porat et al., 2006). Vis dažniau kandidatų vaistams ieškoma tarp jau patvirtintų vaistų kitoms ligoms gydyti – tai gerokai atpigina klinikinius tyrimus ir pagreitina vaisto patekimą į rinką.

Iš mažų molekulių grupės medžiagų didelį potencialą turi polifenoliai – natūraliai gamtoje randami junginiai, kurių gausu raudoname vyne, žaliojoje arbatoje, vynuogėse. Šiai junginių grupei priklauso flavonoidai, kurkuminas, rozmarinų rūgštis, epigalokatechin-3-galatas, resveratrolis, tanino rūgštis ir kiti. Manoma, kad šios grupės junginiuose esantys aromatiniai žiedai sąveikauja su baltymų aromatinėmis aminorūgštimis, tokiu būdu trukdydami fibrilių susidarymui. Be to, polifenoliai žinomi kaip antioksidatoriai ir laisvųjų radikalų gaudyklės, mažinančios reaktyviųjų deguonies formų poveikį ląstelėms (Porat et al., 2006).

Kitos medžiagos, kuriose įžvelgtas potencialas neurodegeneracinių ligų gydymui, yra su metalais kompleksus sudarantys junginiai (pvz. desferioksaminas), ftalocianinai, molekuliniai pincetai, įvairios nanodalelės (pvz. Fe_3O_4), trumpi peptidai (Alam et al., 2017). Taip pat bandoma pritaikyti antikūnų technologijas skiepams sukurti ir netaisyklingą struktūrą įgijusių baltymų ir oligomerų šalinimui pasyvios ir aktyvios imunizacijos būdu (Godyn et al., 2016; O'Hara et al., 2018).

Taip pat ieškoma junginių, veikiančių ne agregatyvius baltymus, o kitus, susijusius su signalo perdavimu nervų sistemoje arba dalyvaujančius agreguojančio baltymo sintezės kelyje (Godyn et al., 2016; O'Hara et al., 2018).

Nepaisant dedamų didžiulių pastangų vaistų nuo neurodegeneracinių ligų sukūrimui, dauguma vaistų, puikiai pasirodžiusių II klinikinių tyrimų fazėje, nebėra efektyvūs atliekant III klinikinių tyrimų fazės tyrimus (95 %). Taip yra dėl to, kad vis dar prastai suprantama šio tipo ligų patogenezė ir, norint išgydyti pacientus, potencialus vaistas greičiausiai turi būti nukreiptas į kelis skirtingus taikinius (Godyn et al., 2016).

1.5. SOD1 agregacijos slopikliai

Tyrimų, skirtų efektyvių SOD1 agregacijos slopiklių paieškai, literatūroje aprašoma nemažai. Ieškant efektyvių slopiklių, taikomos pačios įvairiausios sistemos ir metodai – nuo kompiuterinio modeliavimo, *in vitro* agregacijos kinetikos stebėjimo iki rentgenostruktūrinės analizės ar aukšto našumo tyrimų *in vivo* sistemose.

1.2 lentelė. Polifenoliai, darantys įtaką SOD1 agregacijai

Junginys	**Veikimo principas**	**Metodai**	**Baltymas**	**Šaltinis**
Kurkuminas	Stipriai jungiasi prie prefibrilinių agregatų, silpnai – prie natyvaus baltymo	*In vitro* kinetika, AFM, TEM, ATR-FTIR, DLS, kompiuterinis modeliavimas	WT	Bhatia et al. (2015)
Epigalokatechin-3-galatas	Stabilizuoja baltymo tretinę struktūrą	Kompiuterinis modeliavimas	WT, L84F	Srinivasan and Rajasekaran (2017)
11 flavonoidų	Stabilizuoja baltymo dimerą	MS, kompiuterinis modeliavimas, *in vitro* kinetika	WT	Zhuang et al. (2016)

Vaistų ieškoma tarp įvairių klasių junginių – nuo polifenolių (1.2 lentelė), azotinių bazių ir tarp jau rinkoje esančių vaistų (1.3 lentelė). Pasirenkami skirtingi taikiniai – dauguma tyrėjų mano, kad norint stabdyti agregaciją, reikia stabilizuoti baltymo dimerą (Nowak et al., 2010; Ray et al., 2005; Zhuang et al., 2016), kadangi skilimas į monomerus yra tiesiogiai susijęs su baltymo destabilizavimu, natyvios struktūros praradimu ir didesniu polinkiu agreguoti. Šiam požiūriui išsakoma kritika, nes kai kurie SOD1 mutantai agreguoja vienodu greičiu būdami tiek monomero, tiek dimero formos (Wright et al., 2013).

Daugumoje literatūros šaltinių akcentuojama, kad tirtas junginys ar jų grupė turi didelį potencialą tapti vaistu. Vis dėlto reikia atkreipti dėmesį, kokiais metodais atliktais tyrimais remiamasi sakant tokį teiginį. Kai kuriuose straipsniuose, ypač tuose, kuriuose aprašytas daugybės junginių testavimas, išvados daromos remiantis vos keliais metodais (Anzai et al., 2016; Yerbury et al., 2013). Kai kuriuose šaltiniuose atliekama išsami baltymo su prisijungusiu slopikliu struktūrinė analizė, tačiau pamirštama parodyti kinetinius duomenis – ar iš tikrųjų esant

1.3 lentelė. Kiti junginiai, darantys įtaką SOD1 agregacijai

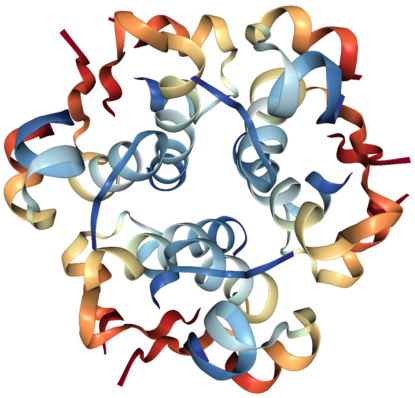
Junginys	**Veikimo principas**	**Metodai**	**Baltymas**	**Šaltinis**
15 neatskleistos struktūros junginių	Stabilizuoja baltymo dimerą	Kompiuterinis modeliavimas, *in vitro* kinetika, atsparumo denatūrantui testas	WT, A4V, G93A, G85R, A4V/V7F/ V148F, G93A/V7F/ V148F	Ray et al. (2005)
Izoproterenolis, 5-fluoruridinas	Jungiasi prie baltymo	SEC-SAXS, XRD, CD, atsparumo denatūrantui testas	WT, A4V, I113T, L38V, H48Q	Wright et al. (2013)
640 FDA patvirtintų vaistų	Dalis junginių sąveikauja su išvyniotu baltymu	DSC, MS, *in vitro* kinetika, PAGE	G37R	Anzai et al. (2016)
αB-kristalinas ir Hsp27	Jungiasi prie baltymo ir agregatų	*In vitro* kinetika, SEC	WT, G93A	Yerbury et al. (2013)
>50 000 junginių biblioteka, pirimidin-2,4,6-trionai, cikloheksan-1,3-diono vediniai	Didina ląstelių gyvybingumą	Citotoksiškumo testas PC12-G93A-YFP ląstelių linijai, SOD1 G93A pelėms	G93A, G85R	Benmohamed et al. (2011); Xia et al. (2011); Zhang et al. (2012)
14 junginių azauracilo ir uracilo pagrindu	Stabilizuoja baltymo dimerą	Kompiuterinis modeliavimas, atsparumo denatūrantui testas, CD	WT, A4V	Nowak et al. (2010)
Cisplatina	Jungiasi prie Cys111 ir tirpina agregatus	BMR, XRD, NDS-PAGE, DSF, SEC, *in vitro* kinetika, toksiškumo testas NSC-34 ląstelių linijai	WT, G93A	Banci et al. (2012)

junginiui baltymas agreguoja lėčiau ar visai neagreguoja (Nowak et al., 2010; Wright et al., 2013). Taikomų metodų siaurumas, prastas supratimas apie molekulinius virsmus agreguojant baltymams ir žinių trūkumas apie tikrąsias ALS ligos priežastis ir skirtingų agregatų vaidmenį

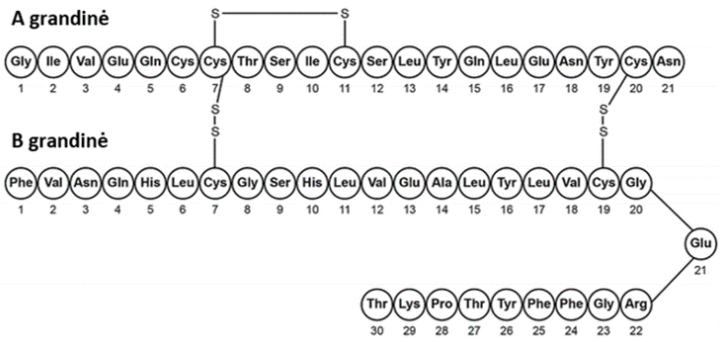
ligos patologijoje lemia tai, jog vis dar neturime vaisto, galinčio saugiai ir efektyviai išgydyti šią ligą.

1.6. Insulinas

Žmogaus insulinas, kasos β ląstelėse gaminamas 5,8 kDa dydžio peptidas, sudarytas iš A ir B grandinių, sujungtų dviem tarpgrandininiais ir vienu vidugrandininiu disulfidiniu ryšiu (1.7b pav.). Insulino heksamero struktūra pateikta 1.7a pav. Organizme insulinas veikia kaip signalinis peptidas, skatinantis gliukozės patekimą į ląsteles ir greitinantis glikogeno sintezę kepenyse.



(a) Insulino heksamero erdvinė struktūra. PDB kodas: 5MAM

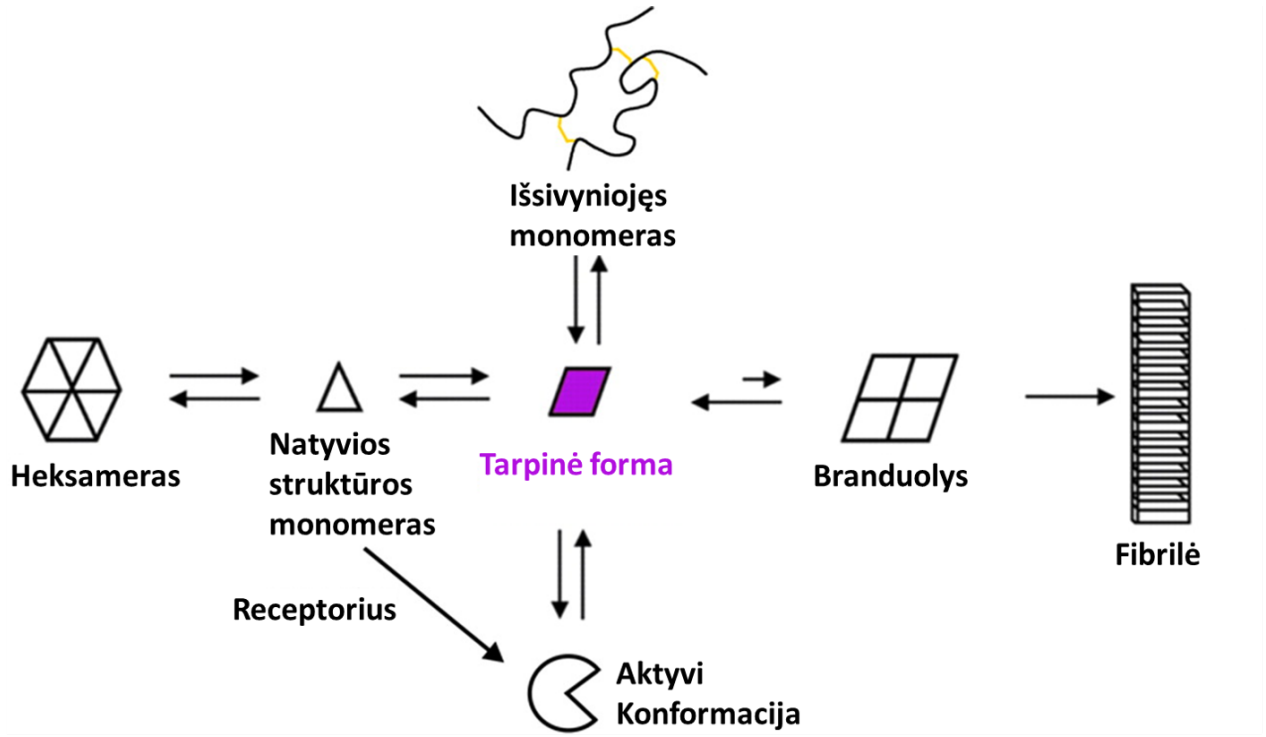


(b) Insulino struktūra. Pritaikyta pagal Hilgenfeld et al. (2014)

1.7 pav. Žmogaus insulino struktūros

Insulinas susijęs su injekcine amiloidoze – retais atvejais pasireiškiančia diabetu sergančių žmonių, besileidžiančių insuliną, komplikacija. Dalis insulino, suleisto po oda, suleidimo vietoje suformuoja β klostes turinčias amiloidines sankaupas ir nepatenka į kraujotakos sistemą, tad pacientams, kuriems pasireiškia ši komplikacija, reikalingos didesnės insulino dozės. Amiloidinių sankaupų vietoje kyla uždegimas; į fibrilių tinklą taip pat įtraukiami kiti baltymai. Kaip tiksliai vyksta šių sankaupų formavimasis nėra ištirta dėl šios komplikacijos retumo. Poodinės insulino sankaupos šalinamos chirurginiu būdu; norint užkirsti kelią komplikacijai siūloma reguliariai keisti vietą, į kurią leidžiamas insulinas (Gupta et al., 2015).

Vis dėlto amiloidinių ligų srityje insulinas daugiausia naudojamas kaip modelinis baltymas, kurio agregacijos mechanizmą skirtingose aplinkos sąlygose siekiama suprasti. Manoma, kad šio baltymo agregacijos mechanizmo supratimas padės nustatyti ir kitų baltymų, siejamų su neurodegeneracinėmis ligomis, agregacijos mechanizmą. Apibendrinta insulino agregacijos mechanizmo schema pateikta 1.8 pav. Kasos β ląstelėse insulinas sudaro heksamerinį kompleksą su Zn^{2+} jonais. Heksamerui skilus į monomerus, šie dalinai išsivynioja, keli monomerai suformuoja agregacijos branduolį, kuris savo ruožtu jungia kitus monomerus ir taip susiformuoja amiloidinės fibrilės (Yang et al., 2010).



1.8 pav. Insulino agregacijos mechanizmas (pritaikyta pagal (Yang et al., 2010))

1.7. Insulino agregacijos slopikliai

Literatūroje yra aprašyta tyrimų, kurių tikslas – rasti efektyvų insulino agregacijos slopiklį. Tiriamos pačios įvairiausios medžiagos, pradedant polifenoliais, baigiant biologinį aktyvumą turinčiomis molekulėmis.

Parodyta, kad ektoinas, trechalozė ir citrulinas, kurie randami streso sąlygomis gyvenančiuose mikroorganizmuose, efektyviai slopina insulino agregaciją *in vitro* (Arora et al., 2004). Tai aiškinama tuo, kad šios molekulės didina vandens paviršiaus įtempį; šiomis sąlygomis baltymui palankiau išlikti natyvios struktūros, pilnai solvatuotam ir turėti mažesnį paviršiaus plotą, nes jo išsivyniojimas (paviršiaus ploto didėjimas) ir hidrofobinių sričių atidengimas yra susiję su aukštesne sistemos energija. Taip pat manoma, kad streso metu ląstelėje šios molekulės stabilizuoja baltymus prisijungdamos prie hidrofilinių paviršiaus grupių. Deja, šių junginių veikimas aiškinamas tik pagal bendro pobūdžio tirpalų savybių pakitimus, o tokiems pakitimams atsirasti reikia pakankamai aukštų medžiagų koncentracijų (Melo et al., 2001). Nėra atlikta jokių struktūrinių tyrimų, įrodančių, kad šie junginiai tiesiogiai veikia agregacijos procesą ar yra specifiniai būtent β klostytos struktūros susidarymo slopikliai.

Yra ieškoma medžiagų, slopinančių insulino agregaciją mažesnėmis koncentracijomis. Vienos iš tokių – trumpi peptidai, kurie jungiasi prie tam tikrų baltymo regionų ir trikdo baltymo monomerų susijungimą į amiloidines fibriles (Gibson and Murphy, 2006; Siddiqi et al., 2018).

Insulino agregacijos slopiklių ieškota ir polifenolinių junginių klasėje. Iš tirtų 265 flavonoidų dalis pasižymėjo stipriu agregaciją slopinančiu efektu, tačiau su šiais junginiais tolimesni tyrimai neatlikti ir tikslaus poveikio agregacijos mechanizmui nebandyta išsiaiškinti (Malisauskas et al., 2015). Potencialas slopinti insulino agregaciją įžvelgtas ir polifenolių oksidacijos produktuose

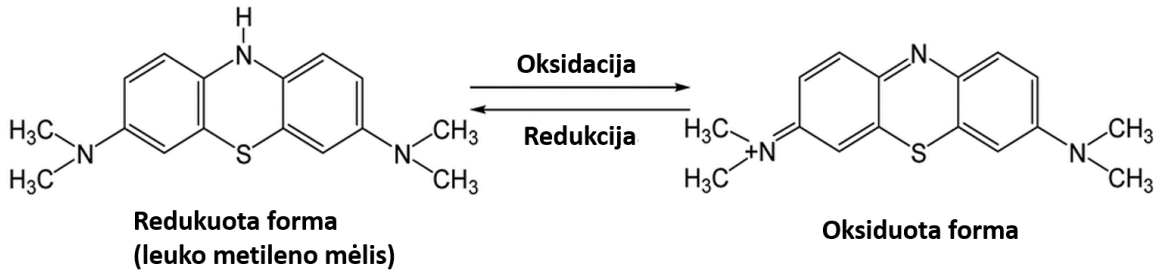
chinono dariniuose (Gong et al., 2014).

Taip pat tirtas glikoakridinų (Van Vuong et al., 2015) ir aromatinį žiedą turinčių junginių poveikis (Levy-Sakin et al., 2009). Abiejuose tyrimuose nustatytas agregacijos slopinimo efektas, tačiau nemažai klausimų kelia pasirinktais tyrimo metodais gautų rezultatų vertinimas. Vis dėlto teigiama, kad junginių veikimas paremtas nepoline sąveika.

1.8. Metileno mėlis

1.8.1. Junginio panaudojimas, fizikinės ir farmakokinetinės savybės

Metileno mėlis – pirmas pilnai chemiškai susintetintas vaistas. Junginio pagrindą sudaro fenotiazino žiedai, prie kurių prijungtos dvi metilamino grupės; junginys gali būti oksiduotos ir redukuotos formos (1.9 pav.). 1891 m. Paul'as Guttmann'as ir Paul'as Ehrlich'as pradėjo naudoti šį junginį maliarijos gydymui, vėliau jis buvo panaudotas kitų vaistų sintezei. Dabar šis vaistas naudojamas methemoglobinemijai gydyti, šlapimo takų infekcijų prevencijai, nervinių audinių vizualizacijai operacijų metu, priešvėžinio vaisto ifosfamido sukeltam neurotoksiškumo efektui mažinti, taip pat kaip priešnuodis apsinuodijusiems cianidu (Oz et al., 2011; Schirmer et al., 2011). Junginys naudojamas ir kitose srityse, pavyzdžiui, akvariumų dezinfekcijai ir kaip fotosensitizatorius vėžio terapijoje.



1.9 pav. Metileno mėlio formos

Oksiduotos formos metileno mėlis atrodo mėlynas; tuo tarpu redukuotos formos junginys, dar vadinamas leuko metileno mėliu, yra bespalvis. Esant fiziologiniam pH, metileno mėlis yra pusiausvyros formos tarp oksiduotos ir redukuotos; šią pusiausvyrą palaiko glutationas, NAD(P)H ir deguonis. Leuko metileno mėlis neturi krūvio, tad gali pasyviai difunduoti per ląstelių membraną; patekęs į oksidacinę aplinką, junginys oksiduojamas, įgyja teigiamą krūvį ir nebegali laisvai difunduoti iš ląstelės. Tokiu principu junginys patenka į eritrocitus, kuriuose redukuoja hemoglobine esantį Fe^{3+} joną ir atstato hemoglobino gimiringumą deguoniui iš padidėjusio į normalų methemoglobinemijos ligos atveju (Oz et al., 2011).

Metileno mėlis yra azoto sintazės, monoamino oksidazės A, įvairių acetilcholino esterazių, disulfido reduktazių ir guanilato ciklazės slopiklis (van Bebber et al., 2010).

Metileno mėlio farmakokinetinės savybės gerai žinomos. Tipinė vaisto dozė 200 mg/dienai, skilimo puslaikis žmogaus organizme yra 10 valandų, 73 % per burną suvartoto vaisto patenka į kraujo sistemą. Vaistas pereina kraujo-smegenų barjerą (Schirmer et al., 2011). Per burną

vartojamo metileno mėlio medianinė mirtina dozė LD_{50} yra 1,180 mg/kg žiurkėms ir 3,500 mg/kg pelėms (Oz et al., 2011).

1.8.2. Taikymas amiloidinių ligų gydymui

Neseniai įžvelgtas metileno mėlio potencialas neurodegeneracinių ligų gydymui. Pastebėta, kad metileno mėlis slopina τ baltymo, amiloido β, hantingtino ir TDP-43 agregaciją.

TDP-43 (angl. *transactivation response DNA binding protein*) – su DNR sąveikaujantis 43 kDa dydžio baltymas, kurio pastovi raiška būtina ląstelių išgyvenamumui. TDP-43 dalyvauja genų raiškos reguliacijoje, jis svarbus alternatyviam splaisingui ir iRNR stabilumui palaikyti. TDP-43 agregacija į amiloidines fibriles siejama su amiotrofine lateraline skleroze, Alzheimerio ir Parkinsono ligomis (Cook et al., 2008). Parodyta, kad vos 0,05 µM metileno mėlio sumažino TDP-43 agregatų kiekį 50-čia procentų SH-SY5Y linijos ląstelėse (Yamashita et al., 2009). Junginys taip pat atstato motorinių neuronų funkciją zebražuvių *D. rerio* ir nematodų *C. elegans* ALS ligos modeliuose (Vaccaro et al., 2013, 2012).

Hantingtono liga – dar viena neurodegeneracinių ligų grupei priklausanti liga, kuria sergančių pacientų smegenyse amiloidinius agregatus sudaro baltymas hantingtinas, turintis neįprastai ilgą poligliutamininę seką N-gale. Šiai ligai gydyti taip pat intensyviai ieškoma vaistų ir yra parodytas gydantis metileno mėlio poveikis ligos gyvūnų modeliuose. Metileno mėlis didina pirminių neuronų kultūros išgyvenamumą, mažina hantingtino agregaciją *in vitro*, *Drosophila melanogaster* modelyje ir R6/2 linijos pelėse. Įdomu tai, kad metileno mėlis slopino hantingtino agregaciją *in vitro* net esant reakcijos pradžioje pridėtų agregatų. Tačiau nėra aišku, kokiu būdu jis veikia – ar destabilizuodamas agregatus, ar darydamas įtaką monomero-agregatų pusiausvyrai. Taip pat pastebėta, kad esant metileno mėliui, *Drosophila melanogaster* ligos modelyje susidaro mažesnio dydžio agregatai ir jų yra mažiau (Sontag et al., 2012).

