

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

FLAVONOIDŲ ĮTAKOS INSULINO AMILOIDINEI AGREGACIJAI TYRIMAI

Magistrantė AKVILĖ LECKIENĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas _____
dr., Vytautas Smirnovas (parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2016 m., Vilnius

TURINYS

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS.....	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Amiloidai.....	7
1.1.1. Amiloidinės ligos	7
1.1.2. Amiloidinių fibrilių susidarymas	10
1.2. Insulinas.....	11
1.3. Tioflavino T fluorescencija	14
1.4. Amiloidinės agregacijos slopikliai	15
1.5. Flavonoidai arbatoje	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	19
2.1. Medžiagos.....	19
2.2. Metodai.....	19
2.2.1. Arbatos įtakos insulino agregacijai tyrimai.....	19
2.2.2. Flavonoidų įtakos insulino agregacijai tyrimai	19
2.2.3. Spontaniniai insulino fibrilių susidarymo tyrimai.....	20
2.2.4. Tioflavino T fluorescencijos matavimas	20
2.2.5. Atominės jėgos mikroskopija.....	20
2.2.6. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija	21
2.2.7. Duomenų apdorojimas	22
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	23
3.1. Arbatos įtakos insulino amiloidinei agregacijai tyrimai.....	23
3.2. Flavonoidų įtakos insulino amiloidinei agregacijai tyrimai	26

3.3. Insulino agregacijos priklausomybės nuo pH tyrimai	30
IŠVADOS	33
SUMMARY	34
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	35
LITERATŪROS SĄRAŠAS	36
1 PRIEDAS	42
2 PRIEDAS	49

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

AJM	Atominės jėgos mikroskopija
Alzheimerio liga	AL
Amiloidas β	A β
DMSO	Dimetilsulfoksidas
EGCG	Epigalokatechin-3-galatas
FTIR	Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija
Ins	Insulinas
PrP ^{Sc}	Prioninio baltymo infektyvi forma
ThT	Tioflavinas T

IVADAS

Statistikos duomenimis, 2016 m. apie 44 milijonai žmonių visame pasaulyje serga Alzheimerio liga ar panašaus tipo demencija (daugiausiai sergančiųjų Vakarų Europoje). Prognozuojama, kad, nesuradus efektyvių vaistų, 2030 m. šis skaičius išaugs iki 75 milijonų [1]. Alzheimerio liga taip pat kaip ir Parkinsono, Hantingtono ligos, yra kol kas neišgydomos amiloidozės, kurias sukelia amiloidų kaupimasis smegenyse. Amiloidai, tai fibriliniai agregatai, sudaryti iš netaisyklingos konformacijos baltymų. Dėl mutacijos, baltymo sintezės ar degradacijos sutrikimo susiformavę amiloidai sąveikauja su ląstelės komponentais, sutrikdydami jos funkcijas, ir taip lemdami ląstelės žūtį [2]. Norint sukurti veiksmingus vaistus amiloidinėms ligoms gydyti, geriausia būtų surasti junginius, galinčius slopinti amiloidinių fibrilių susidarymą arba suardyti jau susidariusius agregatus [3]. Per paskutinius 30 metų buvo atlikti klinikiniai tyrimai su daugiau nei 200 junginių, tarp kurių buvo ir amiloidinės agregacijos slopiklių [4]. Tačiau nė vienas iš šių junginių nebuvo patvirtintas kaip efektyvus ir neturintis šalutinio poveikio preparatas, tinkamas Alzheimerio ligai gydyti [5]. Todėl tokio slopiklio, pritaikomo Alzheimerio ir kitoms amiloidinėms ligoms gydyti, suradimas ir toliau išlieka labai aktualus ir svarbus.