τ baltymas – mikrovamzdelius stabilizuojantis baltymas, kurio agregacija į neurofibrilinius tinklus siejama su Alzheimerio, Parkinsono ir grupe kitų ligų, bendrai vadinamų tauopatijomis (Guo et al., 2017). Nustatyta, kad metileno mėlis mažina netirpių agregatų kiekį ir slopina τ baltymo agregaciją *in vitro* esant 2–30 µM IC_{50} (junginio koncentracija, kuriai esant agregacija slopinama 50 %) vertei, priklausomai nuo baltymo izoformos (Akoury et al., 2013; Taniguchi et al., 2005). Taip pat parodyta, kad metileno mėlis veikia kaip nespecifinis tiolinių grupių oksidatorius. Junginys veikia kaip tarpininkas, generuojantis ROS, kurios ir oksiduoja cisteinų tiolines grupes į sulfeno, sulfino ir sulfongrupes (Akoury et al., 2013). Toks modifikuotas baltymas nebeagreguoja į fibriles (Crowe et al., 2013). Siūlomas ir kitas metileno mėlio veikimo mechanizmo aiškinimas – junginys blokuoja τ baltymo monomerų sąveiką per pasikartojančius domenus (Wischik et al., 1996). Pelių ligos modeliuose parodyta, kad metileno mėlis atrankiai skatina neuronų autofagiją, tokiu būdu mažindamas τ baltymo kiekį (Congdon et al., 2012), stabdo agregatų plitimą (Hosokawa et al., 2012) ir mažindamas oksidacinį stresą apsaugo nervų sistemą (Stack et al., 2014).

Amiloidas β – 36–42 aminorūgščių dydžio peptidas, kurio amiloidiniai agregatai randami Alzheimerio liga sergančių žmonių smegenyse. Keliuose tyrimuose parodyta, kad metileno mėlis

turi įtakos ir jo agregacijai (Necula et al., 2007; Taniguchi et al., 2005). Necula et al. (2007) tyrime parodyta, jog junginys geba slopinti Aβ oligomerizaciją, skatindamas jo fibrilizaciją. Toks veikimo pobūdis atrodo perspektyvus vaistų kūrimo kontekste, nes žinoma, jog Aβ fibrilės yra mažiau toksiškos ląstelėms nei oligomerai. Tad junginys, keisdamas šio baltymo agregacijos pobūdį, galėtų sulėtinti toksiškų agregatų susidarymą.

Kita vertus, literatūroje galima rasti ne vieną tyrimą, kuriame metileno mėlis neturi teigiamo poveikio gyvūnų išgijimui/ligos simptomų sumažėjimui. Metileno mėlis sumažino agregatų kiekį Hantingtono ligos zebražuvių modelyje, tačiau neturėjo įtakos jų išgyvenamumui. Junginio neveiksnumas nustatytas ir frontotemporalinės demencijos (su τ baltymo agregacija susijusi liga) ligos modelyje (van Bebber et al., 2010). Metileno mėlis nesugebėjo išgydyti ir Alzheimerio liga sergančių pelių, kai vaistas buvo duodamas atsiradus pirmiesiems ligos simptomams. Tačiau teigiamas junginio efektas tos pačios linijos pelių sveikatai ir išgyvenamumui pastebėtas tais atvejais, kai vaistas buvo duodamas Alzheimerio ligos prevencijai, anksčiau nei pasirodo pirmieji ligos požymiai (Hochgräfe et al., 2015). Gali būti, jog tyrimuose su ligos fenotipą turinčiais gyvūnais buvo naudojamos nepakankamos junginio dozės arba junginys tiesiog yra nepajėgus sustabdyti ligos progresavimą jai prasidėjus. Nepaisant prieštaringų tyrimų rezultatų, su redukuotos formos metileno mėliu buvo atliekami III fazės klinikiniai tyrimai Alzheimerio ligai gydyti (Gauthier et al., 2016; Wilcock et al., 2017). Šių tyrimų rezultatai nebuvo tenkintini ir vaistas nebuvo patvirtintas. Manoma, kad neurodegeneracinėms ligoms gydyti dar nėra sukurta vaistų dėl to, kad nepilnai suprantama neurodegeneracinių ligų patologija ir vaistų ieškoma pasirinkus netinkamus taikinius. Minėtuose tyrimuose metileno mėlis pasirinktas kaip junginys, slopinantis fibrilizaciją ir bendrą agregatų kiekį, tačiau gali būti, kad ligų priežastis yra ne agregatų susidarymas, o kiti ląsteliniai vyksmai.

1.8.3. Metileno mėlis ir SOD

Tyrimų, atliktų su SOD1 ir metileno mėliu, literatūroje aprašyta vos keletas. *In vitro* tyrimų su SOD1 ir šiuo junginiu nėra atlikta; pavyko rasti tik *in vivo* studijas. Visose jose tikrintas metileno mėlio veikimas SOD1 G93A mutaciją turinčiose pelėse. G93A – viena iš dažniausių su ALS susijusių mutacijų SOD1 baltyme; baltymas, turintis šią mutaciją, yra itin agregatyvus.

Lougheed and Turnbull (2011) aprašė tyrimą, kurio metu maitino SOD1 G93A peles didžiausia šalutinių efektų nesukeliančia 25 mg/kg/dienai metileno mėlio doze. Tyrime buvo naudojamos 8–15 pelių vienam tyrimui. Deja, pastebėtas tik statistiškai nereikšmingas ligos pradžios atitolinimas.

Dibaj et al. (2012) tikrino metileno mėlio įtaką uždegimo smegenyse vystymuisi ir neuronų žūčiai SOD1 G93A pelėse. Nustatyta, kad junginys slopina mikroglijos aktyvaciją, tad uždegiminis atsakas yra mažesnis. Įdomu tai, kad vėlesnė ligos pradžia ir vėlesnis svorio kritimas pastebėtas tose pelėse, kurioms buvo duodama 3–10 mg/kg/dienai metileno mėlio dozė. Didesnę dozę (30–100 mg/kg/dienai) gavusios pelės ALS susirgdavo panašiu metu kaip vaisto negavusios. Vis dėlto, metileno mėlio vartojimas neprailgino gyvenimo trukmės nei vienai pelių grupei. Remiantis šiais rezultatais daroma išvada, kad metileno mėlis turi tik bendro pobū-

džio teigiamą efektą nervų sistemai, didina neuronų išgyvenamumą, mažina uždegimą, tačiau iš esmės ligos negydo.

Audet et al. (2012) taip pat tikrino metileno mėlio sugebėjimą padidinti SOD1 G93A pelių išgyvenamumą, kai jis vartojamas vienas arba su neuroprotekciškai veikiančiomis ličio druskomis. Šis tyrimas nuo aukščiau minėto skyrėsi tuo, kad buvo duodamos mažesnės metileno mėlio dozės (1–10 mg/kg/d.) – tai yra dozės, artimos realioms dozėms (0,5–2,5 mg/kg/d.), leidžiamoms žmonėms siekiant išgydyti kitas ligas (1.8.1 skyrius). Taip pat vaistu pradedama šerti ne 45, kaip tai darė Dibaj'us ir kolegos, o 90 dieną, prieš pat ligos požymių atsiradimą. Deja, metileno mėlis nesumažino netirpių SOD1 agregatų SOD1 G93A pelėse kiekio ir aksonų nykimo, taip pat neprailgino pelių gyvenimo trukmės.

Visi trys minėti tyrimai buvo paremti tuo, kad metileno mėlis turėjo gydantį efektą TDP-43 ALS ligos modeliuose (1.8.2 skyrius), tad rezultatai (teigiamo poveikio nebuvimas), gauti su SOD1 G93A pelėmis, stebina. Vieni autoriai sieja tai su netinkamu ligos modeliu (Lougheed and Turnbull, 2011). Jau anksčiau pastebėta, kad tarp SOD1 G93A pelių, gimusių skirtingose vadose arba išvestų naudojant skirtingus metodus, ALS progresavimas ir baigtis yra labai skirtingi. Siekiant išvengti atsitiktinių rezultatų, tyrimams reikia naudoti daugiau gyvūnų ir juos griežtai atrinkti pagal vadą, lytį ir kitus veiksnius. Taip pat manoma, kad SOD1 G93A ligos modelis netinkamas dėl itin greito ir nevaldomo ligos progresavimo. Gali būti, jog tokiame modelyje vaistas paprasčiausiai yra per silpnas veikti, kai suleidžiamas netoksiškomis dozėmis, tačiau esant kitam ligos modeliui (pvz. TDP-43) jis spėja suveikti. Be to, visuomet išlieka vaisto vartojimo pradžios laiko ir naudojamų vaisto dozių efektyvumo klausimas, nes šie parametrai buvo parenkami remiantis skirtingais šaltiniais ir kriterijais (Audet et al., 2012; Dibaj et al., 2012; Lougheed and Turnbull, 2011).

1.8.4. Metileno mėlio veikimas nervų sistemoje

Metileno mėlis nuo seno naudojamas nervinio audinio dažymui operacijų metu; patekus į organizmą, jo koncentracija smegenyse tampa 10–20 kartų didesnė nei kraujotakos sistemoje. Nervų sistemos gimininguma šiam junginiui nėra iki galo paaiškintas, tačiau manoma, kad metileno mėlis į nervines ląsteles patenka panašiu principu kaip ir į eritrocitus. Neuronų plazminėje membranoje esanti reduktazė paverčia oksiduotą junginio formą į krūvio neturinčią redukuotą; taip molekulė tampa lipofiliška ir gali kirsti plazminę membraną. Patekęs į ląstelės vidų, leuko metileno mėlis oksiduojamas ir laisvai iš jos išeiti nebegali.

Esant didelei metileno mėlio koncentracijai junginys kaupiasi nervinių skaidulų galuose ir sutrikdo signalo perdavimą – tai lėmė junginio panaudojimą anestezijai, vietiniam skausmo ir niežulių gydymui.

Metileno mėlis daro įtaką įvairių jonų kanalų ir transporterių veiklai – pakinta gliukozės, H^+ pernaša; veikiami įtampos reguliuojami Na^+ jonų kanalai ir Ca^{2+} reguliuojami K^+ kanalai, tad veikiant metileno mėliu lengviau sužadinami neuronai.

Nustatyta, kad metileno mėlis kaupiasi mitochondrijose, sąveikauja su elektronų pernašos grandine ir palengvina elektronų pernašą ant deguonies. Taip pat veikia kaip antioksidatorius,

slopinantis superoksido jonų susidarymą ir veikia neuroprotekciškai hipoksijos sąlygomis (Oz et al., 2011).

1.9. Metodai amiloidinei agregacijai tirti *in vitro*

Amiloidinei agregacijai tirti naudojami įvairūs biofizikiniai metodai, tokie kaip fluorescencinė, infraraudonųjų spindulių, apskritiminio dichroizmo spektroskopija, elektroninė, atominės jėgos mikroskopija ir kiti. Populiariausias metodas agregacijos kinetikai stebėti yra fluorescencinė spektroskopija naudojant įvairius išorinius dažus (1.4 lentelė).

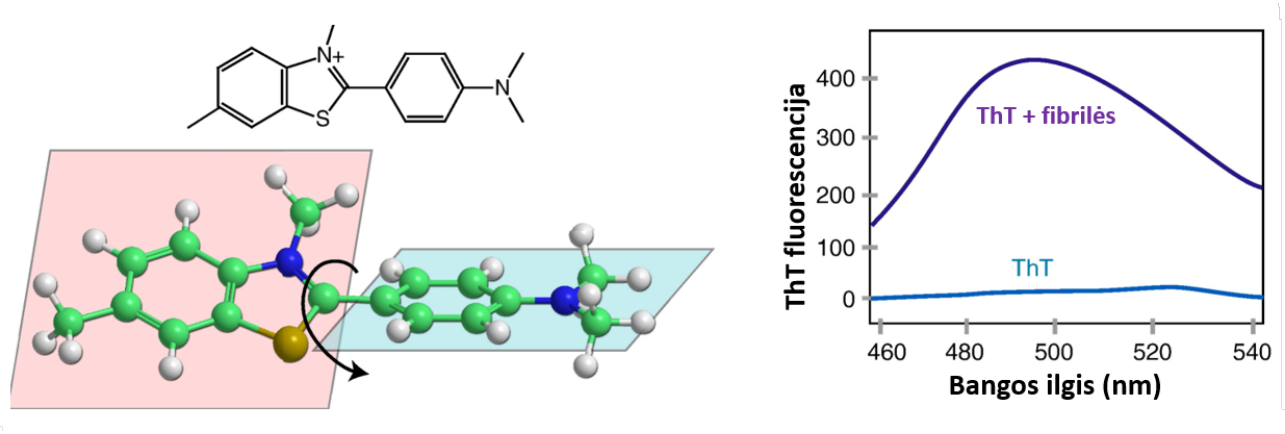
1.4 lentelė. Amiloidų detekcijai naudojami dažai

Dažas	**Ką detektuoja**	**Pastabos**	**Šaltinis**
Tioflavinas T	β klostytą struktūrą	Tinkamas kiekybiniam vertinimui, bet dažo fluorescencinės savybės priklauso nuo pH	Biancalana and Koide (2010)
Tioflavinas S	β klostytą struktūrą	Kiekybiniams vertinimams nenaudojama dėl didelio bazinio triukšmo lygio	Rajamohamedsait and Sigurdsson (2012)
Nilo raudonasis	Hidrofobinius paviršius	Prastas tirpumas vandenyje (0,2 mg/ml), tačiau fluorescencinės dažo savybės nepriklauso nuo pH	Mishra et al. (2011)
Kongo raudonasis	Neaiškus jungimosi mechanizmas. Galimai įsiterpia tarp polipeptidinių grandinių	Jungiasi prie natyvių/dalinai denatūruotų baltymų – iškreipia kinetinius duomenis	Khurana et al. (2001)
Dapoksilas	β klostytą struktūrą ir hidrofobinius paviršius	Tinkamas ir fibrilių, ir oligomerų charakterizavimui	Yates et al. (2016)
pFTAA	Neaiškus jungimosi mechanizmas. Galimai jungiasi į hidrofobinius griovius išilgai fibrilių ašiai	Būdamas agregacijos mišinyje keičia agregatų struktūrą, todėl netinka detekcijai *in situ*	Aslund et al. (2009); Relstaff et al. (2015); Civitelli et al. (2016)
Resveratrolis	Mechanizmas neaiškus	Gali daryti įtaką kinetikai net žemose koncentracijose	Ahn et al. (2007)

Taip pat siūloma fibriles detektuoti matuojant jų vidinės fluorescencijos intensyvumą (Pinotsi et al., 2013). Vidinis fibrilių fluoroforas – β klosčių vandenilinių ryšių tinklas; fibrilės, sužadintos 405 nm ilgio šviesa, išspinduliuoja šviesą ties 460 nm bangos ilgiu. Šio metodo privalumas – matuojamas β klosčių susidarymas agregacijos mišinyje ir nenaudojami išoriniai

dažai. Tai leidžia stebėti tikrąją agregacijos kinetiką, išvengiama nespecifinio dažų jungimosi, be to, jokios pašalinės molekulės nedaro įtakos agregacijos procesui. Atliekant agregacijos su slopikliais kinetikos eksperimentus *in vitro* dažnai pastebima, kad tiriamas junginys slopina dažo fluorescencijos intensyvumą, tad naudojant šį metodą išvengiama ir tokių problemų. Tačiau šis metodas nėra plačiai taikomas dėl mažos kvantinės išeigos ir dėl to atsirandančio didelio triukšmo lygio.

Populiariausias fluorescencinis dažas amiloidinių agregatų susidarymo kinetikai tirti yra tioflavinas T, sužadinamas 440 nm ilgio banga ir kurio emisijos maksimumas yra ties 480 nm (Biancalana and Koide, 2010). Jo veikimo principas pavaizduotas 1.10 pav. Dažui prisijungus prie amiloidinių agregatų, jo sužadinimo spektro maksimumas pasislenka nuo 385 nm iki 440 nm, emisijos – nuo 445 nm iki 482 nm. ThT veikimas aiškinamas molekulinio rotoriaus principu. Tirpale esančio ThT benzilamino ir benzotiazolo žiedai sukasi apie C-C ryšį. Dėl šio sukimosi molekulės fluorescencijos kvantinė išeiga labai maža, nes dažas stipriai fluorescuoja tik žiedams išsidėsčius tam tikru kampu vienas kito atžvilgiu. Tuo tarpu ThT prisijungus į fibrilių paviršiuje esančius iš peptido šoninių grupių sudarytus griovius, dažas užfiksuojamas vienoje konformacijoje, žiedai nesisuka vienas aplink kitą ir molekulė stipriai fluorescuoja (1.10 pav. dešinėje) (Biancalana and Koide, 2010).



1.10 pav. ThT struktūra ir optinės savybės (pritaikyta pagal Biancalana and Koide (2010))

2. PRIETAISAI, MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Prietaisai

Darbe naudoti prietaisai:

- 96 šulinėlių mikroplokštelės „Corning“ ir jų sandarinimo juosta „Nunc“;
- Autoklavas „AHS-75N“ (Raypa);
- Atominės jėgos mikroskopas „Dimension Icon“ ir zondas „RTESPA-300“ (Bruker);
- Centrifūga „HiCen SR“ (HeroLab);
- Chromatografijos sistema „*ÄKTApurifier*“ (GE Healthcare);
- Chromatografinės kolonos „XK 26/20“ ir „HiScale 26/40“ (GE Healthcare);
- Dializės celė „Bel-Art“ (Scienceware);
- Dializės žarnos: 49,5 mm skersmens „Zella Trans Roth“ (pralaidumas 8 kDa);
- Elektroforezės aparatas „Biometra Minigel-Twin“ su „Biometra PS 300 T“ srovės šaltiniu;
- Filtrai: 0,22 µm ir 0,45 µm porų dydžio „Sartorius Stedim Biotech“ ir „Millipore Steri-cup“;
- FTIR spektrometras „Bruker alpha“ (Bruker);
- Homogenizatorius „Potter-Elvehjem“ (Fisher Scientific);
- Koncentratoriai „Amicon® Ultra-15“ (pralaidumas 10 kDa);
- Laminarinė spinta „Bio II Advance“ (Telstar);
- Magnetinės maišyklės: „Scientifica ARE“ (Velp), „Ultra Thin Magnetic Stirrer“ (Fisher Scientific), „Maxi Direct“ (VARIOMAG);
- pH metras „Orion DUAL STAR meter“ (Thermo Scientific);
- Plokštelių skaitytuvas „Biotek Synergy H4 Multi-Mode Reader“;
- Purtyklė „KS 4000i“ (IKA);
- Realaus laiko PGR aparatas „Rotor-Gene Q real-time analyzer“ (GE Healthcare);
- Refraktometras „RL3” (PZO);
- Spektrofotometrai „UV-1800“ (Schimadzu), „Varian Cary Eclipse“, „Nanodrop 2000“ (Fisher Scientific);
- Svarstyklės: „PCB 1000-2 (Kern)“, „TP-214“ (Denver Instruments);
- Termostatai: „Ditabis MHR 23“, „IB-15G“, „Mini Dry Bath“ (Fisher Scientific);
- Ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls 3100“ (antgaliai: VS70/T, MS72, MS73);
- Vakuuminė filtravimo įranga „Sigma-Aldrich“;
- Vandens valymo sistema „Simplicity UV system“.

2.2. Medžiagos

Darbe naudotos medžiagos:

- **AB Vilniaus degtinė:** 96 % etanolis;
- **Acros Organics:** 99 % Na_2SO_4, 99,6 % NH_4Cl, 99 % glicerolis, 98,5 % NaOH, 99,7 % GuHCl, NaH_2PO_4, 37 % HCl tirpalas, 50 % NaOH tirpalas, 99,5 % APS, 99 % $NiCl_2 \cdot$

$6H_2O$;

- **Carl Roth:** 99 % KH_2PO_4, KCl, 99 % ampicilino natrio druska, Luria Broth mitybinė terpė, agaras, 99 % CH_3COOH;
- **Fisher Scientific:** 99 % DTT, 99,5 % $MgSO_4$, laktozė, imidazolas, K_2HPO_4, glicinas, dekstrozė, mielių ekstraktas, TEMED, NDS, triptonas, akrilamido/bis-akrilamido 30 % tirpalas, 99 % EDTA, DMSO, molekulinės masės žymuo „PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder“, elektroforezės gelių dažas „Ez-Run Protein Gel Staining Solution“;
- **GE Healthcare:** sorbentas „Ni *Sepharose*^{TM} 6 Fast Flow“;
- **Sigma-Aldrich:** rekombinantinis žmogaus insulinas, metileno mėlis, ThT, 98 % $CuSO_4$, 98 % $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$;

2.2.1. Konstruktas

pET303/CT-his plazmidė su *SOD1* ir atsparumo ampicilinui genais įsigyta iš *Fisher Scientific*.

2.2.2. Kompetentinės ląstelės

E. coli BL21 Star^{TM}(DE3) kamienas, kurio genotipas F^- *ompT hsdS*$_B$ r_B^- m_B^- *gal dcm rne*131(DE3), naudotas baltymų sintezei. Kamienas įsigytas iš *Fisher Scientific*.

2.2.3. Mitybinės terpės

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

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

2.2.4. Tirpalai

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

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

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

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

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

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

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

2.3. Metodai

2.3.1. Plazmidinės DNR transformacija

Į 100 µl atšildytų kompetentinių ląstelių įdedama 1 µl plazmidinės DNR; ląstelės išsėjamos Petri lėkštelėje ant agarizuotos LB terpės su 100 µg/ml ampicilino. Inkubuojama termostate 37 °C 16 val.

2.3.2. Ląstelių kultūros paruošimas šaldymui

Viena *E. coli* kolonija, užaugusi po transformacijos, sėjama į 30 ml skystos LB terpės. Kultūra auginama +37 °C temperatūros sąlygomis iki optinio tankio $OT_{600} = 0{,}6$. Ląstelių suspensija sumaišoma su 10 % DMSO, išpilstoma į mėgintuvėlius po 1 ml ir užšaldoma esant -80 °C temperatūrai.

2.3.3. SOD1 baltymo sintezė

E. coli kultūra auginama autoinduktyvioje ZYM-5052 terpėje (Studier, 2005) su 100 µg/ml ampicilino. Į autoklavuotą terpę užsėjama 100 µl užšaldytos ląstelių kultūros. Kultūra auginama purtyklėje (37 °C, 220 aps./min) 16 val. Užauginta kultūra centrifuguojama 20 min 6000 aps./min greičiu +4 °C temperatūros sąlygomis. Ląstelės plaunamos **A** buferiniu tirpalu.

2.3.4. Baltymų elektroforezė

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

2.3.5. Baltymo gryninimas

Biomasė mechaniškai homogenizuojama **A** buferiniame tirpale. Gautas homogenatas 10 min ardomas ultragarsu, 60 s trukmės impulsais kas 60 s, naudojant VS70T antgalį, 70 % galia, mėginį šaldant lede. Biomasė centrifuguojama 20 min 18 000 aps./min esant +4 °C temperatūrai. Supernatantas sumaišomas su buferiniu tirpalu **A** nulygsvarintu ir Ni(II) jonais pakrautu sorbentu. Sorbentas su supernatantu paliekami bent pusvalandžiui +4 °C temperatūros sąlygomis lėtai maišant.

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

Po chromatografinio gryninimo vykdoma dializė: surinktos tikslinio baltymo frakcijos sujungiamos į vieną ir per naktį dializuojamos tirpale **C**, po to – 3 valandas tirpale **D**. Šio etapo dializės funkcija – gauti SOD1 apofermentą. Esant rūgštiniam pH baltymas dalinai denatūruojamas, todėl netenka Cu^{2+} ir Zn^{2+} jonų (juos prisijungia EDTA). Antras etapas – 3 valandų trukmės dializės dviejuose **E** tirpaluose, esant tirpalo ir surinktų frakcijų santykiui 100:1. Šio etapo paskirtis – renatūruoti baltymą ir atsikratyti EDTA.

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

2.3.6. Baltymo koncentracijos nustatymas

Baltymo koncentracija (mg/ml) nustatoma matuojant optinį tankį ties 280 nm ir skaičiuojant pagal formulę:

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

kur A – optinis tankis ties 280 nm, M – baltymo molekulinė masė (16 868 Da SOD1 monomerui ir 5 808 Da insulinui), ε_{280} – ekstinkcijos koeficientas (5750 L$\cdot$ $mol^{-1}cm^{-1}$ SOD1 monomerui ir 6335 L$\cdot$ $mol^{-1}cm^{-1}$ insulinui), l – šviesos kelio ilgis.

2.3.7. Amiloidinių fibrilių gamyba

SOD1 amiloidinės fibrilės gaminamos 200 µM baltymo monomero 3 paras laikant buferiniame tirpale **F**. Agregacijos buferinis tirpalas su baltymu išpilstomas į mėgintuvėlius ir purtomas 600 aps./min esant +60 °C temperatūrai.

Agregacijos procesas stebimas naudojant amiloidinėms fibrilėms specifinį dažą tioflaviną T, kuris sužadinamas 440 nm banga, o emisija matuojama 460–520 nm bangų srityje. Mėginių su 50 µM tioflavino T fluorescencijos emisija matuojama mikroplokštelių skaitytuve arba realaus laiko PGR aparate.

2.3.8. Agregacijos kinetikos tyrimai

SOD1 spontaninės agregacijos kinetika tiriama tirpale **F** naudojant 200 µM baltymo monomero ir 50 µM ThT. Agregacijos su „sėkla“ kinetikai tirti dedama 190 µM baltymo ir 10 µM (5 %) suformuotų fibrilių, kurios prieš pat tyrimą ardomos ultragarsu 10 min 30 s impulsais kas 30 s esant 20 % MS72 antgalio galingumui.

Insulino spontaninė agregacija stebima 100 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, kurio pH yra 2 arba 2,4 ir 20 % acto rūgšties tirpale su 100 mM NaCl (terpės pH 1,8). Pasveriamas reikiamas kiekis liofilizuoto žmogaus insulino; baltymas ištirpinamas buferiniame tirpale ir spektrofotometru pamatuojama jo koncentracija. Tada insulinas praskiedžiamas iki reikiamos koncentracijos, pridedama metileno mėlio ir 50 µM tioflavino T.

Abiejų baltymų agregacijos procesas stebimas 60 °C temperatūros sąlygomis matuojant ThT fluorescencijos emisijos intensyvumą. ThT sužadinamas 440 nm banga, emisija matuojama ties 480 nm bangos ilgiu.

2.3.9. Fluorescencinių dažų jungimo tyrimai

Inkubuojant su metileno mėliu gauti SOD1 agregatai dializuojami 1 l 10 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale, kurio pH 7,4, tirpalą keičiant 4 kartus kas 3–4 valandas. Pradinis agregatų mišinio tūris 2 ml.

Tioflavino T jungimui patikrinti į 1 ml 10 mM kalio fosfatinį buferinį tirpalą, pH 7,4 su 50 µM ThT įpilama 10 µl agregatų. Matuojama fluorescencijos emisija 450–600 nm bangų ruože, ThT sužadinant 440 nm ilgio banga.

Nilo raudonojo jungimui patikrinti į 1 ml 10 mM kalio fosfatinį buferinį tirpalą, pH 7,4 su 10 µM NR įpilama 50 µl agregatų, inkubuojama 15 min. Matuojama fluorescencijos emisija 550–800 nm bangų ruože, NR sužadinant 530 nm ilgio banga.

Kongo raudonojo jungimui patikrinti į 1 ml 10 mM kalio fosfatinį buferinį tirpalą, pH 7,4 su 10 µM CR įpilama 10 µl agregatų, inkubuojama 15 min. Matuojama absorbcija 400–700 nm bangų ruože, naudojama kiuvetė, kurios šviesos kelio ilgis yra 1 cm.

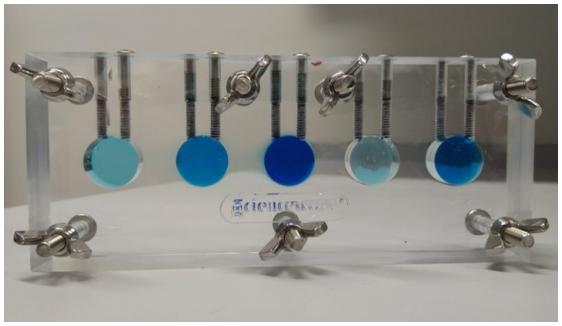
2.3.10. Infraraudonųjų spindulių spektroskopija

Paruoštos SOD1 fibrilės 20 min centrifuguojamos 14 000 aps./min greičiu, nupilamas supernatantas. Ant fibrilių užpilama 1 ml D_2O; vėl centrifuguojama; supernatantas nupilamas. Plovimo sunkiu vandeniu žingsniai kartojami 4–5 kartus. Nupylus supernatantą po paskutinio plovimo, fibrilės resuspenduojamos 300 µl sunkaus vandens. Agregatai prieš matavimą 1 min ardomi ultragarsu, MS72 antgaliu, esant 20 % galiai. 30 µl suardytų fibrilių patalpinama į celę tarp dviejų CaF_2 stiklų. FTIR spektrometru matuojamas IR spindulių sugerties spektras. Apdorojant duomenis, iš fibrilių spektro atimamas sunkaus vandens spektras, duomenys normalizuojami pagal plotą.

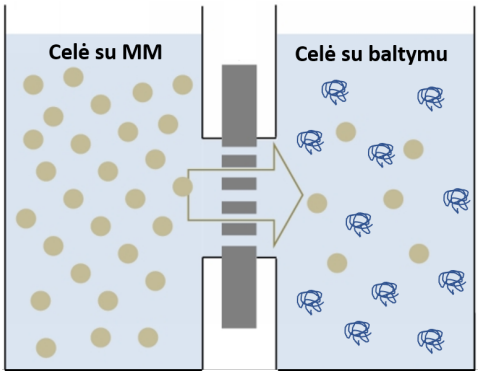
2.3.11. Tyrimai su mikrodializės celėmis

Vieną mikrodializės celę sudaro dvi 1 ml tūrio ertmės, perskirtos 8 kDa laidumo regeneruotos celiuliozės membrana (2.1b pav.). Prieš eksperimentą surenkamas dializės celių korpusas, tarp ertmių įdedant sudrėkintą membraną. Atliekant metileno mėlio jungimosi prie baltymo ir fibrilių tyrimą, į vieną ertmę pilamas 10 µM metileno mėlio tirpalas, į kitą – 50 µM baltymo arba fibrilių tirpalas (prieš tyrimą fibrilės ardomos ultragarsu). Celės užsukamos varžtais ir

paliekamos 24 val. pusiausvyrai nusistovėti. Eksperimento metu vyksta metileno mėlio difuzija per membraną į celę su baltymu/fibrilėmis, kur junginys jungiasi su šiomis makromolekulėmis. Baltymo ir fibrilių difuzija per membraną nevyksta, nes jie yra didesni už membranos poras. Kiekvienam matavimui atliekama po 3 nepriklausomus pakartojimus.



(a) Mikrodializės celių nuotrauka



(b) Celės veikimo principas

2.1 pav. Mikrodializės celės

Nusistovėjus pusiausvyrai, spektrofotometru išmatuojama kiekvienos celės turinio optinė sugertis 400–800 nm bangų ruože. Pagal šviesos adityvumo dėsnį iš sugerties spektrų galima apskaičiuoti prie fibrilių/baltymo prisijungusio metileno mėlio spektrą (3 lygtis):

$$A = B + C + D + E, \tag{3}$$

kur A – išmatuota tirpalo sugertis, B – fibrilių/baltymo sugertis, C – laisvo MM sugertis, D – prisijungusio MM sugertis, E – buferinio tirpalo sugertis. Baltymo sugertis išmatuojama prieš tyrimą; laisvo metileno mėlio ir buferinio tirpalo suminė sugertis lygi sugerčiai tirpalo, esančio kitoje dializės celės ertmėje be baltymo ir fibrilių. Prieš eksperimentą išmatuotas fibrilių sugerties spektras skaičiavimams nenaudojamas, nes kol nusistovi pusiausvyra dializės celėje (24 val.), ultragarsu ardytos fibrilės sukimba į gabalus, be to, patiriami nuostoliai perkeliant fibriles iš mėgintuvėlio/į dializės celę/į matavimo kiuvetę – dėl šių priežasčių fibrilių sugerties spektro prieš ir po eksperimento intensyvumas nėra toks pats. Kadangi fibrilės yra mikrometrų eilės dydžio dalelės ir stipriai sklaido šviesą, spektrofotometru stebima sugertis visame matuojamame 400–800 nm bangų ruože. Todėl norint apskaičiuoti prie fibrilių prisijungusio metileno mėlio spektrą, iš išmatuoto spektro atimama laisvo metileno mėlio ir buferinio tirpalo sugertis, tada išvedama bazinė linija, ji atimama ir gaunamas prie fibrilių prisijungusio metileno mėlio spektras. Metileno mėlio koncentracija skaičiuojama naudojant ekstinkcijos koeficientą $\varepsilon_{656} = 73230$ L$\cdot$ mol^{-1}cm^{-1}.

2.3.12. Atominės jėgos mikroskopija

30 µl mėginio užnešama ant žėručio disko; po 2 min diskas nuplaunamas vandens srove ir išdžiovinamas. Mikroskopija atliekama virpančio zondo režimu, 300 kHz dažniu. Skanavimo greitis – 0,5–1 Hz, plotas – 5 µm, skanavimo kokybė – 1024 x 1024 taškų. AFM nuotraukos

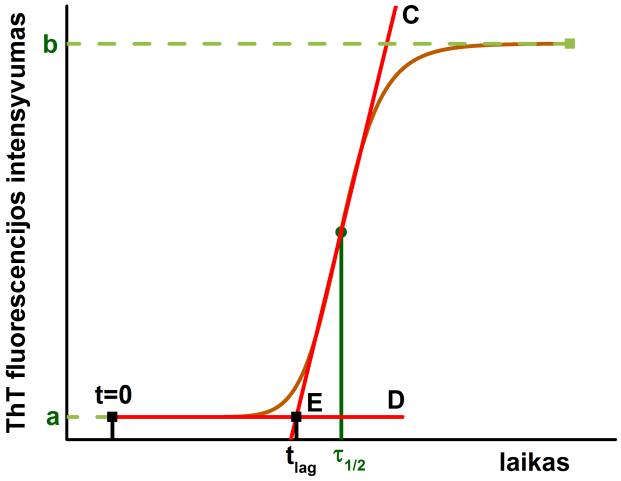
apdorojamos NanoScope Analysis 1.9 programa.

2.3.13. Duomenų apdorojimas

Agregacijos kinetikos duomenys apdorojami naudojant Ms Excel ir Origin 2016 programinę įrangą. Kinetikos kreivės gluodinamos sigmoidine Hilo lygtimi (4 lygtis, 2.2 pav.):

$$y = a + (b-a)\frac{x^n}{\tau_{1/2}^n + x^n}, \tag{4}$$

kur y – fluorescencijos emisijos intensyvumas laiko momentu x, a – pradinis fluorescencijos emisijos intensyvumas, b – galutinis fluorescencijos emisijos intensyvumas, n – Hilo koeficientas (kreivės išlenktumo rodiklis), $\tau_{1/2}$ – agregacijos puslaikis (laiko momentas, kai mišinyje suagregavę pusė baltymo). t_{lag} – *lag* fazės trukmė; ji apskaičiuojama randant tiesių, einančių per bazinę liniją ir eksponentinio augimo dalį, susikirtimo tašką.



2.2 pav. Sigmoidinės kreivės grafikas

Eksperimentiniai duomenys normalizuojami pagal lygtį:

$$I_{norm} = \frac{I - I_a}{I_b - I_a} \cdot 100, \tag{5}$$

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

Fibrilių elongacijos greitis skaičiuojamas sigmoidės eksponentinio augimo dalį gluodinant tiesės lygtimi:

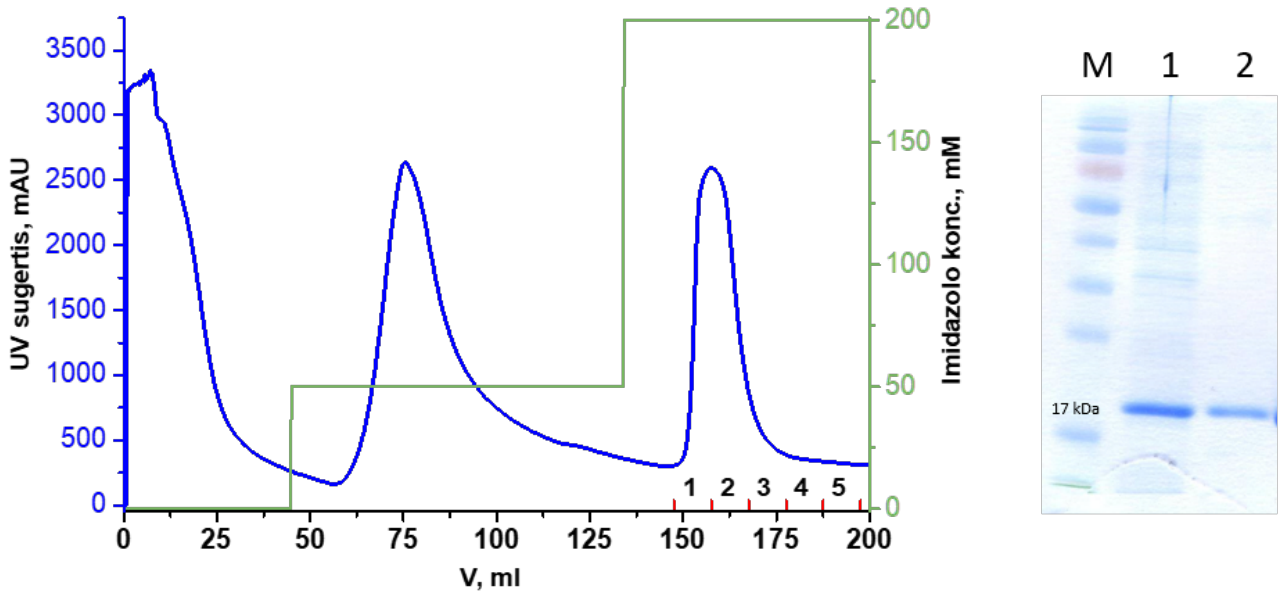
$$y = ax + b, \tag{6}$$

kur y – fluorescencijos signalo intensyvumas laiko momentu x, a – tiesės krypties koeficientas (elongacijos greitis), b – taškas, kuriame tiesė kerta y ašį.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Baltymo gryninimas

Tyrimams naudojamas rekombinantinis SOD1 baltymas, sintetintas *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene. Tikslinio baltymo geno seka sulieta su 6 histidinų uodega, todėl gryninimas atliekamas nikelio jonų gimiringumo chromatografijos metodu. Gryninimo rezultatai pateikti 3.1 pav. Pirmiausia laiptiniu 50 mM imidazolo gradientu išplaunami su sorbentu silpnai sąveikaujantys baltymai; tikslinio baltymo eliucija vykdoma esant 200 mM imidazolo gradientui. Surinktos 1–3 frakcijos (3.1 pav.) dializuojamos buferiniame tirpale su EDTA siekiant gauti apoSOD1 be metalų jonų. Baltymo grynumas vertinamas naudojant NDS-PAGE elektroforezės metodą (3.1 pav. dešinėje). Iš 1 g biomasės išgryninama vidutiniškai 16,6 ± 1,1 mg SOD1 baltymo; iš viso darbo metu išgryninta 1207 mg baltymo.



3.1 pav. SOD1 gryninimas nikelio jonų gimiringumo chromatografija. Kairėje – chromatograma, dešinėje – NDS-PAGE gelio nuotrauka po gryninimo. M – molekulinės masės žymuo, 1 – 1–3 sujungtos frakcijos prieš dializę, 2 – po dializės ir filtravimo

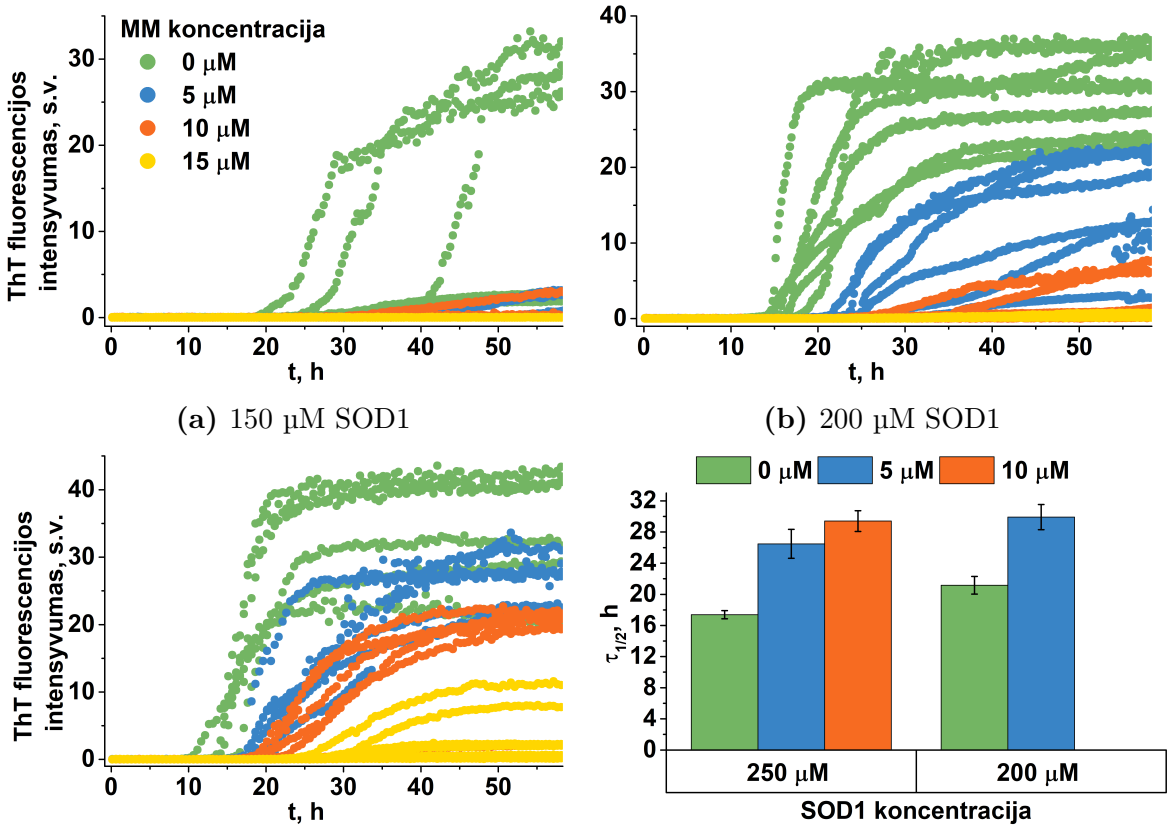
3.2. Metileno mėlio įtaka SOD1 agregacijos kinetikai

Paprasčiausias būdas patikrinti, ar potencialus slopiklis veikia tiriamo baltymo agregaciją, yra agregacijos kinetikos stebėjimas fluorescencinės spektroskopijos pagalba. Naudojant šį metodą galima aukštu našumu patikrinti tiriamų aplinkos sąlygų (šiuo atveju slopiklio) įtaką baltymo agregacijos greičiui; amiloidiniams agregatams detektuoti naudotas fluorescencinis dažas tioflavinas T. Agreguojant baltymą periodiškai matuojamas tioflavino T fluorescencijos emisijos intensyvumas, kuris priklauso nuo tarpmolekulinių β klosčių kiekio.

3.2.1. Metileno mėlio įtaka SOD1 spontaninei agregacijai

Spontaninės baltymo agregacijos eksperimentas – eksperimentas, kurio metu matuojamas savaiminis agregatų susidarymas tam tikromis aplinkos sąlygomis. Tokio tipo eksperimentais modeliuojamos savaime atsirandančios neurodegeneracinės ligos – atvejai, kai amiloidiniai agregatai organizme susidaro ne dėl baltyminio užkrato, o dėl kitų aplinkos veiksnių. Spontaninės SOD1 agregacijos su metileno mėliu kinetikos rezultatai pateikti 3.2 pav. Metileno mėlio įtaka SOD1 spontaninei agregacijai tirta naudojant 3 skirtingas baltymo koncentracijas – 150, 200 ir 250 µM. SOD1 agreguoja lėtai lyginant su kitais amiloidiniais baltymais, todėl jo koncentracijos pasirinktos tokios, kad pilna agregacija įvyktų per 60 valandų.

Tyrimo metu nustatyta, jog metileno mėlis slopina SOD1 spontaninę agregaciją, slopinimo efektyvumas stiprėja didėjant junginio koncentracijai. Tai matoma iš ilgesnės *lag* laiko (laiko nuo agregacijos pradžios iki eksponentinio kilimo pradžios) trukmės (pvz. 18 h ir 25 h esant 0 µM ir 5 µM metileno mėlio atitinkamai, 3.2b pav.) ir gulstesnės eksponentinio augimo kreivės dalies. Atitinkamai didėjant metileno mėlio koncentracijai, ilgėja agregacijos puslaikis (laikas, per kurį pasiekiama pusė didžiausios fluorescencijos emisijos signalo vertės) ir tai priklauso nuo junginio koncentracijos (3.2d pav.). Kadangi metileno mėlis ilgina baltymo agregacijos laiką ir ne visuose mėginiuose per stebimą laiką (3 paras) pasiekiamas ThT signalo įsisotinimas, ne visomis sąlygomis atliktiems eksperimentams buvo galima apskaičiuoti agregacijos puslaikius.