Tarp galimų amiloidinių ligų terapeutinių agentų yra iš žaliosios arbatos išskiriamas flavonoidas – epigalokatechin-3-galatas (EGCG). Ištirta, kad EGCG efektyviai slopina transtiretino [6], α -sinukleino ir amiloido β [7], bei prioninio baltymo PrP^{Sc} fibrilių susidarymą [8]. Aprašyta ir keletas kitų flavonoidų, tokių kaip fisetinas, morinas, kvercetas, luteolinas, kurie taip pat pasižymi slopinančiu poveikiu [9, 10]. Nors surasti keli stiprūs amiloidogenezės slopikliai, bet daugumos flavonoidų veikimas kol kas nėra išsiaiškintas. Ieškant potencialaus amiloidinių fibrilių susidarymo slopiklio buvo nutarta ištirti 168 skirtingų flavonoidų įtaką insulino agregacijai.

Dirbti su amiloidines ligas sukeliančiais baltymais yra gana sudėtinga ir brangu, todėl pirminiams flavonoidų poveikio amiloidinei agregacijai tyrimams buvo naudotas rekombinantinis žmogaus insulinas. Denatūruojančiose sąlygose (žemame pH ir aukštoje temperatūroje) insulinas sudaro fibriles atitinkančias bendras amiloidinių fibrilių savybes [11, 12].

Šio magistrinio darbo tyrimai buvo atliekami Vilniaus Universiteto Biotechnologijos institute, Biotermodinamokos ir vaistų tyrimų skyriuje.

Darbo tikslas: Išsiaiškinti kaip skirtingi flavonoidai veikia insulino amiloidinių fibrilių susidarymą.

Darbo uždaviniai:

- Ištirti ar epigalokatechin-3-galatas yra vienintelis arbatos komponentas slopinantis insulino amiloidogenezę;
- Ištirti 168 skirtingų flavonoidų įtaką insulino amiloidinių fibrilių susidarymo kinetikai;
- Nustatyti flavonoidų įtaką insulino amiloidinių fibrilių struktūrai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Amiloidai

Pirmą kartą terminas „amiloidas“ buvo panaudotas vokiečių mokslininko Rudolph Virchow 1854 metais. R. Virchow histochemiškai ištyrė keistas, į krakmolo granules panašias, žmogaus smegenyse rastas struktūras (lot. *Corpora amylacea*). Jodo spalvinės reakcijos metu jos nusidažė šviesiai mėlyna spalva, todėl R. Virchow nusprendė, kad pagrindinė šių darinių sudedamoji dalis yra celiuliozė ir pavadino juos amiloidais (lot. *amylum*, graik. *amylon* – krakmolos). Celiuliozė ir krakmolos tais laikais buvo laikomi izomerais, besiskiriančiais tik atomų išsidėstymu. Kiti du vokiečių mokslininkai N. Friedreich ir A. Kekule 1859 metais R. Virchow hipotezę įrodė esant klaidingą. Amiloidinės masės, paimtos iš pažeistos blužnies, cheminė analizė parodė joje esant didelį kiekį azoto. Remiantis gautais rezultatais, A. Kekule padarė išvadą, kad amiloidai yra sudaryti ne iš angliavandenių, o iš baltymų [13].

Naujų technologijų dėka, nuo dvidešimto amžiaus amiloidais vadinamos netaisyklingos erdvinės struktūros baltymų sankaupos, kurioms būdingi trys požymiai [14]: specifinė struktūra (stebint amiloidus aukštos raiškos elektroniniu mikroskopu matomos, tiesios, nesišakojančios 70-120 Å diametro fibrilės, kurias sudaro 20-35 Å pločio protofilamentai [15]; β-klostyta polipeptidinės grandinės antrinė struktūra (rentgeno spindulių difrakcijos analizės metu nustatyta, kad β-klostės dėstosi statmenai fibrilės ašiai) [16]; unikali sąveika su Kongo raudonuoju (fibrilės poliarizuotoje šviesoje švyti ryškiai žalia spalva) [13]. Kiekybinis ir kokybinis amiloidinių fibrilių nustatymas galimas atominės jėgos mikroskopija, branduolio magnetiniu rezonansu, apskritiminiu dichroizmu, Furje transformacine infraraudonosios spinduliuotės spektroskopija, bei fibrilėms sąveikaujant su Tioflavinu T [17].