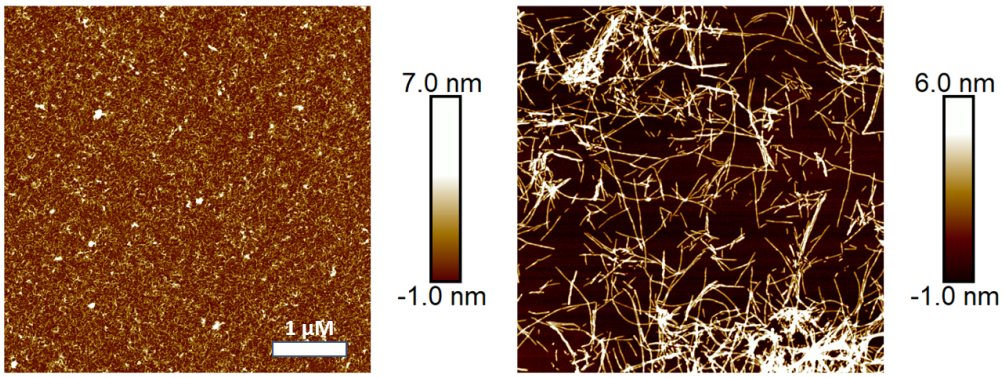
(a) 150 µM SOD1 **(b)** 200 µM SOD1

(c) 250 µM SOD1 **(d)** Agregacijos puslaikiai

3.2 pav. Spontaninės SOD1 agregacijos su metileno mėliu 10 mM kalio fosfatiniame buferyje, esant 0,5 M GuHCl ir 5 mM DTT, kinetikos kreivės. Standartinės paklaidos apskaičiuotos iš 3–6 pakartojimų

Atliekant eksperimentą buvo griežtai kontroliuojamos pradinės sąlygos (agregacijos mišinys gerai išmaišomas, pilstomas greitai, nepaliekama oro burbulų, 96 šulinių plokštelė užklijuojama permatoma plėvele siekiant išvengti mėginio garavimo), tačiau kinetikos kreivės tarp techninių pakartojimų ne visuomet panašios. Šią problemą pastebėjo ir kitos mokslininkų grupės (Abdolvahabi et al., 2016). Manoma, kad šis reiškinys susijęs su agregacijos atsitiktinumu ir konkuruojančiais agregacijos į fibriles ir amorfinius agregatus keliais. Taip pat pastebima, kad kuo didesnė baltymo koncentracija, tuo geresnis rezultatų atsikartojamumas. Didesnės nei 15 µM metileno mėlio koncentracijos kinetikos tyrimams nenaudotos, nes esant aukštesnėms junginio koncentracijoms stipriai slopinamas ThT fluorescencijos intensyvumas ir dėl mažo signalo-triukšmo santykio tokių rezultatų negalima tinkamai įvertinti.

Suagregavus SOD1 baltymą su slopikliu, atlikta agregatų morfologijos analizė atominės jėgos mikroskopu (3.3 pav.). Tirpale nesant metileno mėlio, gaunami iki kelių µm ilgio fibriliniai agregatai (3.3 pav. dešinėje); tuo tarpu tirpale esant 400 µM junginio, mišinyje randami tik protofilamentai ir maži, apvalūs dariniai, kurie nestiprina ThT fluorescencijos intensyvumo (3.3 pav. kairėje).

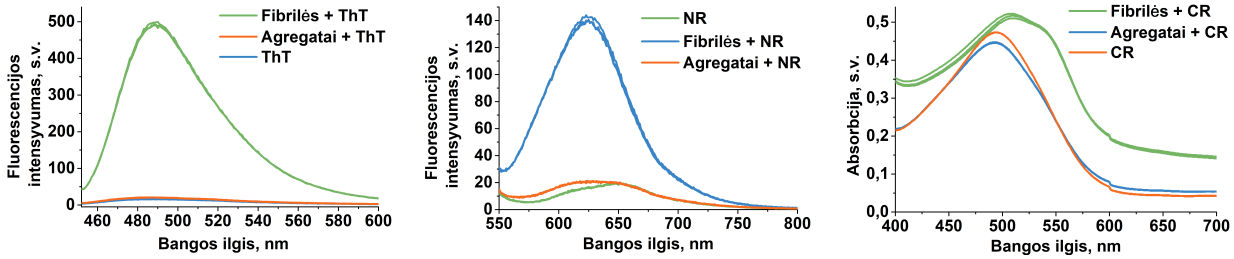


3.3 pav. Agregatai, gauti spontaniškai agreguojant SOD1 su 400 µM MM (kairėje) ir be jo (dešinėje)

Norint ištirti 3.3 pav. kairėje matomų agregatų spektroskopines savybes, buvo atliktas toks eksperimentas: baltymas agreguotas su metileno mėliu koncentracijų santykiu 200:400 µM, o gauti agregatai dializuoti 10 mM kalio fosfatiniame buferiniame tirpale, siekiant pašalinti tirpale esantį metileno mėlį. Junginio pašalinimas būtinas, nes esant tokiai didelei jo koncentracijai slopinama tyrimui naudotų dažų tioflavino T ir Nilo raudonojo fluorescencija, o metileno mėlio sugerties spektras persidengia su Kongo raudonojo dažo sugerties spektru.

Iš 3.4 pav. pateiktų rezultatų matoma, kad amiloidiniai agregatai – fibrilės – jungia visus tris tyrime naudotus amiloidinių darinių detekcijai naudojamus dažus – tioflaviną T, Nilo raudonąjį ir Kongo raudonąjį. Tioflavino T jungimas matomas iš dažo fluorescencijos emisijos intensyvumo padidėjimo keliasdešimt kartų, tirpale esant fibrilėms (3.4a pav.); emisijos maksimumas pasiekiamas ties 490 nm bangos ilgiu. Tuo tarpu su metileno mėliu inkubuoto baltymo agregatai dažo nejungia – tai matoma iš tokio pat fluorescencijos emisijos intensyvumo dažo mišinyje su agregatais ir buferiniame tirpale. Fibrilės jungia ir Nilo raudonąjį dažą; tai matoma iš didesnio fluorescencijos intensyvumo ir bangos ilgio, ties kuriuo pasiekiamas intensyvumo

maksimumas, hipsochrominio poslinkio (3.4b pav.). Tuo tarpu su metileno mėliu gautų agregatų buvimas Nilo raudonojo spektroskopinių savybių beveik nekeičia. Fibrilėms prisijungus Kongo raudonąjį dažą, stebimas dažo sugerties spektro pokytis: didžiausio intensyvumo smailė pasislenka nuo 480 nm iki 500 nm ir atsiranda petys ties 540 nm (3.4c pav.). Tuo tarpu su MM gautų agregatų ir dažo spektras beveik toks pats, kaip dažo buferiniame tirpale. Remiantis šiais rezultatais teigiama, kad baltymo agregatų, gautų inkubuojant jį su metileno mėliu, paviršius yra kitoks, nei amiloidinių fibrilių. Jame nėra tioflavinui T pasiekiamų β klosčių ir atvirų hidrofobinių sričių, prie kurių jungiasi Nilo raudonasis ir Kongo raudonasis dažai.



(a) Tioflavino T fluorescencijos emisijos spektrai

(b) Nilo raudonojo fluorescencijos emisijos spektrai

(c) Kongo raudonojo sugerties spektrai

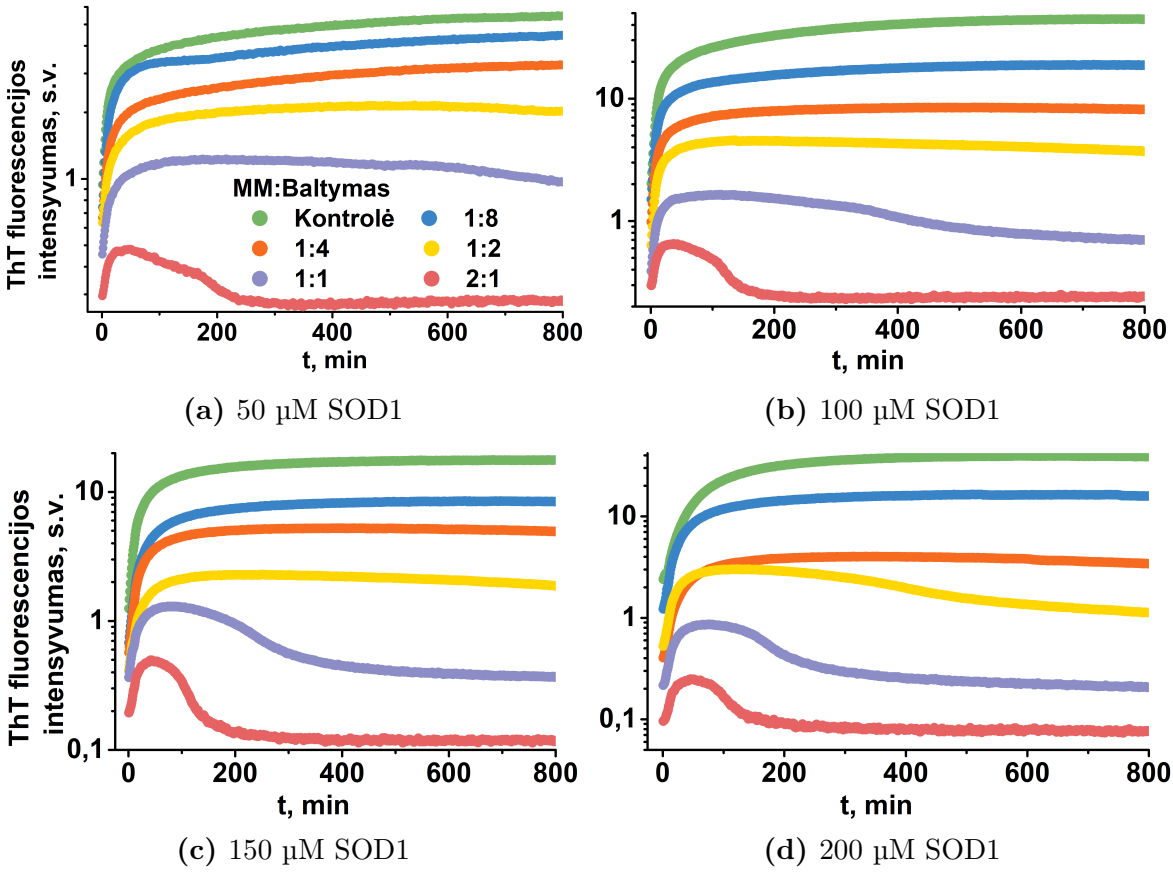
3.4 pav. Veikiant 400 µM metileno mėlio gautų agregatų gebėjimas jungti amiloidų detekcijai naudojamus dažus

3.2.2. Metileno mėlio įtaka SOD1 agregacijai su „sėkla"

Atliktas SOD1 agregacijos greičio priklausomybės nuo baltymo ir metileno mėlio koncentracijos tyrimas, naudojant 5 % „sėklos". „Sėkla" vadinami agregatai, kurių pridedama į pradinį baltymo tirpalą, siekiant inicijuoti elongacijos (eksponentinio augimo) procesą ir pagreitinti agregaciją. Tokios sąlygos laikomos pažengusios ligos modeliu *in vitro*, kai tam tikroje organizmo vietoje susidarę agregatai plinta nervų sistemoje ir priverčia agreguoti likusį laisvą baltymą. Toks eksperimentas taip pat atliekamas siekiant imituoti baltyminio užkrato sukeltų neurodegeneracinių ligų vystymąsi.

Pastebėta, kad dažnai junginiai, puikiai slopinantys spontaninę baltymo agregaciją, nesugeba daryti įtakos „sėkla" inicijuotai agregacijai. Ligos kontekste tai reiškia, kad tokių junginių pagrindu pagaminti vaistai nesugebės išgydyti ligos esant pažengusiai stadijai. Tokių tyrimų (kai tikrinamas potencialaus vaisto poveikis fibrilių elongacijai) literatūroje aprašyta nedaug – greičiausiai dėl to, kad dauguma tiriamų junginių tiesiog nerodo laukiamo agregaciją slopinančio efekto šiomis sąlygomis. Kalbant apie agregacijos mechanizmą, „sėklos" pridėjimas leidžia stebėti aplinkos sąlygų įtaką išimtinai fibrilių elongacijai ir antriniams procesams (fragmentacijai ir antrinei nukleacijai), mat šie procesai vyksta gerokai greičiau nei pirminė nukleacija. Fragmentacijos procesas šiuose tyrimuose laikomas nereikšmingu (turinčiu per mažą indėlį agregacijos greičiui), nes kinetikos matavimai atliekami be purtymo, tokiu būdu mažinant fibrilių lūžinėjimo tikimybę.

Iš 3.5 pav. pateiktų rezultatų matoma, kad metileno mėlis ne tik slopina tioflavino T fluorescencijos intensyvumą (kaip ir spontaninės agregacijos atveju), bet ir iš esmės keičia kinetikos



(a) 50 µM SOD1 **(b)** 100 µM SOD1

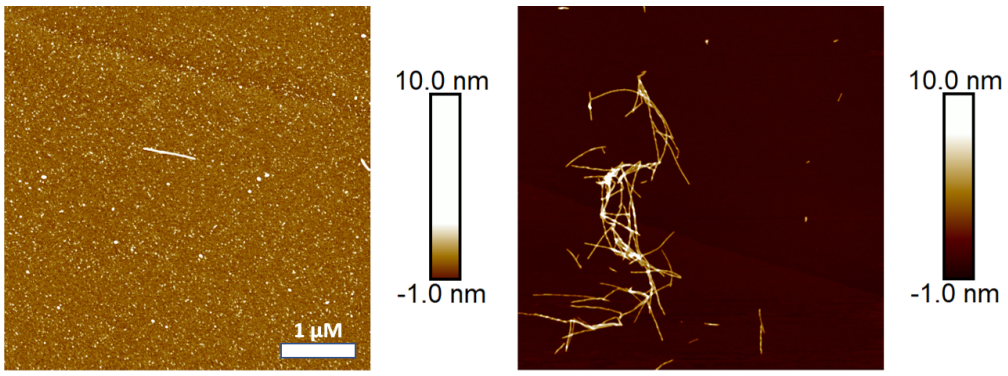
(c) 150 µM SOD1 **(d)** 200 µM SOD1

3.5 pav. SOD1 agregacijos su „sėkla" ir metileno mėliu 10 mM kalio fosfatiniame buferyje kinetikos kreivės, esant 5 % „sėklos", 0,5 M GuHCl ir 5 mM DTT

kreivių formą (jos tampa „kalnelių" pavidalo). Visomis tirtomis sąlygomis junginio poveikis panašus; kuo didesnė baltymo koncentracija, tuo daugiau junginio reikia, kad atsirastų „kalnelių" pavidalo kreivės (efektas tampa matomas, kai junginio:slopiklio santykis yra 1:1). Fluorescencijos intensyvumo kilimas kreivių pradžioje rodo agregatų koncentracijos didėjimą. Po jo sekantis kritimas veda prie tokių svarstymų: arba agregatų ir β klosčių kiekis iš tiesų mažėja (junginys ardo „sėklą" ir neleidžia susidaryti naujoms fibrilėms), arba agregatai nebejungia tioflavino T. Savo ruožtu tioflavino T jie gali nejungti dėl keleto priežasčių: arba agregatai praranda β klostytą struktūrą, arba fiziškai blokuojamas jų paviršius ir dažas nebegali prisijungti.

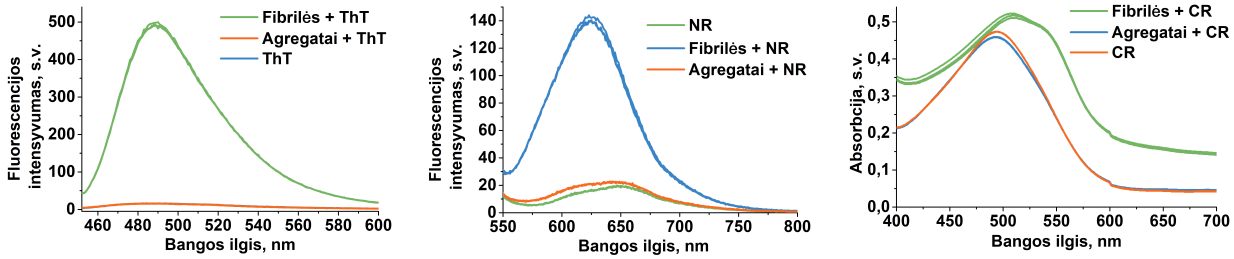
Siekiant sužinoti, ar pakinta agregatų morfologija mišinyje esant metileno mėlio, atliekama jų vizualizacija AFM pagalba. 3.6 pav. kairėje matoma daug mažų agregatų su pavienėmis fibrilėmis; tuo tarpu kontroliniame mišinyje po agregacijos dominuoja fibrilės. Iš šių rezultatų sprendžiama, jog fluorescencijos intensyvumo kritimas kinetikos kreivėse yra susijęs su pakitusiu agregacijos mechanizmu, o ne vien fiziniu dažo apribojimu patekti ant fibrilių paviršiaus, nes priešingu atveju mišinyje dominuotų fibrilės.

Taip pat patikrintas šiuo būdu (naudojant „sėklą" ir metileno mėlį) gautų agregatų gebėjimas jungti amiloidų detekcijai naudojamus dažus. Kaip ir spontaninės agregacijos būdu inkubuojant su metileno mėliu gauti agregatai, taip ir šie dariniai taip pat nejungia amiloidinėms struktūroms specifinių dažų (3.7 pav.). ThT, NR ir CR dažų, esančių mišinyje su agregatais, signalai lygūs ThT buferiniame tirpale signalui (3.7a pav.), Nilo raudonojo signa-



3.6 pav. Agregatai, gauti agreguojant SOD1 su „sėkla" (5 %) ir su (kairėje) ir be (dešinėje) 400 µM metileno mėlio

lui (3.7b pav.) ir Kongo raudonojo signalui (3.7c pav.) atitinkamai. Iš šių rezultatų daroma išvada, kad metileno mėlio poveikis yra greitesnis nei elongacijos ir negrįžtamas per stebimą laiką (3.6 pav. kairėje matomi agregatai išlaiko savo morfologiją ir paviršiaus savybes bent dvi dienas po susidarymo). Tai, kad junginys sugeba daryti poveikį greičiau negu vyksta fibrilių elongacija (esant junginio:slopiklio santykiui bent 1:1) ir tai vyksta esant gerokai didesnei baltymo koncentracijai nei fiziologinė, yra itin laukiami požymiai ieškant vaistų, kuriais siekiama daryti įtaką agregacijos mechanizmui.



(a) Tioflavino T fluorescencijos emisijos spektrai

(b) Nilo raudonojo fluorescencijos emisijos spektrai

(c) Kongo raudonojo sugerties spektrai

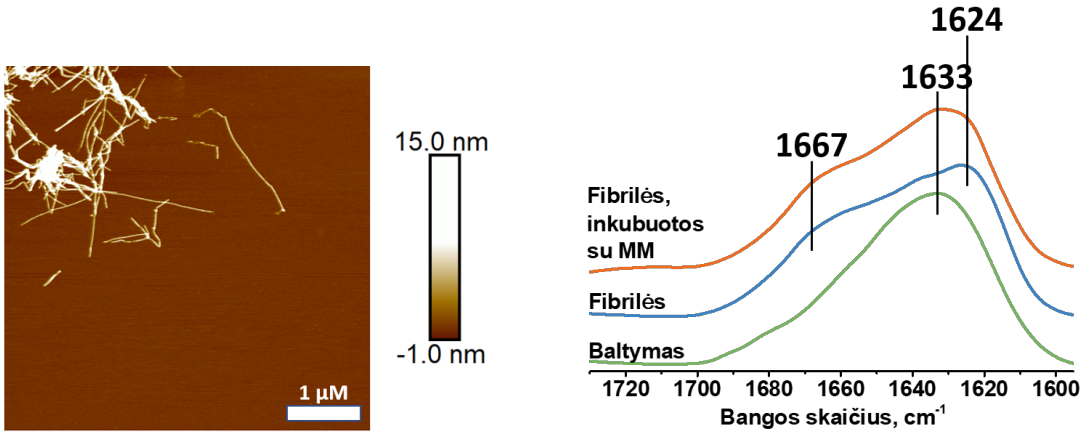
3.7 pav. Veikiant 400 µM metileno mėlio ir „sėkla" gautų agregatų gebėjimas jungti amiloidų detekcijai naudojamus dažus

Siekiant detaliau nustatyti metileno mėlio įtaką SOD1 agregacijos procesui, atliekami toliau aprašyti eksperimentai.

3.2.3. Metileno mėlio gebėjimo ardyti fibriles nustatymas

Literatūroje minima, kad metileno mėlis geba išardyti τ baltymo fibriles (Wischik et al., 2018). Norint patikrinti hipotezę, ar metileno mėlis turi tokį patį poveikį SOD1 fibrilėms (tai paaiškintų fluorescencijos intensyvumo kritimą 3.5 pav. grafikuose – jei fibrilės būtų ardomos, jų kiekis mažėtų, būtų mažiau prisijungusio tioflavino T ir fluorescencijos intensyvumas būtų mažesnis), atliktas toks eksperimentas: SOD1 fibrilės 3 paras inkubuotos su junginiu koncentracijų santykiu 1:2 esant 60 °C temperatūrai, tokiomis pačiomis sąlygomis, kokiomis buvo atliekami 3.2.2 skyriuje aprašyti eksperimentai. Po inkubacijos gauti agregatai vizualizuoti AFM pagalba. 3.8a pav. nuotraukoje matoma, jog po inkubacijos mišinyje yra fibrilių,

tad daroma išvada, kad metileno mėlis per tirtą laiko tarpą jų neišardo. Pastebėtina, kad jos buvo itin linkusios sušokti į didelius darinius tarpusavyje, tad sunku buvo rasti mėginio vietą, kurioje dar būtų matomos pavienės fibrilės. Tai yra tipinis tokios sistemos (agregatų mišinio) elgesys, nes hidrofobinį paviršių turinčios fibrilės yra itin linkusios sukibti viena su kita.