Tam tikromis sąlygomis (dėl mutacijos, baltymų sintezės sutrikimo, pH, temperatūros pokyčių) suformuoti amiloidines fibriles gali daugelis baltymų, besiskiriančių savo struktūra, funkcija. Amiloidiniai baltymai ar peptidai gali būti nepatologiniai, jie ląstelėje atlieka tam tikras funkcijas, ar patologiniai – sukeltys amiloidozes [18].

1.1.1. Amiloidinės ligos

Daugiau nei trys dešimtys ligų yra susijusios su netaisyklingos konformacijos baltymų agregatų kaupimusi ląstelėje ar už ląstelės ribų. Šios ligos gali būti paveldimos, užkrečiamos

(perduodamos) ar spontaninės, lokalizuotos ar sisteminės. Tai neurodegeneracinės ligos (pasireiškiančios baltymų agregatų kaupimusi smegenyse), neneuropatinės lokalizuotos amiloidozės (kai baltymų sankaupos aptinkamos vieno tipo audinyje, bet ne smegenyse) ir neneuropatinės sisteminės amiloidozės (kai amiloidų randama kelių tipų audiniuose). Geriausiai žinomos amiloidinės ligos ir jas sukeliantys baltymai apžvelgti 1 lentelėje [18].

1 lentelė. Kelios amiloidinės ligos ir jas sukeliantys baltymai (adaptuota iš [18]).

Liga	Sukeliantis baltymas ar peptidas
Neurodegeneracinės ligos	
Alzheimerio liga	A β , tau baltymas
Kempinligė	Prionas
Parkinsono liga	α – sinukleinas
Hantingtono liga	Hantingtinas
Neneuropatinės lokalizuotos amiloidozės	
II tipo diabetas	Amilinas
Skydliaukės modulinė karcinoma	Kalcitoninas
Injekcinė amiloidozė	Insulinas
Neneuropatinės sisteminės amiloidozės	
AL amiloidozė	Imunoglobulinų fragmentai ar lengvosios grandinės
AA amiloidozė	Serumo amiloido A fragmentai
Senatvinė sisteminė amiloidozė	Transtiretinas

Vienas labiausiai tyrinėjamų neurodegeneracinių sutrikimų – Alzheimerio liga, kurią lemia nenormalus β amiloido (A β) kaupimasis tarp smegenų ląstelių – neuronų. A β peptidas, tai amiloido baltymo primtako (APP, A β precursor protein) proteolizės produktas, susidarantis fiziologinėmis sąlygomis [17, 19, 20]. Sutrikus A β peptido produkcijos, agregacijos ir pašalinimo pusiausvyrai, A β peptidai oligomerizuojasi sudarydami amiloidines fibriles. Fibrilės kartu su proteoglikanais, α_1 -antichimotripsinu ir apolipoproteinu E formuoja netirpias amiloidines plokšteles (amyloid plaques), kurios pažeidžia sinapsę ir sukelia neurogenezės defektus [17].

Kitas Alzheimerio ligos žymuo yra neuronuose randami neurofibriliniai rezginiai, sudaryti iš hiperfosforilinto tau baltymo. Fiziologiškai tau baltymas reikalingas mikrovamzdelių struktūrai palaikyti. Amiloidinių ligų metu, dėl tau baltymo hiperfosforilinimo, keičiasi jo konformacija, susidariusios nenormalios tau baltymo molekulės agreguoja suformuodamos neurofibrilinius rezginius. Hiperfosforilinus tau baltymą, mikrovamzdeliai destabilizuojasi ir praranda savo funkciją taip lemdami neuronų žūtį [21–24]. Alzheimerio liga sukelia atminties praradimą, kognityvinių funkcijų ir asmenybės netekimą, objektų neatpažinimą, galiausiai mirtį [17].