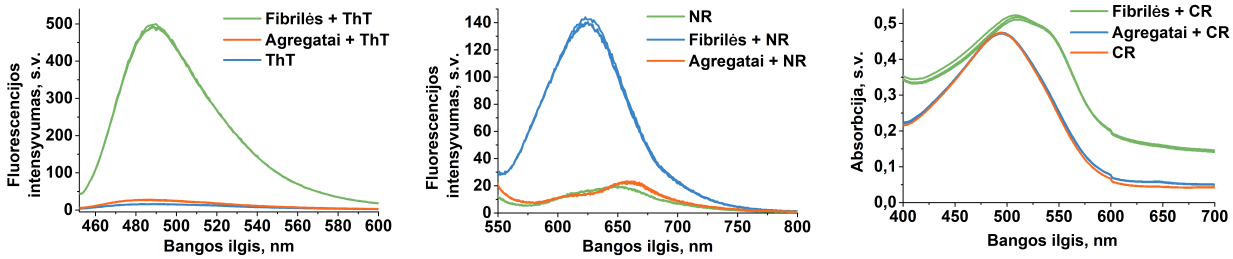
(a) Su MM inkubuotų fibrilių AFM nuotrauka

(b) SOD1 fibrilių ir baltymo FTIR spektrai

3.8 pav. Su metileno mėliu inkubuotų fibrilių morfologija ir antrinė struktūra

Siekiant sužinoti, ar metileno mėlis nedaro įtakos fibrilių antrinei struktūrai, atlikti Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos tyrimai. Baltymų antrinės struktūros tyrimuose naudojama IR spindulių sugertis amido I regione (1595 – 1700 cm^{-1}); šiuos spindulius sugeria C=O grupės ryšiai. Skirtingo bangos ilgio sugertį lemia skirtinga C=O grupės aplinka susidarant skirtingo stiprumo vandeniliniams ryšiams. Iš 3.8b pav. duomenų matoma, kad tiek baltymo, tiek fibrilių maksimalios sugerties smailės patenka į β klostėms būdingą 1640–1620 cm^{-1} sugerties ruožą (Hiramatsu and Kitagawa, 2005). Fibrilių β klostėms būdinga sugertis ties 1624 cm^{-1}, tuo tarpu β statinę turintis SOD1 baltymas pasižymi didžiausia sugertimi ties 1633 cm^{-1}. Fibrilinių β klosčių sugerties maksimumo poslinkis link mažesnio bangos ilgio spindulių atitinka literatūroje aprašomą; tai siejama su didesniu β klosčių kiekiu fibrilėse lyginant su natyviu baltymu (Barth, 2007). Fibrilėms taip pat būdingas linkio motyvas ties 1667 cm^{-1}. Lyginant su metileno mėliu inkubuotų ir neinkubuotų fibrilių spektrus, matomas nedidelis smailių ties 1633 cm^{-1} ir 1624 cm^{-1} intensyvumų skirtumas β klostėms būdingame ruože (1640–1620 cm^{-1}). Su junginiu inkubuotos fibrilės išlaiko tvirtą β klostytą struktūrą, kurios dalis vandenilinių ryšių persitvarko į silpnesnius. Apibendrinus FTIR ir AFM eksperimentų duomenis daroma išvada, kad agreguojant SOD1 baltymą susidaro β klostytą struktūrą turinčios fibrilės ir metileno mėlis jų neardo.

Atliekant amiloidų detekcijai naudojamų dažų jungimo tyrimą patikrinta anksčiau iškelta hipotezė, ar metileno mėlis fiziškai trukdo agregacijos kinetikai stebėti naudotam tioflavinui T jungtis prie fibrilių paviršiaus. Iš 3.9a pav. pateikto grafiko matoma, kad fibrilės, inkubuotos su metileno mėliu, nejungia ThT (signalas lygus dažo buferiniame tirpale signalui). Jos taip pat nejungia ir Nilo raudonojo ir Kongo raudonojo dažų (3.9b ir 3.9c pav. atitinkamai). Iš šių rezultatų daroma išvada, kad metileno mėlis ir tirti dažai konkuruoja dėl tų pačių prisijungimo



(a) Tioflavino T fluorescencijos emisijos spektrai

(b) Nilo raudonojo fluorescencijos emisijos spektrai

(c) Kongo raudonojo sugerties spektrai

3.9 pav. Fibrilių, inkubuotų su 400 µM metileno mėlio gebėjimas jungti amiloidų detekcijai naudojamus dažus

vietų ant fibrilių paviršiaus.

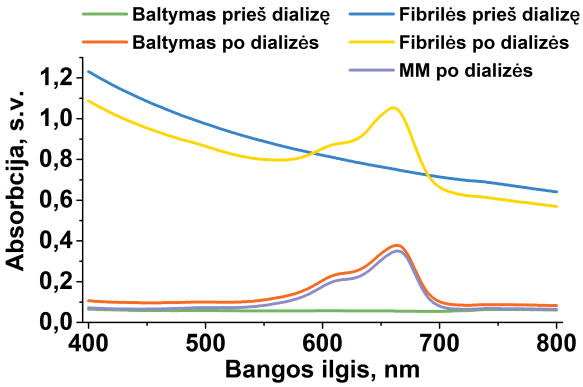
Apibendrinus šio tyrimo rezultatus ir 3.5 pav. pateiktas „kalnelių" pavidalo kinetikos kreives, daroma išvada, kad ThT signalo kritimas kreivėse susijęs su metileno mėlio ir detekcijai naudoto dažo konkurencija dėl tų pačių prisijungimo vietų. Ko gero, tioflavinas T prie fibrilių jungiasi greičiau (todėl matomas jo fluorescencijos intensyvumo didėjimas laike), tačiau fibrilių-metileno mėlio kompleksas yra stabilesnis (ThT intensyvumas laike krenta, tai rodo, kad ThT išstumiamas iš prisijungimo vietų) ir fibrilės galiausiai lieka prisijungusios metileno mėlį.

3.3. Metileno mėlio jungimasis prie SOD1 monomero ir fibrilių

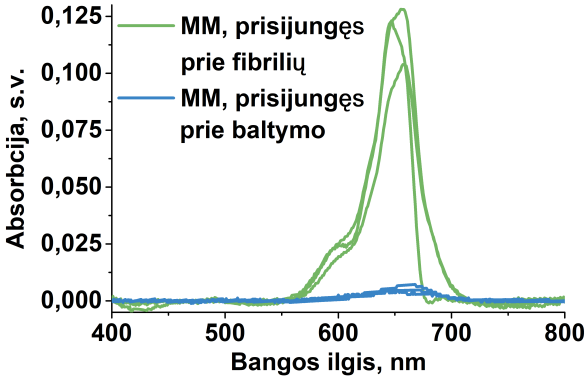
Žinant metileno mėlio poveikį SOD1 agregacijos kinetikai (3.2.1, 3.2.2 skyreliai), buvo siekiama nustatyti, prie kurių agregacijos kelyje dalyvaujančių dalelių (baltymo monomero, tarpinių oligomerų, fibrilių) tiesiogiai jungiasi metileno mėlis. Oligomerai yra tarpinės nestabilios baltymo agregacijos formos, jiems izoliuoti ir charakterizuoti vis dar trūksta metodų (Breydo and Uversky, 2015). Dėl šios priežasties šiame tyrime matuojamas tik metileno mėlio jungimasis prie stabilių dalelių – SOD1 apofermento ir šio baltymo fibrilių.

Tyrimas atliekamas naudojant mikrodializės celę (2.3.11 skyrelis). 3.10a pav. pateikti neapdoroti eksperimento duomenys. Žalia kreivė atitinka SOD1 baltymo tirpalo sugertį 400–800 nm bangų ruože prieš dializę; tuo tarpu raudona kreivė atitinka baltymo tirpalo sugertį po metileno mėlio dializės į baltymo tirpalą. Šiame spektre matomas padidėjęs šviesos sugerties intensyvumas ties 610 ir 664 nm bangos ilgiais, kuris atsiranda dėl metileno mėlio difuzijos per membraną į celės pusę, kurioje yra baltymas. Mėlyna kreivė – SOD1 fibrilių sugerties spektras prieš dializę. Spektre stebima stipri sugertis visame matuojamame bangų ruože dėl fibrilių sukeltos šviesos sklaidos. Geltona kreivė atitinka fibrilių sugertį po dializės; matomas dviejų smailių atsiradimas dėl į fibrilių pusę dializės celėje difundavusio metileno mėlio. Po dializės metileno mėlio pusėje likusio metileno mėlio spektras vaizduojamas violetine kreive; matomos tipinės junginio sugerties smailės ties 610 ir 664 nm.

Skirtuminiai sugerties spektrai pateikti 3.10b pav. Fibrilių skirtuminiame sugerties spektre (žalia kreivė) matomos dvi smailės, atitinkančios fibrilių prijungto metileno mėlio sugertį. Iš šių duomenų pagal Bugero-Lamberto-Bero dėsnį apskaičiuota, kad 50 µM fibrilių prisijungia



(a) Neapdoroti eksperimento duomenys



(b) Skirtuminiai absorbcijos spektrai. Vaizduojami duomenys iš 3 nepriklausomų pakartojimų

3.10 pav. Metileno mėlio jungimasis prie SOD1 baltymo ir fibrilių

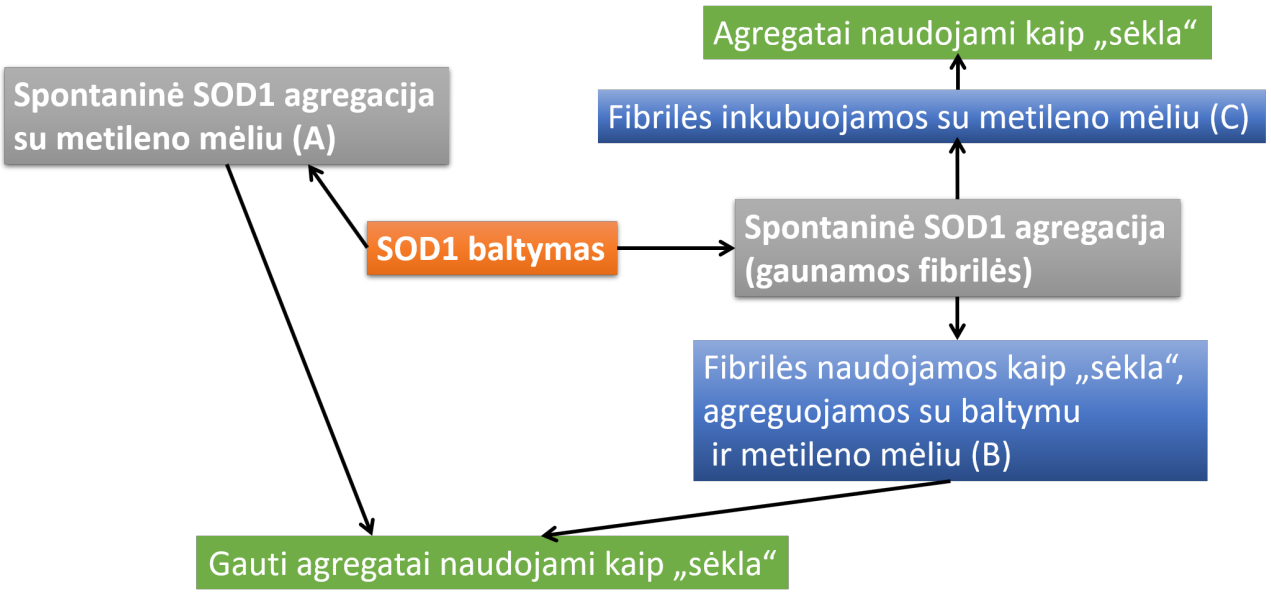
1,56 ± 0,08 µM metileno mėlio, tirpale esant 4,65 ± 0,06 µM laisvo MM. Tuo tarpu baltymo skirtuminis sugerties spektras (mėlyna kreivė) metileno mėliui būdingų smailių neturi; iš to daroma išvada, kad SOD1 apofermentas metileno mėlio nejungia.

3.4. Agregatų gebėjimo jungti SOD1 baltymo monomerus tyrimas

Atliekant tyrimą buvo tikrinamas agregatų, gautų 3.2.1, 3.2.2 ir 3.2.3 skyriuose aprašytais metodais, gebėjimas priversti agreguoti SOD1 baltymą (savireplikuotis). Tyrimo schema pateikta 3.11 pav. Trumpai, baltymas buvo agreguojamas su 400 µM metileno mėlio (baltymas:junginys santykiu 1:2) gaunant A tipo agregatus; baltymas agreguojamas su 5 % fibrilių ir 400 µM metileno mėlio (taip pat santykiu 1:2) (B agregatai) ir ruošiamos fibrilės, inkubuotos su metileno mėliu (fibrilės:junginys santykiu 1:2) (C agregatai). A, B ir C tipo agregatai naudojami kaip „sėkla" SOD1 agregacijai inicijuoti stacionariomis sąlygomis – nepurtant mėginio, kad didžiausią indėlį agregacijos procesui turėtų fibrilių elongacija. Tokio tipo eksperimentai leidžia įvertinti tiriamų agregatų gebėjimą inicijuoti baltymo fibrilizaciją išvengiant ilgos nukleacijos fazės. Kontroliniu eksperimentu šiuose tyrimuose laikoma fibrilėmis inicijuota baltymo agregacija.

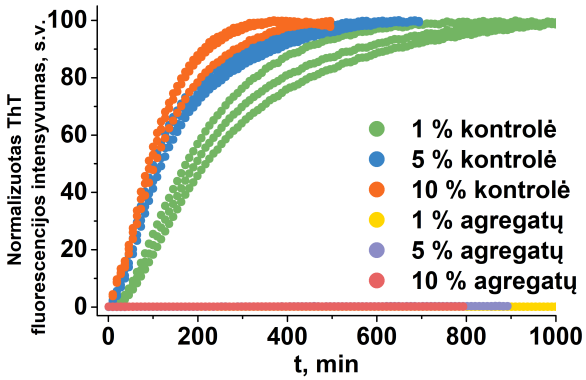
3.4.1. A tipo agregatų veikimas

Eksperimento rezultatai pateikti 3.12 pav. Su 400 µM metileno mėlio agreguotas baltymas nesugeba inicijuoti elongacijos; matavimo metu ThT fluorescencijos intensyvumas buvo lygus bazinei linijai. Per matavimo laiką (1000 min) fibrilizacijai inicijuoti neužteko nei 1 %, nei 5 %, nei 10 % „sėklos", kai tuo tarpu kontrolinis baltymo mišinys su fibrilėmis suagreguoja per 400–700 min (3.12 pav. žalia, mėlyna ir oranžinė kreivės). Kad mėginiuose po agregacijos dominuoja nefibriliniai agregatai, įrodo ir 3.13 pav. AFM nuotraukos. 3.13 pav. kairėje matyti protofilamentai ir smulkūs, apvalūs oligomerai, kurie gali būti iš SOD1 monomerų susidarę agregatai nukleacijos fazės metu. Taip pat gali būti ir agregatai, naudoti kaip „sėkla" (jie labai



3.11 pav. Agregatų savireplikacijos savybių tyrimo schema

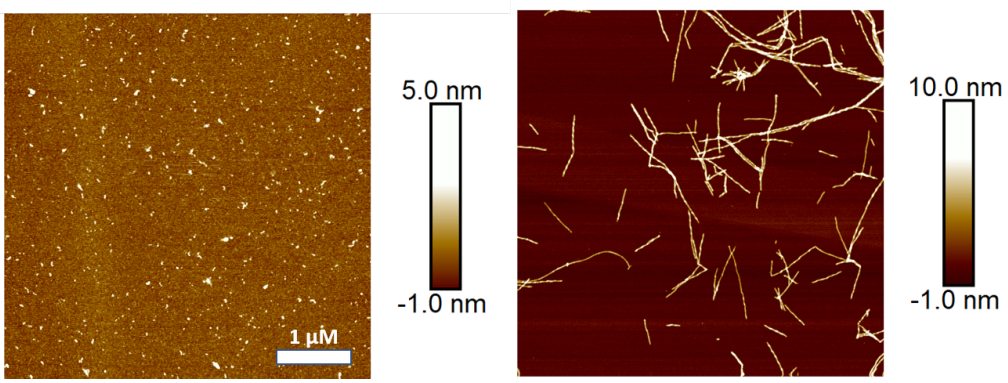
panašūs į 3.3 pav. kairėje nuotraukoje matomus agregatus). Iš šio eksperimento rezultatų aišku, kad A tipo agregatai yra prastas šablonas fibrilių elongacijai inicijuoti. Per tyrimo laiką jie taip pat nepasižymėjo savybe didėti; jei tai būtų įvykę, 3.13 pav. būtų matoma bent keletas didesnių darinių.



3.12 pav. A tipo agregatų inicijuotos SOD1 agregacijos kinetikos kreivės. Kiekvienai sąlygai atlikta po 3 pakartojimus

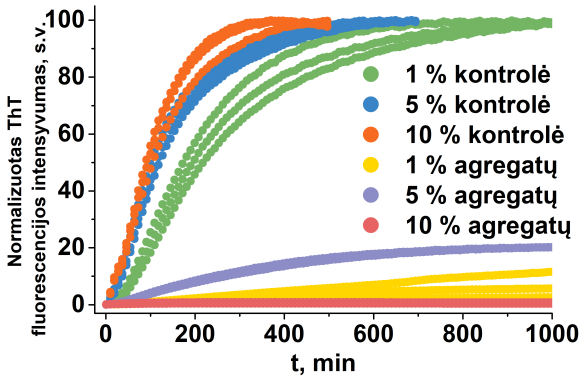
3.4.2. B tipo agregatų veikimas

Eksperimentas atliktas norint patikrinti, kaip agregatai, kurių formavimosi kinetikos kreivė yra „kalnelių” pavidalo (3.5 pav.), geba inicijuoti SOD1 monomero agregaciją. Iš 3.14 pav. pateikto grafiko matyti, jog šie agregatai silpnai inicijuoja SOD1 fibrilizaciją – apie tai rodo nedidelis ThT fluorescencijos intensyvumo kilimas mėginiuose su 1 % ir 5 % „sėklos”. Tik mėginio su 5 % „sėklos” kinetikos matavimo kreivėje matomas lėtas eksponentinis augimas. Šiame mėginyje po agregacijos rasta fibrilių ir kitokio tipo apvalių agregatų (3.15 pav. kairėje). Silpnas fluorescencijos intensyvumo padidėjimas siejamas su nuotraukoje matomų fibrilių susidarymu. Tačiau fibrilizacijos pobūdis visuose trijuose mėginiuose skiriasi (esant 1 % „sėklos”, stebimas



3.13 pav. A tipo agregatais (kairėje) ir fibrilėmis (dešinėje) inicijuotų agregatų AFM nuotraukos

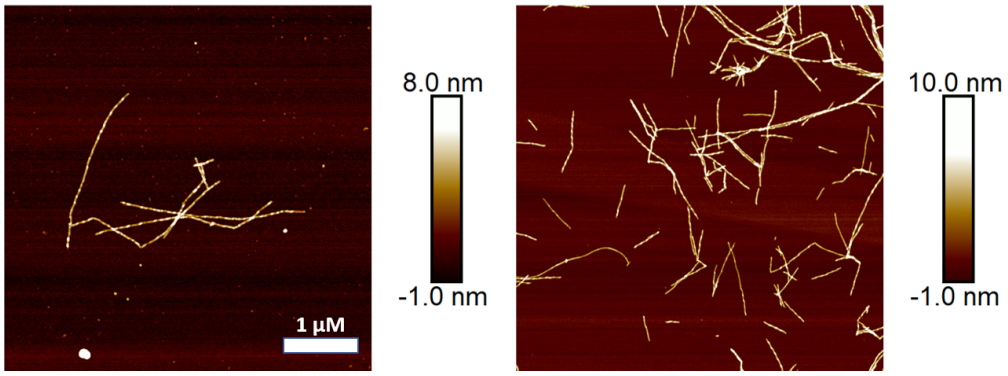
lėtas ThT dažą jungiančių agregatų susidarymas, esant 5 % – greitesnis, o esant 10 % signalas lygus bazinei linijai) ir nepriklauso nuo pridėtų agregatų koncentracijos. Daroma išvada, kad fibrilių ilgėjimas vyko dėl į mėginius atsitiktinai pakliuvusių fibrilių „sėklos" mišinyje (kadangi „sėklos" gavimui buvo naudotos fibrilės). Atsitiktinis fibrilių patekimas į mėginius įmanomas, nes jos yra pakankamai didelės dalelės, nebūtinai tolygiai pasiskirsčiusios tirpale. Ruošiant mėginius „sėkla" skiedžiama iki 100 kartų, tad nebūtinai į visus agregacijos mišinius patenka vienodas agregatų kiekis. Tuo tarpu agregacijai inicijuoti pakanka labai nedidelio fibrilių kiekio (procento dalies, skaičiuojant pagal bendrą baltymo monomerų kiekį), kad būtų stebima elongacija ir ThT signalo sustiprėjimas.



3.14 pav. B tipo agregatų inicijuotos SOD1 agregacijos kinetikos kreivės. Kiekvienai sąlygai atlikta po 3 pakartojimus

Mišinyje po agregacijos buvo rasta mažai agregatų (3.15 pav. kairėje). Šalia fibrilių matomi ir apvalūs kitokio tipo agregatai. Fibrilės galėjo atsirasti dėl atsitiktinai su „sėkla" pakliuvusių fibrilių, o apvalūs agregatai greičiausiai yra nukleacijos fazės metu susidarę oligomerai.

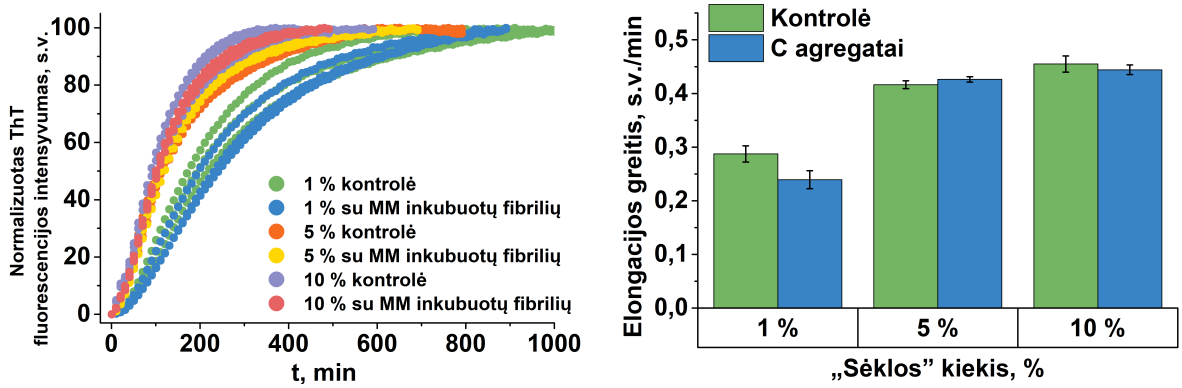
B tipo agregatai nesugebėjo inicijuoti elongacijos taip pat efektyviai, kaip ir fibrilės. Daroma išvada, kad baltymą veikiant metileno mėliu, net ir esant fibrilėms, susidaro ilgėti negalintys agregatai.



3.15 pav. B tipo agregatais (kairėje) ir fibrilėmis (dešinėje) inicijuotų agregatų AFM nuotraukos

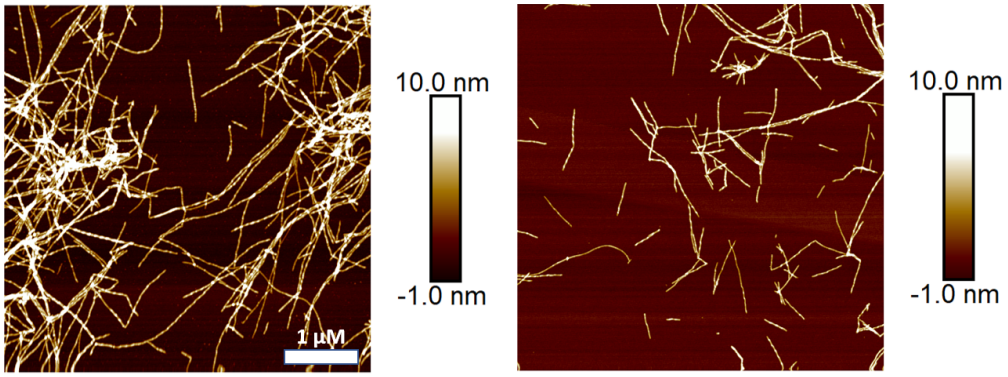
3.4.3. C tipo agregatų veikimas

Patikrintas ir su metileno mėliu inkubuotų fibrilių (3.2.3 skyrius) sugebėjimas inicijuoti SOD1 agregaciją. Iš 3.16a pav. grafiko matyti, kad su junginiu inkubuotos fibrilės SOD1 elongaciją inicijuoja taip pat gerai kaip neinkubuotos visomis eksperimento atlikimo sąlygomis (naudojant 1 %, 5 % ir 10 % „sėklos"), o elongacijos greičiai tarp mėginių ir kontrolių (3.16b pav.) paklaidų ribose sutampa. Šie rezultatai patvirtina jau anksčiau padarytą išvadą, kad metileno mėlis fibrilių neardo ir nemažina jų gebėjimo jungti baltymo monomerus – jei būtų priešingai, būtų matoma lėtesnė kreivių eksponentinio augimo fazė. 3.17 pav. kairėje matomų fibrilių morfologija nesiskiria nuo 3.17 pav. dešinėje pavaizduotų fibrilių iš kontrolinio mėginio. Daroma išvada, kad metileno mėlis įtakos jau susidariusių fibrilių morfologijai ir gebėjimui inicijuoti SOD1 elongaciją neturi.



(a) Kinetikos kreivės **(b)** Fibrilių elongacijos greitis

3.16 pav. Su metileno mėliu inkubuotomis fibrilėmis inicijuotos SOD1 agregacijos kinetika. Standartinės paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų



3.17 pav. C tipo agregatais (kairėje) ir fibrilėmis (dešinėje) inicijuotų agregatų AFM nuotraukos

3.5. Metileno mėlio įtaka insulino agregacijos kinetikai

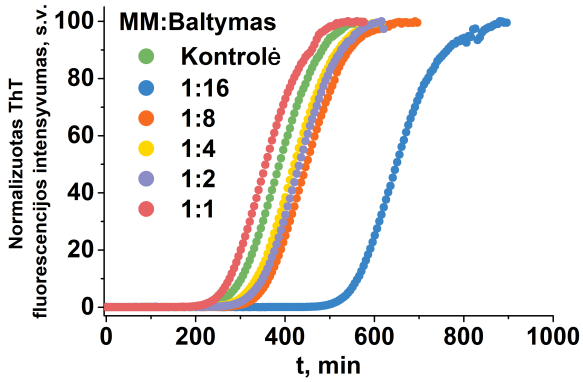
Ieškant baltymų agregacijos slopiklių, dažnai dirbama ne tik su tiesiogiai su ligomis susijusiais, bet ir su modeliniais baltymais, su kuriais darbas yra paprastesnis, ir kurie irgi agreguoja į amiloidines fibriles. Kadangi fibrilėms būdingos panašios fizikocheminės savybės, manoma, kad galima rasti slopiklį, slopinantį visų amiloidinių baltymų agregaciją (Chiti and Dobson, 2017; Sneideris et al., 2015a). Dėl šios priežasties metileno mėlio veikimui patikrinti pasirinktas dar vienas baltymas – žmogaus insulinas. Eksperimentai su šiuo baltymu padeda atsakyti į klausimus, ar junginys veikia specifiškai būtent SOD1 agregaciją, ar jo veikimas grįstas bendro pobūdžio sąveikomis su įvairiais baltymais.

3.5.1. Metileno mėlio įtaka insulino agregacijai pH 1,8 sąlygomis

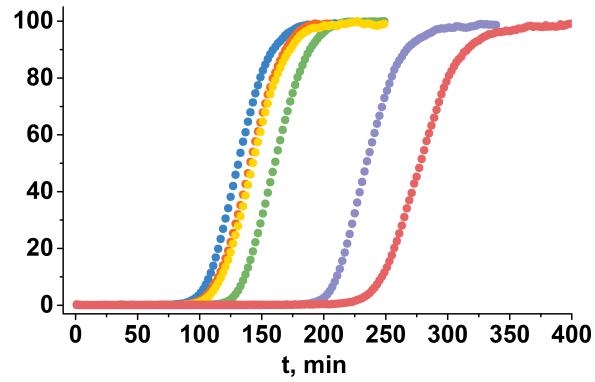
Atlikti spontaninės insulino agregacijos su metileno mėliu tyrimai 20 % acto rūgštyje su 100 mM NaCl (pH 1,8). Tokia agregacijos terpė pasirinkta žinant, kad šiomis sąlygomis insulinas yra monomero formos, o tirpale esanti druska panaikina nepalankią elektrostatinę sąveiką žemame pH ir pagreitina agregaciją (Nielsen et al., 2001).

Iš 3.18 pav. pateiktų grafikų matoma, kad metileno mėlis neturi aiškios įtakos insulino agregacijos kinetikai. Esant tam tikroms slopiklio koncentracijoms (1:1 ir 1:2) ir 200 µM baltymo koncentracijai, stebimas stiprus slopinimo efektas (agregacijos puslaikis padidėja 2 kartus (3.18b, 3.18c, P.1a pav.)). Tačiau toks poveikis nestebimas esant kitoms baltymo koncentracijoms. Visų tirtų baltymo koncentracijų atvejais nėra aiškios priklausomybės tarp slopinimo efekto stiprumo ir junginio koncentracijos; kai kuriais atvejais (pvz. esant 100 µM baltymo, 3.18c pav.) didėjant slopiklio koncentracijai iki tam tikros vertės, agregacijos puslaikiai trumpėja – stebimas agregacijos greitėjimas. Rezultatų atsikartojamumas tarp techninių pakartojimų esant žemoms insulino koncentracijoms (iki 200 µM), nėra itin geras; tai būdinga daugeliui amiloidinių baltymų ir yra susiję su skirtingų agregacijos kelių konkuravimu tarpusavyje (Crespo et al., 2016).

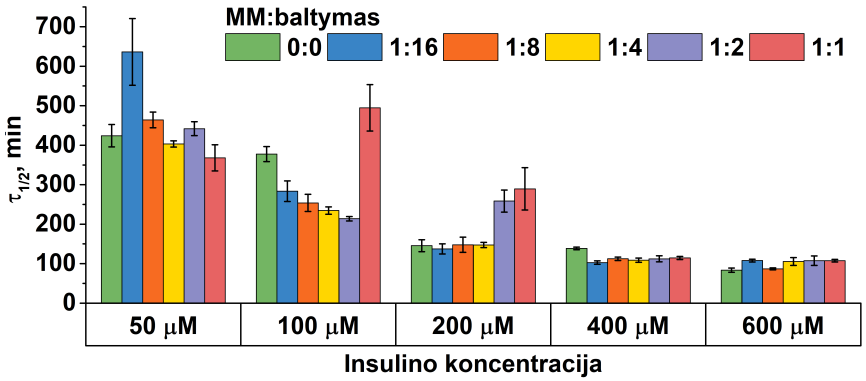
Atlikus insulino agregatų morfologijos tyrimus atominės jėgos mikroskopu paaiškėjo, kad tiek baltymą agreguojant su metileno mėliu, tiek be jo, susidaro panašios morfologijos fibrilės (3.19 pav.).



(a) 50 µM insulino



(b) 200 µM insulino



(c) Agregacijos puslaikiai

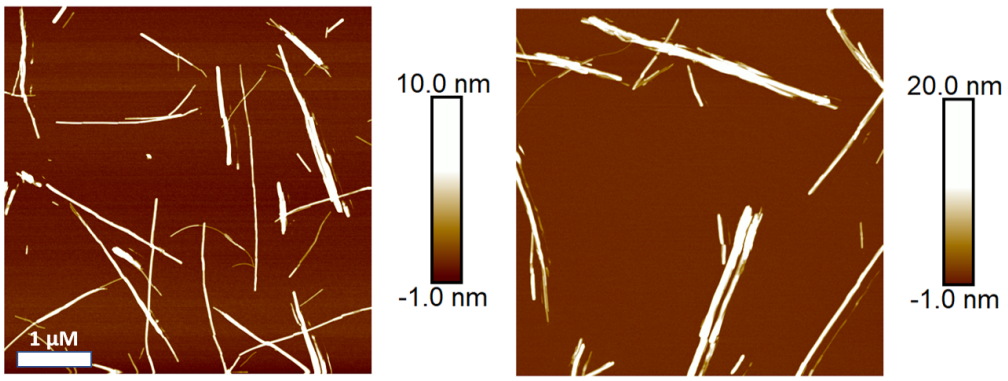
3.18 pav. Spontaninė insulino agregacija su metileno mėliu 20 % acto rūgštyje su 100 mM NaCl. Standartinės paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų

Žinoma, kad metileno mėlis lėtina jaučio insulino agregaciją (Mukherjee et al., 2018). Jaučio insulinas nuo žmogaus insulino skiriasi tik 3 aminorūgštimis; tačiau šis, nors ir nedidelis, 3 aminorūgščių skirtumas, gali lemti tai, kad jaučio insulino agregaciją junginys slopina, tuo tarpu apie MM poveikį žmogaus insulinui to pasakyti negalima. Kita vertus, minėtame literatūroje aprašytame tyrime buvo naudotos gerokai didesnės metileno mėlio koncentracijos (baltymas:junginys santykiu 1:50 – 1:500), o pats slopinimo efektas nebuvo itin didelis.

Apibendrinant agregacijos kinetikos ir fibrilių morfologijos tyrimus daroma išvada, kad metileno mėlis neturi įtakos žmogaus insulino agregacijos kinetikai ir fibrilių morfologijai 20 % acto rūgšties su 100 mM NaCl agregacijos terpėje.

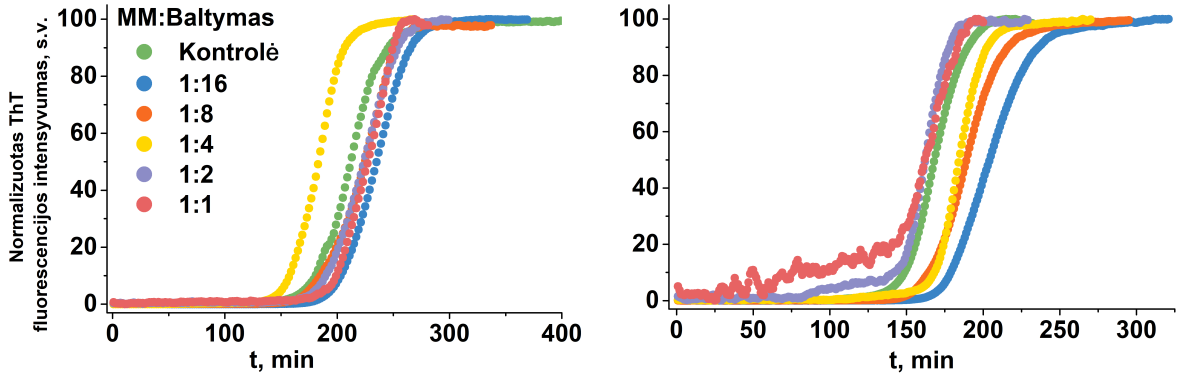
3.5.2. Metileno mėlio įtaka insulino agregacijai pH 2 sąlygomis

Atliktas spontaninės insulino agregacijos su metileno mėliu tyrimas 100 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, kurio pH yra 2. Žinoma, kad šiomis sąlygomis esant baltymo koncentracijai iki 258 µM (1,5 mg/ml) insulinas yra dimero formos (Nielsen et al., 2001). Esant aukštesnei koncentracijai, dominuoja tetramerinė insulino forma. Šiomis sąlygomis insulinas agreguoja lėčiau nei acto rūgštyje, nes atsiranda papildomas žingsnis agregacijos mechanizme – dimerai/tetramerai turi išsiskaidyti į monomerus; tik tada jie gali agreguoti į fibriles (1.6 skyrius). Kadangi nuo aplinkos sąlygų priklauso baltymo agregacijos mechanizmas, tiriamas slopiklis skirtingomis sąlygomis gali veikti kitaip.



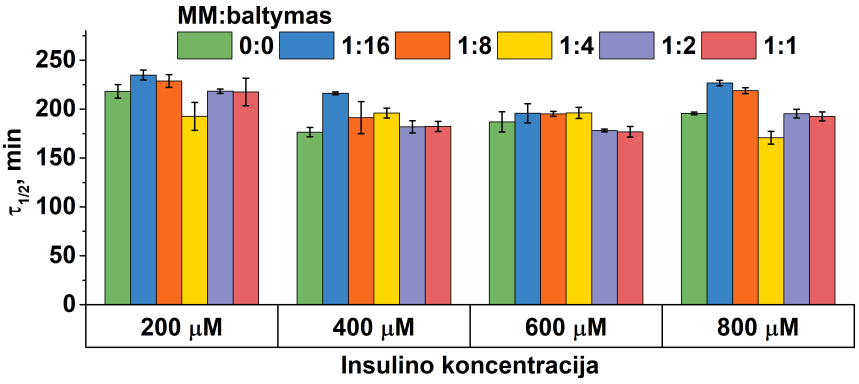
3.19 pav. Insulino fibrilių, suformuotų 20 % acto rūgštyje su 100 mM NaCl, AFM nuotraukos. Kairėje – insulinas agreguotas su metileno mėliu, dešinėje – be

Deja, atlikus tyrimą kitoks metileno mėlio poveikis, lyginant su tyrimu, kai buvo naudota acto rūgštis, insulino agregacijai nepastebėtas (3.20, P.2 pav.). Esant visoms insulino koncentracijoms, agregacijos puslaikiai tarp mėginių su metileno mėliu ir be jo paklaidų ribose sutampa (3.20c pav.). Daroma išvada, kad metileno mėlis neveikia nei bendro insulino agregacijos mechanizmo, kuomet baltymo monomerai sudaro agregacijos branduolį ir jungiasi į fibriles, nei papildomo žingsnio, susijusio su tetrameras/dimeras – monomeras pusiausvyra.



(a) 200 µM insulino

(b) 400 µM insulino

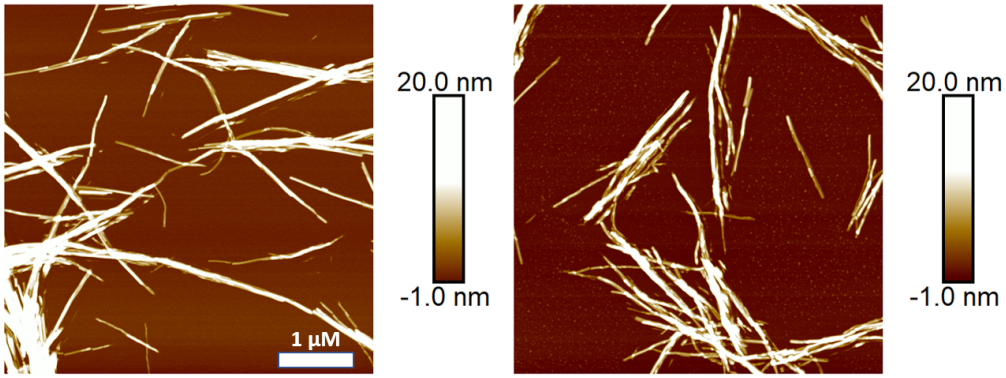


(c) Agregacijos puslaikiai

3.20 pav. Spontaninė insulino agregacija su metileno mėliu 100 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, pH 2. Standartinės paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų

Atlikus agregatų morfologijos tyrimą, ryškių skirtumų tarp insulino fibrilių nepastebėta (3.21 pav.). Tiek kontroliniame, tiek mėginyje su metileno mėliu, matomos ilgos, storos, kelių

mikrometrų ilgio fibrilės. Toks rezultatas yra tikėtinas, nes nesikeičiant agregacijos mechanizmui, fibrilių morfologija taip pat išlieka nepakitusi. Bendra išvada remiantis šio eksperimento duomenimis – metileno mėlis nedaro įtakos žmogaus insulino agregacijai, kai aplinkos pH yra 2.



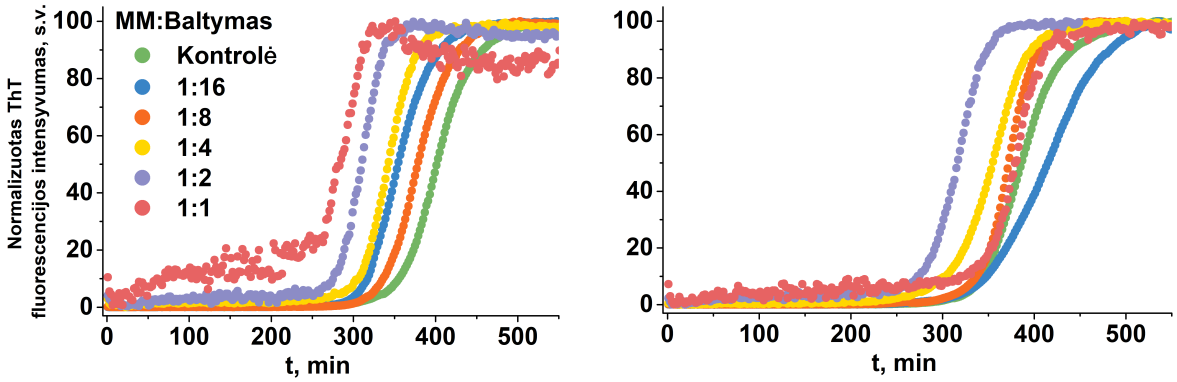
3.21 pav. Insulino fibrilių, suformuotų natrio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 2), AFM nuotraukos. Kairėje – insulinas agreguotas su metileno mėliu, dešinėje – be

3.5.3. Metileno mėlio įtaka insulino agregacijai pH 2,4 sąlygomis

Taip pat atliktas spontaninės insulino agregacijos su metileno mėliu tyrimas 100 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, kurio pH yra 2,4. Šiomis sąlygomis insulino monomeras-tetrameras pusiausvyra taip pat yra paslinkta į tetramerų pusę (Ziaunys et al., 2018). Be to, esant pH 2,4 susidaro kitokią antrinę struktūrą turinčios fibrilės nei aplinkoje, kurios pH 2 (Sneideris et al., 2015b) – tai vyksta dėl skirtingų insulino fibrilių kamienų formavimosi.

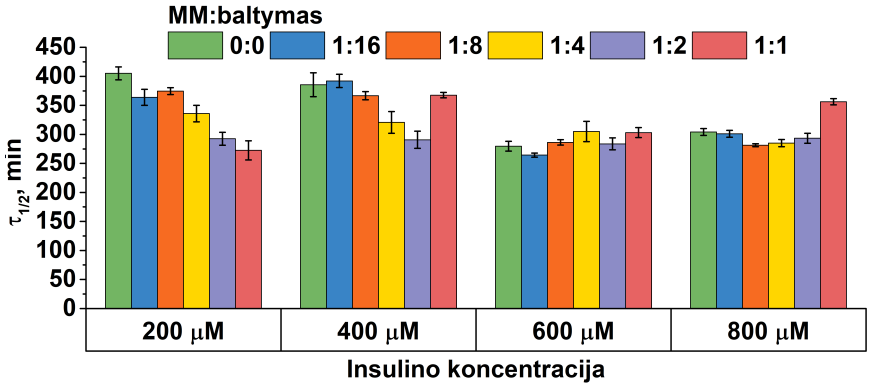
Iš 3.22 ir P.3 pav. pateiktų rezultatų matoma, kad tirtomis sąlygomis metileno mėlis neturi aiškios įtakos insulino agregacijos kinetikai. Esant mažai baltymo koncentracijai (200 µM), junginys nežymiai greitina agregaciją (puslaikis sutrumpėja 130-čia minučių, 3.22c pav.), tuo tarpu esant didesnėms koncentracijoms junginio poveikis tampa nebeaiškus; agregacijos puslaikiai beveik visais atvejais sutampa su kontrolinio mėginio puslaikiu.

Fibrilių morfologijos tyrimas taip pat neatskleidė skirtumų tarp fibrilių, gautų insuliną inkubuojant su metileno mėliu ir be jo (3.23 pav.).



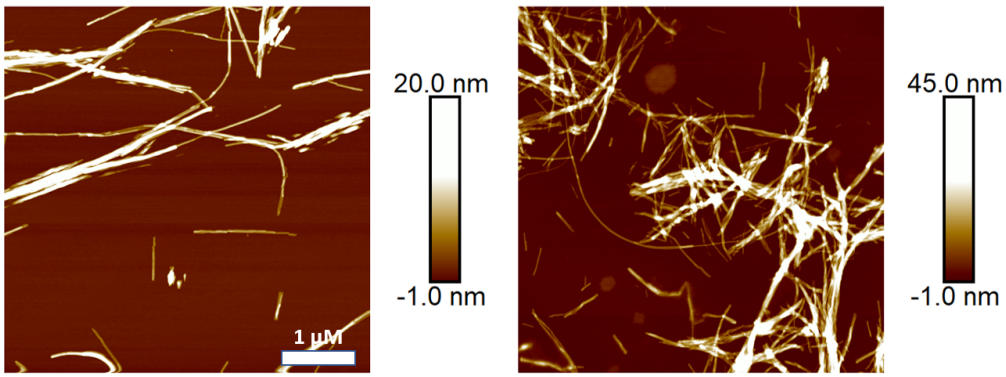
(a) 200 µM insulino

(b) 400 µM insulino



(c) Agregacijos puslaikiai

3.22 pav. Spontaninė insulino agregacija su metileno mėliu 100 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, pH 2,4. Standartinės paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų



3.23 pav. Insulino fibrilių, suformuotų natrio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 2,4), AFM nuotraukos. Kairėje – insulinas agreguotas su metileno mėliu, dešinėje – be

Iš šio tyrimo daroma išvada, kad metileno mėlis neveikia žmogaus insulino agregacijos natrio fosfatiniame buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, kurio pH 2,4.

4. APIBENDRINIMAS

Apibendrinus SOD1 agregacijos su metileno mėliu tyrimų rezultatus, galima teigti, jog metileno mėlis dalyvauja šio baltymo agregacijos procese nuo pat pirmųjų žingsnių ir nukreipia superoksido dismutazės I agregaciją neamiloidiniu keliu (angl. *off-pathway aggregation*). Tai matoma iš pakitusios agregatų morfologijos ir šių agregatų nesugebėjimo savireplikuotis. Molekulė jungiasi prie SOD1 fibrilių, nekeisdama jų struktūros ir morfologijos; jungimasis ko gero vyksta dėl aromatinių metileno mėlio žiedų sąveikos su aromatinėmis aminorūgštimis. Tuo tarpu su baltymo monomeru metileno mėlio jungimasis nenustatytas. Metileno mėlis įtaką agregacijai gali daryti jungdamasis prie tarpinių metastabilių oligomerų; tačiau tai reiktų įrodyti sukūrus efektyvią metodiką šiems oligomerams, kurių įvairovė yra itin didelė, izoliuoti. Metileno mėlis gali veikti ir kaip cisteino šoninių grupių oksidatorius (Akoury et al., 2013). SOD1 monomeras turi 4 cisteino aminorūgštis, kurių oksidacija gali trukdyti tarpmolekulinių β klosčių susidarymui. Norint patikrinti šią hipotezę, reiktų atlikti papildomus struktūrinius SOD1 baltymo tyrimus BMR ir masių spektrometrijos metodais.

Tuo tarpu insulino agregacijos metileno mėlis neslopina. Skirtingas junginio poveikis abiems baltymams rodo, kad nors amiloidinių baltymų agregacijai būdingas bendras mechanizmas, specifinių molekulių poveikis jiems nebūtinai toks pats. Tai rodo, kad ieškant baltymų agregacijos mechanizmą veikiančių vaistų, negalima pasikliauti vien tyrimais, atliktais su modeliniais baltymais. Modelinio baltymo agregaciją veikiantis junginys nebūtinai veiks su ligomis susijusių baltymų agregaciją, todėl ieškant vaistų, verta iškart bandymus atlikti su su ligomis susijusiais baltymais.

IŠVADOS

1. Darbo metu išgryninta 1207 mg rekombinantinės superoksido dismutazės I baltymo.
2. Metileno mėlis veikia SOD1 agregacijos kinetiką ir poveikis priklauso nuo koncentracijos, tuo tarpu insulino agregacijos kinetikai junginys įtakos nedaro.
3. Metileno mėlis keičia SOD1 agregatų morfologiją, dalyvaudamas agregacijoje *in situ*, bet nekeičia jau suformuotų fibrilių struktūros ir morfologijos.
4. Tirtomis eksperimento sąlygomis metileno mėlis jungiasi prie SOD1 fibrilių, bet nesijungia prie baltymo.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

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

Ahn, J. S., Lee, J.-H., Kim, J.-H., and Paik, S. R. (2007). Novel method for quantitative determination of amyloid fibrils of α-synuclein and amyloid β/A4 protein by using resveratrol. *Analytical Biochemistry*, 367(2):259 – 265.

Akoury, E., Pickhardt, M., Gajda, M., Biernat, J., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2013). Mechanistic basis of phenothiazine-driven inhibition of tau aggregation. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(12):3511–3515.

Alam, P., Siddiqi, K., Chturvedi, S. K., and Khan, R. H. (2017). Protein aggregation: from background to inhibition strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103:208 – 219.

Anzai, I., Toichi, K., Tokuda, E., Mukaiyama, A., and Akiyama, S. (2016). Screening of drugs inhibiting in vitro oligomerization of Cu/Zn-superoxide dismutase with a mutation causing amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3(August):1–11.

Arora, A., Ha, C., and Park, C. B. (2004). Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Letters*, 564(1-2):121–125.

Arosio, P., Knowles, T. P. J., and Linse, S. (2015). On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17:7606–7618.

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

Aslund, A., Sigurdson, C. J., Klingstedt, T., Grathwohl, S., Bolmont, T., Dickstein, D. L., Glimsdal, E., Prokop, S., Lindgren, M., Konradsson, P., Holtzman, D. M., Hof, P. R., Heppner, F. L., Gandy, S., Jucker, M., Aguzzi, A., Hammarström, P., and Nilsson, K. P. R. (2009). Novel pentameric thiophene derivatives for in vitro and in vivo optical imaging of a plethora of protein aggregates in cerebral amyloidoses. *ACS Chemical Biology*, 4(8):673–684.

Audet, J. N., Soucy, G., and Julien, J. P. (2012). Methylene blue administration fails to confer neuroprotection in two amyotrophic lateral sclerosis mouse models. *Neuroscience*, 209:136 – 143.

Banci, L., Bertini, I., Blaževitš, O., Calderone, V., Cantini, F., Mao, J., Trapananti, A., Vieru, M., Amori, I., Cozzolino, M., and Carrì, M. T. (2012). Interaction of cisplatin with human superoxide dismutase. *Journal of the American Chemical Society*, 134(16):7009–7014.

Banci, L., Bertini, I., D'Amelio, N., Gaggelli, E., Libralesso, E., Matecko, I., Turano, P., and Valentine, J. S. (2005). Fully metallated S134N Cu, Zn-superoxide dismutase displays abnormal mobility and intermolecular contacts in solution. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43):35815–35821.

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

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9):1073 – 1101.

Benmohamed, R., Arvanites, A. C., Kim, J., Ferrante, R. J., Silverman, R. B., Morimoto, R. I., and Kirsch, D. R. (2011). Identification of compounds protective against G93A-SOD1 toxicity for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 12(2):87–96.

Bhatia, N. K., Srivastava, A., Katyal, N., Jain, N., Khan, M. A. I., Kundu, B., and Deep, S. (2015). Curcumin binds to the pre-fibrillar aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and alters its amyloidogenic pathway resulting in reduced cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(5):426–436.

Biancalana, M. and Koide, S. (2010). Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(7):1405 – 1412.

Brelstaff, J., Ossola, B., Neher, J. J., Klingstedt, T., Nilsson, K. P. R., Goedert, M., Spillantini, M. G., and Tolkovsky, A. M. (2015). The fluorescent pentameric oligothiophene pFTAA identifies filamentous tau in live neurons cultured from adult P301S tau mice. *Frontiers in Neuroscience*, 9:184.

Breydo, L. and Uversky, V. N. (2015). Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers. *FEBS Letters*, 589(19):2640 – 2648.

Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Saccon, R. A., Fratta, P., and Fisher, E. M. C. (2014). SOD1 function and its implications for amyotrophic lateral sclerosis pathology. *The Neuroscientist*, 21(5):519–529.

Chan, P. K., Chattopadhyay, M., Sharma, S., Souda, P., Gralla, E. B., Borchelt, D. R., Whitelegge, J. P., and Valentine, J. S. (2013). Structural similarity of wild-type and ALS-mutant superoxide dismutase-1 fibrils using limited proteolysis and atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27):10934–10939.

Chiti, F. and Dobson, C. M. (2017). Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1):27–68.

Civitelli, L., Sandin, L., Nelson, E., Khattak, S. I., Brorsson, A.-C., and Kågedal, K. (2016). The luminescent oligothiophene p-FTAA converts toxic Aβ 1–42 species into nontoxic amyloid fibers with altered properties. *Journal of Biological Chemistry*, 291(17):9233–9243.

Congdon, E. E., Wu, J. W., Myeku, N., Figueroa, Y. H., Herman, M., Marinec, P. S., Gestwicki, J. E., Dickey, C. A., Yu, W. H., and Duff, K. E. (2012). Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy*, 8(4):609–622.

Cook, C., Zhang, Y.-J., fei Xu, Y., Dickson, D. W., and Petrucelli, L. (2008). TDP-43 in neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(7):969–978.

Crespo, R., Villar-Alvarez, E., Taboada, P., Rocha, F. A., Damas, A. M., and Martins, P. M. (2016). What can the kinetics of amyloid fibril formation tell about off-pathway aggregation? *Journal of Biological Chemistry*, 291(4):2018–2032.

Crowe, A., James, M. J., Lee, V. M.-Y., Smith, A. B., Trojanowski, J. Q., Ballatore, C., and Brunden, K. R. (2013). Aminothienopyridazines and methylene blue affect tau fibrillization via cysteine oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(16):11024–11037.

Cruz, M. P. (2018). Edaravone (Radicava): a novel neuroprotective agent for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacy and Therapeutics*, 43(1):25–28.

Dash, R. P., Babu, R. J., and Srinivas, N. R. (2018). Two decades-long journey from riluzole to edaravone: revisiting the clinical pharmacokinetics of the only two amyotrophic lateral sclerosis therapeutics. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(11):1385–1398.

Dibaj, P., Zschüntzsch, J., Steffens, H., Scheffel, J., Göricke, B., Weishaupt, J. H., Le Meur, K., Kirchhoff, F., Hanisch, U.-K., Schomburg, E. D., and Neusch, C. (2012). Influence of methylene blue on microglia-induced inflammation and motor neuron degeneration in the SOD1 G93A model for ALS. *PLOS ONE*, 7(8):1–13.

Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*, 47(6):233S–241S.

Eisenberg, D. S. and Sawaya, M. R. (2017). Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1):69–95.

Elam, J. S., Taylor, A. B., Strange, R., Antonyuk, S., Doucette, P. A., Rodriguez, J. A., Hasnain, S. S., Hayward, L. J., Valentine, J. S., Yeates, T. O., and Hart, P. J. (2003). Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. *Nature Structural Biology*, 10:461.

Fang, T., Al Khleifat, A., Meurgey, J.-H., Jones, A., Leigh, P. N., Bensimon, G., and Al-Chalabi, A. (2018). Stage at which riluzole treatment prolongs survival in patients with

amyotrophic lateral sclerosis: a retrospective analysis of data from a dose-ranging study. *The Lancet Neurology*, 17(5):416–422.

Gauthier, S., Feldman, H. H., Schneider, L. S., Wilcock, G. K., Frisoni, G. B., Hardlund, J. H., Moebius, H. J., Bentham, P., Kook, K. A., Wischik, D. J., Schelter, B. O., Davis, C. S., Staff, R. T., Bracoud, L., Shamsi, K., Storey, J. M. D., Harrington, C. R., and Wischik, C. M. (2016). Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet*, 388(10062):2873–2884.

Getzoff, E. D., Tainer, J. A., Weiner, P. K., Kollman, P. A., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1983). Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, 306:287.

Gibson, T. J. and Murphy, R. M. (2006). Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides. *Protein Science*, 15(5):1133–1141.

Godyn, J., Jonczyk, J., Panek, D., and Malawska, B. (2016). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological Reports*, 68(1):127 – 138.

Gong, H., He, Z., Peng, A., Zhang, X., Cheng, B., Sun, Y., Zheng, L., and Huang, K. (2014). Effects of several quinones on insulin aggregation. *Scientific Reports*, 4:5648.

Guo, T., Noble, W., and Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 133(5):665–704.

Gupta, Y., Singla, G., and Singla, R. (2015). Insulin-derived amyloidosis. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 19(1):174–177.

Hilgenfeld, R., Seipke, G., Berchtold, H., and Owens, D. R. (2014). The evolution of insulin glargine and its continuing contribution to diabetes care. *Drugs*, 74(8):911–927.

Hink, H. U., Santanam, N., Dikalov, S., McCann, L., Nguyen, A. D., Parthasarathy, S., Harrison, D. G., and Fukai, T. (2002). Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(9):1402–1408.

Hiramatsu, H. and Kitagawa, T. (2005). FT-IR approaches on amyloid fibril structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1753(1):100 – 107.

Hochgräfe, K., Sydow, A., Matenia, D., Cadinu, D., Könen, S., Petrova, O., Pickhardt, M., Goll, P., Morellini, F., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2015). Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human tau. *Acta Neuropathologica Communications*, 3(1):25.

Hosokawa, M., Arai, T., Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Yamashita, M., Akiyama, H., and Hasegawa, M. (2012). Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLOS ONE*, 7(12):1–9.

Jaiswal, M. K. (2019). Riluzole and edaravone: a tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Medicinal Research Reviews*, 39(2):733–748.

Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L., and Fink, A. L. (2001). Is Congo red an amyloid-specific dye? *Journal of Biological Chemistry*, 276(25):22715–22721.

Kumar, A., Narayanan, K., Chaudhary, R. K., Mishra, S., Kumar, S., Vinoth, K. J., Padmanabhan, P., and Gulyás, B. (2017). Current perspective of stem cell therapy in neurodegenerative and metabolic diseases. *Molecular Neurobiology*, 54(9):7276–7296.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.

Levy-Sakin, M., Shreberk, M., Daniel, Y., and Gazit, E. (2009). Targeting insulin amyloid assembly by small aromatic molecules: toward rational design of aggregation inhibitors. *Islets*, 1(3):210–215.

Lotz, G. P. and Legleiter, J. (2013). The role of amyloidogenic protein oligomerization in neurodegenerative disease. *Journal of Molecular Medicine*, 91(6):653–664.

Lougheed, R. and Turnbull, J. (2011). Lack of effect of methylene blue in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLOS ONE*, 6(10):1–6.

Malisauskas, R., Botyriute, A., Cannon, J. G., and Smirnovas, V. (2015). Flavone derivatives as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation. *PLOS ONE*, 10(3):1–14.

McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22):6049–6055.

Melo, E., Faria, T., Martins, L., Gonçalves, A., and Cabral, J. (2001). Cutinase unfolding and stabilization by trehalose and mannosylglycerate. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 42(4):542–552.

Miller, A.-F. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586(5):585 – 595.

Miller, R. G., Mitchell, J. D., and Moore, D. H. (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3):CD001447.

Mishra, R., Sjolander, D., and Hammarstrom, P. (2011). Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile red. *Molecular BioSystems*, 7:1232–1240.

Mukherjee, M., Jana, J., and Chatterjee, S. (2018). A small molecule impedes insulin fibrillation: another new role of phenothiazine derivatives. *ChemistryOpen*, 7(1):68–79.

Muzaffar, M. and Ahmad, A. (2011). The mechanism of enhanced insulin amyloid fibril formation by NaCl is better explained by a conformational change model. *PLoS ONE*, 6(11):e27906.

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

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

Nowak, R. J., Cuny, G. D., Choi, S., Lansbury, P. T., and Ray, S. S. (2010). Improving binding specificity of pharmacological chaperones that target mutant superoxide dismutase-1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis using computational methods. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(7):2709–2718.

O'Hara, D. M., Kalia, S. K., and Kalia, L. V. (2018). Emerging disease-modifying strategies targeting α-synuclein for the treatment of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, 175(15):3080–3089.

Ow, S.-Y., Bekard, I., Blencowe, A., Qiao, G. G., and Dunstan, D. E. (2015). A generic class of amyloid fibril inhibitors. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(7):1350–1359.

Oz, M., Lorke, D. E., Hasan, M., and Petroianu, G. A. (2011). Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Medicinal Research Reviews*, 31(1):93–117.

Pansarasa, O., Bordoni, M., Diamanti, L., Sproviero, D., Gagliardi, S., and Cereda, C. (2018). SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis: "ambivalent" behavior connected to the disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5).

Perry, J., Shin, D., Getzoff, E., and Tainer, J. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(2):245 – 262.

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

Pinotsi, D., Buell, A. K., Dobson, C. M., Kaminski Schierle, G. S., and Kaminski, C. F. (2013). A label-free, quantitative assay of amyloid fibril growth based on intrinsic fluorescence. *ChemBioChem*, 14(7):846–850.

Porat, Y., Abramowitz, A., and Gazit, E. (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical Biology & Drug Design*, 67(1):27–37.

Rajamohamedsait, H. B. and Sigurdsson, E. M. (2012). Histological staining of amyloid and pre-amyloid peptides and proteins in mouse tissue. In Sigurdsson, E. M., Calero, M., and Gasset, M., editors, *Amyloid Proteins: Methods and Protocols*, pages 411–424. New York: Humana Press.

Ray, S. S., Nowak, R. J., Brown, R. H., and Lansbury, P. T. (2005). Small-molecule-mediated stabilization of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants against unfolding and aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(10):3639–3644.

Rothstein, J. D. (2017). Edaravone: a new drug approved for ALS. *Cell*, 171(4):725.

Sawyer, E. B., Claessen, D., Gras, S. L., and Perrett, S. (2012). Exploiting amyloid: how and why bacteria use cross-β fibrils. *Biochemical Society Transactions*, 40(4):728–734.

Schirmer, R. H., Adler, H., Pickhardt, M., and Mandelkow, E. (2011). Lest we forget you - methylene blue... *Neurobiology of Aging*, 32(12):2325.e7 – 2325.e16.

Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A.-F., Teixeira, M., and Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Reviews*, 114(7):3854–3918.

Siddiqi, M. K., Alam, P., Iqbal, T., Majid, N., Malik, S., Nusrat, S., Alam, A., Ajmal, M. R., Uversky, V. N., and Khan, R. H. (2018). Elucidating the inhibitory potential of designed peptides against amyloid fibrillation and amyloid associated cytotoxicity. *Frontiers in Chemistry*, 6:311.

Smith, B. N., Topp, S. D., Fallini, C., Shibata, H., Chen, H.-J., Troakes, C., King, A., Ticozzi, N., Kenna, K. P., Soragia-Gkazi, A., Miller, J. W., Sato, A., Dias, D. M., Jeon, M., Vance, C., Wong, C. H., de Majo, M., Kattuah, W., Mitchell, J. C., Scotter, E. L., Parkin, N. W., Sapp, P. C., Nolan, M., Nestor, P. J., Simpson, M., Weale, M., Lek, M., Baas, F., Vianney de Jong, J. M., ten Asbroek, A. L. M. A., Redondo, A. G., Esteban-Pérez, J., Tiloca, C., Verde, F., Duga, S., Leigh, N., Pall, H., Morrison, K. E., Al-Chalabi, A., Shaw, P. J., Kirby, J., Turner, M. R., Talbot, K., Hardiman, O., Glass, J. D., De Belleroche, J., Maki, M., Moss, S. E., Miller, C., Gellera, C., Ratti, A., Al-Sarraj, S., Brown, R. H., Silani, V., Landers, J. E., and Shaw, C. E. (2017). Mutations in the vesicular trafficking protein annexin A11 are associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Science Translational Medicine*, 9(388).

Sneideris, T., Baranauskiene, L., Cannon, J. G., Rutkiene, R., Meskys, R., and Smirnovas, V. (2015a). Looking for a generic inhibitor of amyloid-like fibril formation among flavone derivatives. *PeerJ*, 3:e1271.

Sneideris, T., Darguzis, D., Botyriute, A., Grigaliunas, M., Winter, R., and Smirnovas, V. (2015b). pH-driven polymorphism of insulin amyloid-like fibrils. *PLOS ONE*, 10(8):1–13.

Sontag, E. M., Lotz, G. P., Agrawal, N., Tran, A., Aron, R., Yang, G., Necula, M., Lau, A., Finkbeiner, S., Glabe, C., Marsh, J. L., Muchowski, P. J., and Thompson, L. M. (2012). Methylene blue modulates huntingtin aggregation intermediates and is protective in Huntington's disease models. *Journal of Neuroscience*, 32(32):11109–11119.

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

Stack, C., Jainuddin, S., Elipenahli, C., Gerges, M., Starkova, N., Starkov, A. A., Jové, M., Portero-Otin, M., Launay, N., Pujol, A., Kaidery, N. A., Thomas, B., Tampellini, D., Beal, M. F., and Dumont, M. (2014). Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*, 23(14):3716–3732.

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

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1):207 – 234.

Sugaya, K. and Vaidya, M. (2018). *Stem Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases*, pages 61–84. Cham: Springer International Publishing.

Surmacz-Chwedoruk, W., Babenko, V., and Dzwolak, W. (2014). Master and slave relationship between two types of self-propagating insulin amyloid fibrils. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(47):13582–13589.

Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S.-i., Iwatsubo, T., Goedert, M., and Hasegawa, M. (2005). Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9):7614–7623.

Taylor, J. P., Brown Jr, R. H., and Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, 539:197.

Vaccaro, A., Patten, S. A., Aggad, D., Julien, C., Maios, C., Kabashi, E., Drapeau, P., and Parker, J. A. (2013). Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiology of Disease*, 55:64 – 75.

Vaccaro, A., Patten, S. A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., Drapeau, P., Kabashi, E., and Parker, J. A. (2012). Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in C. elegans and D. rerio. *PLOS ONE*, 7(7):1–10.

Valentine, J. S., Doucette, P. A., and Zittin Potter, S. (2005). Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1):563–593.

van Bebber, F., Paquet, D., Hruscha, A., Schmid, B., and Haass, C. (2010). Methylene blue fails to inhibit tau and polyglutamine protein dependent toxicity in zebrafish. *Neurobiology of Disease*, 39(3):265 – 271.

Van Vuong, Q., Bednarikova, Z., Antosova, A., Huy, P. D. Q., Siposova, K., Tuan, N. A., Li, M. S., and Gazova, Z. (2015). Inhibition of insulin amyloid fibrillization by glyco-acridines: an in vitro and in silico study. *Medicinal Chemistry Communication*, 6:810–822.

Wilcock, G. K., Gauthier, S., Frisoni, G. B., Jia, J., Hardlund, J. H., Moebius, H. J., Bentham, P., Kook, K. A., Schelter, B. O., Wischik, D. J., Davis, C. S., Staff, R. T., Vuksanovic, V., Ahearn, T., Bracoud, L., Shamsi, K., Marek, K., Seibyl, J., Riedel, G., Storey, J. M. D., Harrington, C. R., and Wischik, C. M. (2017). Potential of low dose leuco-methylthioninium bis(hydromethanesulphonate) (LMTM) monotherapy for treatment of mild Alzheimer's disease: cohort analysis as modified primary outcome in a phase III clinical trial. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 61(1):435–457.

Wischik, C. M., Edwards, P. C., Lai, R. Y., Roth, M., and Harrington, C. R. (1996). Selective inhibition of alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20):11213–11218.

Wischik, C. M., Schelter, B. O., Wischik, D. J., Storey, J. M. D., and Harrington, C. R. (2018). Modeling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 62(3):1287–1303.

Wolfe, K. and Cyr, D. (2011). Amyloid in neurodegenerative diseases: friend or foe? *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(5):476–481.

Wright, G. S. A., Antonyuk, S. V., Kershaw, N. M., Strange, R. W., and Samar Hasnain, S. (2013). Ligand binding and aggregation of pathogenic SOD1. *Nature Communications*, 4:1710–1758.

Xia, G., Benmohamed, R., Kim, J., Arvanites, A. C., Morimoto, R. I., Ferrante, R. J., Kirsch, D. R., and Silverman, R. B. (2011). Pyrimidine-2,4,6-trione derivatives and their inhibition of mutant SOD1-dependent protein aggregation. Toward a treatment for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(7):2409–2421.

Yamashita, M., Nonaka, T., Arai, T., Kametani, F., Buchman, V. L., Ninkina, N., Bachurin, S. O., Akiyama, H., Goedert, M., and Hasegawa, M. (2009). Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Letters*, 583(14):2419–2424.

Yang, Y., Petkova, A., Huang, K., Xu, B., Hua, Q.-x., Ye, I.-J., Chu, Y.-C., Hu, S.-Q., Phillips, N. B., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., Mackin, R. B., Katsoyannis, P. G., Tycko, R., and Weiss, M. A. (2010). An Achilles' heel in an amyloidogenic protein and its repair: insulin fibrillation and therapeutic design. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14):10806–10821.

Yates, E. V., Meisl, G., Knowles, T. P. J., and Dobson, C. M. (2016). An environmentally sensitive fluorescent dye as a multidimensional probe of amyloid formation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(9):2087–2094.

Yerbury, J. J., Gower, D., Vanags, L., Roberts, K., Lee, J. A., and Ecroyd, H. (2013). The small heat shock proteins αB-crystallin and Hsp27 suppress SOD1 aggregation in vitro. *Cell Stress and Chaperones*, 18(2):251–257.

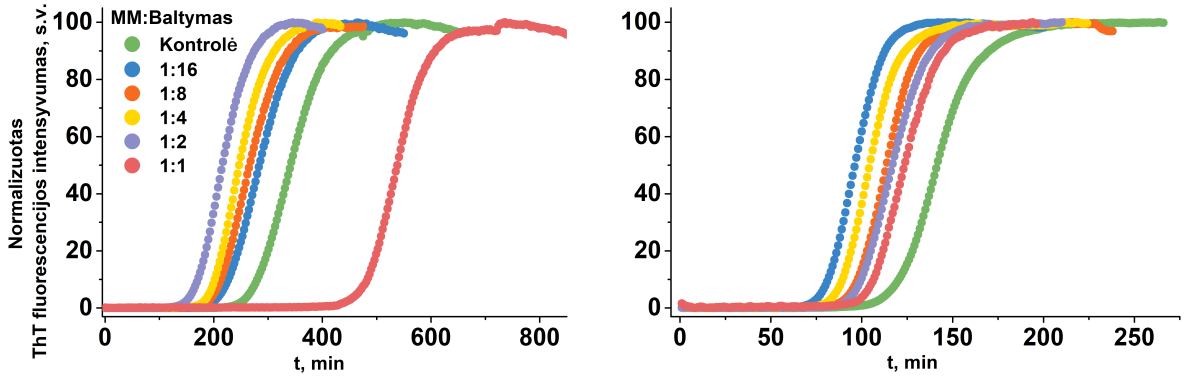
Zarei, S., Carr, K., Reiley, L., Diaz, K., Guerra, O., Altamirano, P., Pagani, W., Lodin, D., Orozco, G., and Chinea, A. (2015). A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surgical Neurology International*, 6(1):171.

Zhang, W., Benmohamed, R., Arvanites, A. C., Morimoto, R. I., Ferrante, R. J., Kirsch, D. R., and Silverman, R. B. (2012). Cyclohexane 1,3-diones and their inhibition of mutant SOD1-dependent protein aggregation and toxicity in PC12 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(2):1029 – 1045.

Zhuang, X., Zhao, B., Liu, S., Song, F., Cui, F., Liu, Z., and Li, Y. (2016). Noncovalent interactions between superoxide dismutase and flavonoids studied by native mass spectrometry combined with molecular simulations. *Analytical Chemistry*, 88(23):11720–11726.

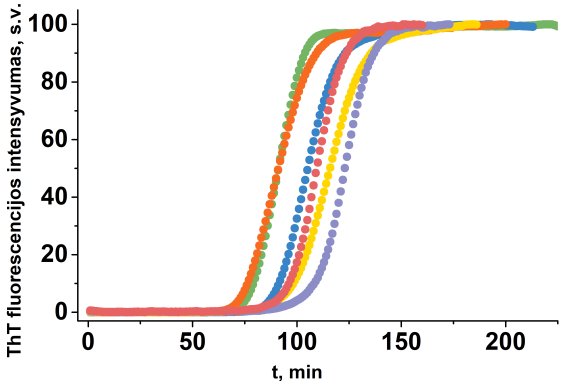
Ziaunys, M., Sneideris, T., and Smirnovas, V. (2018). Self-inhibition of insulin amyloid-like aggregation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20:27638–27645.

PRIEDAS



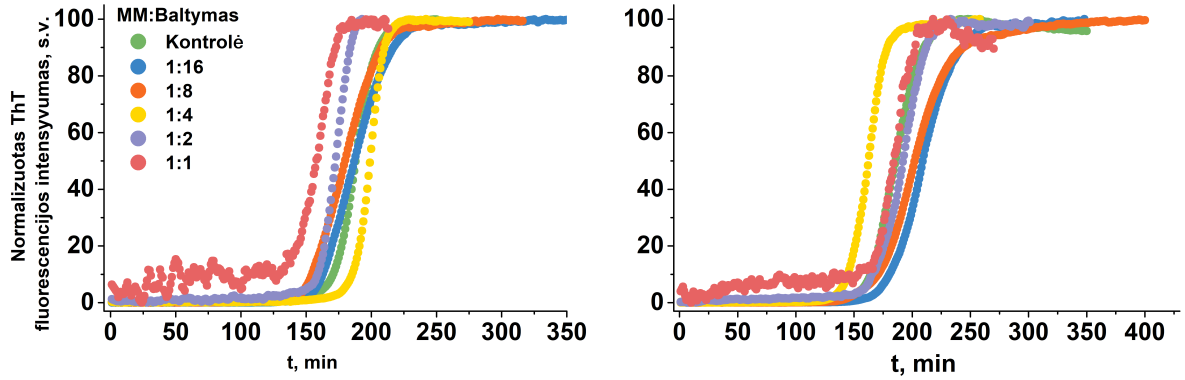
(a) 100 µM insulino

(b) 400 µM insulino



(c) 600 µM insulino

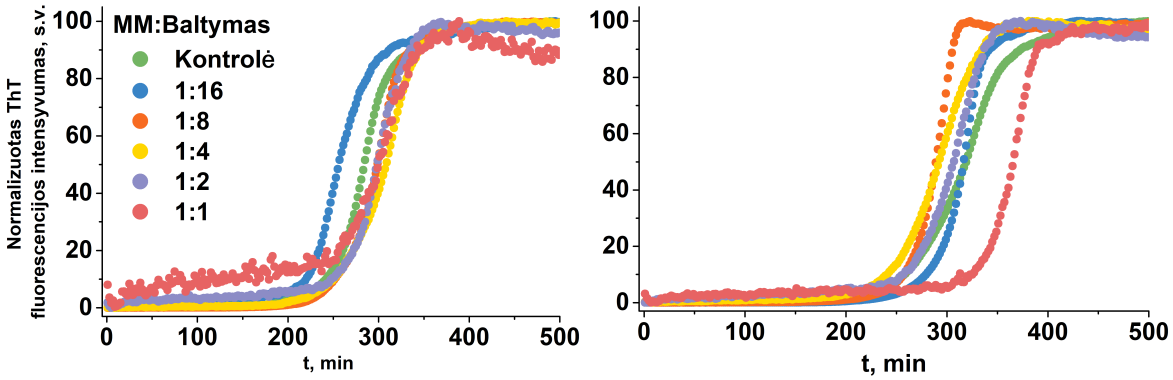
P.1 pav. Spontaninės insulino agregacijos su metileno mėliu 20 % acto rūgštyje su 100 mM NaCl kinetika. Standartinės paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų



(a) 600 µM insulino

(b) 800 µM insulino

P.2 pav. Spontaninės insulino agregacijos su metileno mėliu 100 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, pH 2 kinetika. Standartinės paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų



(a) 600 µM insulino **(b)** 800 µM insulino

P.3 pav. Spontaninės insulino agregacijos su metileno mėliu 100 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale su 100 mM NaCl, pH 2,4 kinetika. Standartinės paklaidos apskaičiuotos iš 3 pakartojimų

Konferencijose pristatytų pranešimų santraukos:

- Effect of EGCG, methylene blue and ethanol on human superoxide dismutase I aggregation – VitaScientia (Vilnius, 2018)
- Methylene blue acts as amyloid remodelling agent on superoxide dismutase I aggregation – The COINS 2018 (Vilnius, 2018)
- Methylene blue acts as amyloid remodelling agent on superoxide dismutase I aggregation – Open Readings 2018 (Vilnius, 2018)
- Methylene blue acts as amyloid remodelling agent on superoxide dismutase I aggregation – 16^{th} Vienna Biocenter PhD Symposium (Austria, Vienna, 2018)
- Metileno mėlio įtakos žmogaus superoksido dismutazės I amiloidinei agregacijai nustatymas – Studentų moksliniai tyrimai 2017–2018 metais (Vilnius, 2018)

detected that Fas mRNA isoform expression profiles in tumors and cancer cell lines are different, indicating that not all experimental results obtained from cell lines reflect changes that occur in tumors.

[1] B. R. Graveley, Alternative splicing: Increasing diversity in the proteomic world, Trends Genet 17 (2001), 100-7.
[2] C. J. David and J. L. Manley, Alternative pre-mRNA sp;licing regulation in cancer: pathway and programs unhinged, Genes Dev 24 (2010), 2343-64.

24 Effect of EGCG, methylene blue and ethanol on human superoxide dismutase I aggregation



Greta Musteikytė (1,2), Vytautas Smirnovas (2)
(1) Vilnius Gediminas Technical University, Lithuania (2) Vilnius University, Lithuania

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neuro-degenerative disease that results in motor neuron death and no effective cure for ALS has been developed for now. In most of ALS cases the disease is linked to human Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) aggregation into amyloid-like fibrils. One of the strategies for development of therapeutics for this incurable disease is looking for potential aggregation inhibitors in vitro.
Impact of epigallocatechin-3-gallate, methylene blue and ethanol on aggregation of SOD1 was tested. Kinetics of amyloid fibril formation was followed using thioflavin-T fluorescence assay, and the morphology of aggregates was determined by atomic force microscopy.
The results suggested that methylene blue and EGCG act as amyloid remodelling agents and ethanol affects SOD1 aggregation kinetics without changing aggregate morphology.

25 Functional and structural analysis of new GD-95 lipase variant created through random mutagenesis



Gytis Druteika, Egle Lastauskiene, Audrius Gegeckas, Renata Gudiukaite
Department of Microbiology and Biotechnology, Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University, Lithuania

The rapid evolution of biotransformation strongly increases the focus on the enzymes possessing novel properties. Industrially interesting enzymes – lipases from Geobacillus bacteria are active at extreme conditions and are excellent biocatalysts applied in various bioconversion reactions. Products of these reactions are included in composition of cosmetics as flavor ingredients or emulsifiers, in biofuel production, etc. [1]. The functional analysis of target biocatalysts individual domains and amino acids is important to improve their industrially-attractive physicochemical characteristics. In this study new Geobacillus lipase variant was designed using the recombinant GD-95 lipase [2] as a template

Greta Musteikytė

"Methylene Blue Acts as Amyloid Remodelling Agent on Superoxide Dismutase I Aggregation"



GRETA MUSTEIKYTĖ, Vytautas Smirnovas

Introduction: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that results in motor neuron death and has no approved treatment yet. Around 20% of ALS cases are caused by Cu, Zn human superoxide dismutase (SOD1) aggregation into amyloid fibrils. First step of potential strategies to combat the disease could be finding an effective aggregation inhibitor *in vitro*. However, only a few studies for SOD1 protein have been done in this field for now. They involve *in vitro* screening of 640 FDA approved drugs, several flavonoids and curcumin only.

Aim: Our goal was to test inhibitory effect of a small molecule methylene blue, which has been shown to inhibit Alzheimer's disease-linked amyloid beta oligomerization.

Materials and methods: Recombinant SOD1 was purified from *E. Coli* by Ni^{2+} affinity chromatography. Aggregation experiments were carried out in 10 mM potassium phosphate, 0.5 M GuHCl and 5 mM DTT buffer solution, pH 7.4. Kinetics of aggregation was monitored using Thioflavin T (ThT) fluorescence assay. Morphology of aggregates was visualised by atomic force microscopy and secondary structure was tested by infrared spectroscopy.

Results: The presence of methylene blue leads to reduced ThT fluorescence intensity and results in different morphology as well as secondary structure of aggregated protein. Seeded aggregation kinetics suggests that methylene blue possibly modulates surface

properties of pre-added fibrils without affecting stability of protein monomer, but further investigation is needed to reveal the exact methylene blue mode of action.

Conclusion: Methylene blue influences SOD1 aggregation kinetics, aggregate structure and morphology.

Vilmantas Pupkis

"Cs^+ blocks high-conductance ion channels in the tonoplast of Nitellopsis obtusa: a patch clamp approach"



VILMANTAS PUPKIS, Indrė Lapeikaitė, Vilma Kisnierienė
Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University, Lithuania
vilmantas.pupkis@gmail.com

Plant ion channels are crucial for various physiological functions such as sustaining electrochemical potential driven signaling pathways. Therefore investigation of plant ion channels is beneficial for obtaining fundamental knowledge and insights into cellular processes such as the generation of action potentials. For decades Characean macroalgae have proven to be a convenient and irreplaceable model system for electrophysiological investigations.

The aim of our research was to test the effect of a well-known K^+ channel blocker Cs^+ on scarcely characterized high-conductance ion channels recorded in the tonoplast of a freshwater algae *Nitellopsis obtusa.*
Plant cell wall impedes access to the plasma membrane but this issue in Characeaen algae may be overcome by using cytoplasmic droplet

METHYLENE BLUE ACTS AS AMYLOID REMODELLING AGENT ON SUPEROXIDE DISMUTASE I AGGREGATION

Greta Musteikytė, Vytautas Smirnovas

Institute of Biotechnology, Life Sciences Center, Vilnius University, Lithuania
gretamus@gmail.com

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that results in motor neuron death and has no approved treatment yet. Around 20% of ALS cases are caused by Cu, Zn human superoxide dismutase (SOD1) aggregation into amyloid fibrils. First step of potential strategies to combat the disease could be finding an effective aggregation inhibitor *in vitro*. However, only a few studies for SOD1 protein have been done in this field for now. They involve *in vitro* screening of 640 FDA approved drugs [1], several flavonoids[2] and curcumin[3] only. Our goal was to test inhibitory effect of a small molecule methylene blue, which has been shown to inhibit Alzheimer's disease-linked amyloid beta oligomerization[4].

Recombinant SOD1 was purified from *E. Coli* by Ni^{2+} affinity chromatography. Aggregation experiments were carried out in 10 mM potassium phosphate, 0.5 M GuHCl and 5 mM DTT buffer solution, pH 7.4. Kinetics of aggregation was monitored using Thioflavin T (ThT) fluorescence assay. Morphology of aggregates was visualised by atomic force microscopy and secondary structure was tested by infrared spectroscopy.

The presence of methylene blue leads to reduced ThT fluorescence intensity and results in different morphology as well as secondary structure of aggregated protein. Seeded aggregation kinetics suggests that methylene blue possibly modulates surface properties of pre-added fibrils without affecting stability of protein monomer, but further investigation is needed to reveal the exact methylene blue mode of action.

[1]I. Anzai, K. Toichi, E. Tokuda, A. Mukaiyama, S. Akiyama and Y. Furukawa, Screening of Drugs Inhibiting In vitro Oligomerization of Cu/Zn-Superoxide Dismutase with a Mutation Causing Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 3, no. 40, (2016).

[2]X. Zhuang, B. Zhao, S. Liu, F. Song, F. Cui, Z. Liu and Y. Li, Noncovalent Interactions between Superoxide Dismutase and Flavonoids Studied by Native Mass Spectrometry Combined with Molecular Simulations, *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 23, pp. 11720-11726, (2016).

[3]N. Bhatia, A. Srivastava, N. Katyal, N. Jain, M. Khan, B. Kundu and S. Deep, Curcumin binds to the pre-fibrillar aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and alters its amyloidogenic pathway resulting in reduced cytotoxicity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1854, no. 5, pp. 426-436, (2015).

[4]M. Necula, L. Breydo, S. Milton, R. Kayed, W. van der Veer, P. Tone and C. Glabe, Methylene Blue Inhibits Amyloid Aβ Oligomerization by Promoting Fibrillization, *Biochemistry*, vol. 46, no. 30, pp. 8850-8860, (2007).

#15

Methylene blue acts as amyloid remodelling agent on superoxide dismutase I aggregation

Greta Musteikyte[1*],Vytautas smirnovas[1]

[1] *Institute of Biotechnology, Life Sciences Center, Vilnius University, Lithuania;* [*]*Corresponding author*

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that results in motor neuron death and has no approved treatment yet. Around 20% of ALS cases are caused by Cu, Zn human superoxide dismutase (SOD1) aggregation into amyloid fibrils. First step of potential strategies to combat the disease could be finding an effective aggregation inhibitor *in vitro*. However, only a few studies for SOD1 protein have been done in this field for now. They involve *in vitro* screening of 640 FDA approved drugs [1], several flavonoids [2] and curcumin [3] only. Our goal was to test inhibitory effect of a small molecule methylene blue, which has been shown to inhibit Alzheimer's disease-linked amyloid beta oligomerization [4].

Recombinant SOD1 was purified from *E. Coli* by Ni^{2+} affinity chromatography. Aggregation experiments were carried out in 10 mM potassium phosphate, 0.5 M GuHCl and 5 mM DTT buffer solution, pH 7.4. Kinetics of aggregation was monitored using Thioflavin T (ThT) fluorescence assay. Morphology of aggregates was visualised by atomic force microscopy and secondary structure was tested by infrared spectroscopy.

The presence of methylene blue leads to reduced ThT fluorescence intensity and results in different morphology as well as secondary structure of aggregated protein. Seeded aggregation kinetics suggests that methylene blue possibly modulates surface properties of pre-added fibrils without affecting stability of protein monomer, but further investigation is needed to reveal the exact methylene blue mode of action.

References

[1]I. Anzai, K. et al., Screening of Drugs Inhibiting In vitro Oligomerization of Cu/Zn-Superoxide Dismutase with a Mutation Causing Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 3, no. 40, (2016).

[2]X. Zhuang, B. Zhao, S. Liu, F. Song, F. Cui, Z. Liu and Y. Li, Noncovalent Interactions between Superoxide Dismutase and Flavonoids Studied by Native Mass Spectrometry Combined with Molecular Simulations, *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 23, pp. 11720-11726, (2016).

[3]N. Bhatia, A. Srivastava, N. Katyal, N. Jain, M. Khan, B. Kundu and S. Deep, Curcumin binds to the pre-fibrillar aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and alters its amyloidogenic pathway resulting in reduced cytotoxicity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1854, no. 5, pp. 426-436, (2015).

[4]M. Necula, L. Breydo, S. Milton, R. Kayed, W. van der Veer, P. Tone and C. Glabe, Methylene Blue Inhibits Amyloid Aβ Oligomerization by Promoting Fibrillization, *Biochemistry*, vol. 46, no. 30, pp. 8850-8860, (2007).

Funding

This research was funded by a grant (No. 09.3.3-LMT-K-712-03-0059) from the Research Council of Lithuania

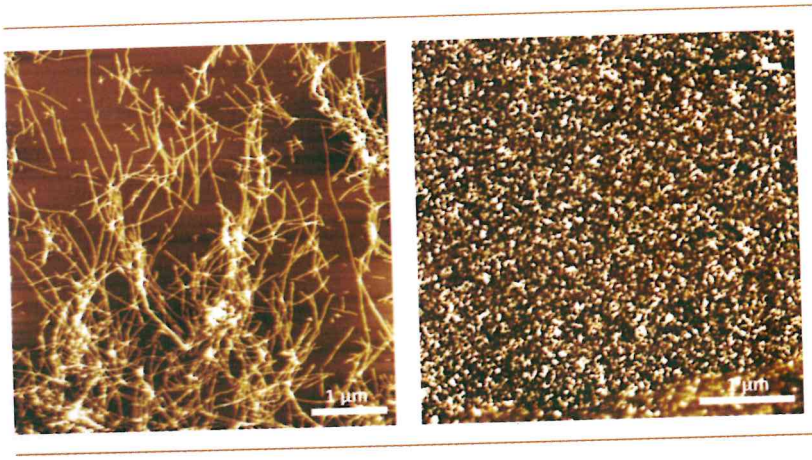
G. Musteikytė[1],
V. Smirnovas[2]

[1] Vilniaus Gedimino technikos universitetas
[2] Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas

METILENO MĖLIO ĮTAKOS ŽMOGAUS SUPEROKSIDO DISMUTAZĖS I AMILOIDINEI AGREGACIJAI NUSTATYMAS

Amiotrofinė lateralinė sklerozė (ALS) – nepagydoma neurodegeneracinė liga, kuria sergančių pacientų organizme žūva motoriniai neuronai. 20 proc. ligos atvejų siejama su baltymo superoksido dismutazės I (SOD1) amiloidine agregacija. Šiandien pilnai ligą išgydančių vaistų nėra; pacientams skiriamas simptomus malšinantis riluzolas [1] arba edaravonas [2]. Viena iš vaistų kūrimo strategijų yra potencialių agregacijos slopiklių paieška *in vitro*. Šioje srityje tyrimų atlikta nedaug; atlikta slopiklių paieška tarp 640 FDA patvirtintų vaistų [3], įvertintas kurkumino [4] ir keleto flavonoidų [5] veikimas. Pastaruoju metu susidomėjimą sukėlė vaistas methemoglobinemijai gydyti – metileno mėlis, slopinantis su Alzheimerio liga siejamo amiloido beta oligomerizaciją [6]. Šio tyrimo tikslas – įvertinti metileno mėlio potencialą slopinti SOD1 amiloidinę agregaciją in vitro.

Rekombinantinė, histidino inkarą turinti SOD1 sintetinta *E. coli* ir išgryninta Ni^{2+} jonų giminingumo chromatografijos būdu. Agregacijos eksperimentai atlikti 10 mM pH 7,4 kalio fosfatiniame buferiniame tirpale su 0,5 M guanidino hidrohlorido ir 5 mM DTT. Agregatų susidarymas matuotas naudojant fluorescencinį dažą Tioflaviną T. Agregatų morfologija tirta atominės jėgos mikrokopijos pagalba, antrinė struktūra – infraraudonųjų spindulių spektroskopijos pagalba.



1 pav. *Atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos. SOD1 fibrilės (kairėje) ir veikian 400 µM metileno mėlio gauti SOD1 agregatai (dešinėje).*

:LIO ĮTAKOS
PEROKSIDO
AMILOIDINEI
NUSTATYMAS

eneracinė liga,
ɔc. ligos atvejų
ɡacija. Šiandien
ıalšinantis rilu-
ɔtencialių agre-
atlikta slopiklių
ir keleto flavo-
themoglobine-
› amiloido beta
encialą slopinti

išgryninta Ni^{2+}
ıi atlikti 10 mM
drohlorido ir 5
į dažą Tioflavi-
ı, antrinė struk-



1 pav. *Atominės jėgos mikroskopijos nuotraukos. SOD1 fibrilės (kairėje) ir veikiant 400 µM metileno mėlio gauti SOD1 agregatai (dešinėje).*

Agregacijos mišinyje esantis metileno mėlis mažina fluorescencijos emisijos intensyvumą, o susidarę agregatai yra kitokios antrinės struktūros bei pakitusios morfologijos (1 pav.). Nustatyta, kad metileno mėlis baltymo stabilumui įtakos nedaro. Pagal agregacijos su „sėkla" rezultatus manoma, kad metileno mėlis pakeičia pridėtų fibrilių paviršiaus savybes ir dėl to susidaro kitokios morfologijos agregatai.

Literatūra

[1] Miller, R., Mitchell, J., Moore, D. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2012, no. 3.
[2] Rothstein, J.D. *Cell*, 2017, vol. 171, no. 4, p. 725
[3] Anzai I., Toichi, K., Tokuda, E., Mukaiyama, A., Akiyama, S. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2016, vol. 3, no. August, p. 1–11
[4] N. K. Bhatia, Srivastava A. *et al., Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2015, vol. 1854, no. 5, p. 426–436
[5] Zhuang, X., Zhao, B. *et al., Analytical Chemistry*, 2016, vol. 88, no. 23, p. 11720–11726
[6] Necula, M., Breydo, L. *et al., Biochemistry*, 2007, vol. 46, no. 30, p. 8850–8860.