Europos Neurologų Draugijų Federacija AL diagnozei nustatyti rekomenduoja atlikti kognityvinių funkcijų, elgesio ir psichologinių simptomų, kasdienės veiklos vertinimą bei neurovizualinius tyrimus. Neurovizualinius tyrimus sudaro: kompiuterinė tomografija (atliekama norint atmesti kitas, chirurgiškai išgydomas ligas, kaip pvz. navikus, hematomas ir t.t), Magnetinio rezonanso tomografija (gali būti nustatoma hipokampo atrofija – specifiskas ir ankstyvas AL požymis), Vieno fotono emisijos kompiuterinė tomografija ir pozitronų emisijos tomografija (atliekami abejotinos diagnozės patvirtinimui). Taip pat Alzheimerio ligai diagnozuoti galima atlikti elektroencefalografiją ir smegenų skysčio tyrimus, kurių metu nustatomi specifiniai AL žymenys: amiloidas β (1–42), tau ir fosforilintas tau baltymas. Lyginant su sveikais asmenimis, sergančiųjų AL smegenų skystyje randamas sumažėjęs $A\beta_{42}$ kiekis. Manoma, kad amiloido β_{42} kiekis smegenų skystyje sumažėja dėl to, kad dalis baltymo susikaupia amiloidinėse plokštelėse. Taip pat AL pacientuose randama padidėjusi tau baltymo koncentracija (tau patenka į smegenų skystį iš yrančių neuronų), bei nustatomas atsiradęs fosforilintas tau baltymas. Paveldimai Alzheimerio ligai diagnozuoti atliekami genetiniai tyrimai [25]. Paskutinius keletą metų atliekami klinikiniai tyrimai, kurie galbūt lems naujų Alzheimerio ligos diagnostinių testų atsiradimą. Pagrindinis šių tyrimų objektas – iš kraujo išskiriamos egzozominės pūslelės, kuriose, pacientams dar nepasireiškus ligos simptomams, randami AL sukeliantys baltymai [26–28].

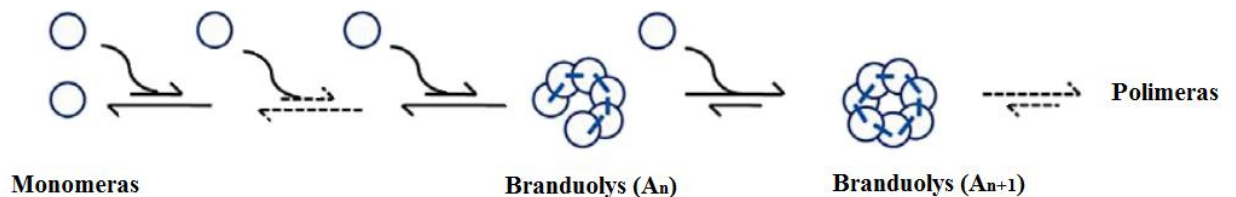
Nors nėra registro, manoma, kad Lietuvoje sergančiųjų Alzheimerio liga ar panašia demencija galėtų būti apie 35 tūkstančius. Dauguma ligonių serga AL patys to nežinodami, dėl nepakankamos ligos diagnostikos. Demencijoms diagnozuoti Lietuvoje atliekami šie kognityvinės būklės nustatymo tyrimai: Laikrodžio piešimo testas, Mini protinės būklės tyrimas (Mini-Mental State Examination, MMSE), Blesedo demencijos skalė ir Alzheimerio ligos įvertinimo skalė (Alzheimer's Disease Assessment Scale, ADAS) [29]. Dažniausiai naudojamas Mini protinės būklės testas nėra pakankamai jautrus tyrimas lengvam kognityviniam sutrikimui nustatyti, todėl nuo 2013 m. Lietuvos populiacijai

pritaikyta Adenbruko kognityvinio tyrimo metodika – taisyta (Addenbrooke’s Cognitive Examination – Revised, ACE-R) [30].

1.1.2. Amiloidinių fibrilių susidarymas

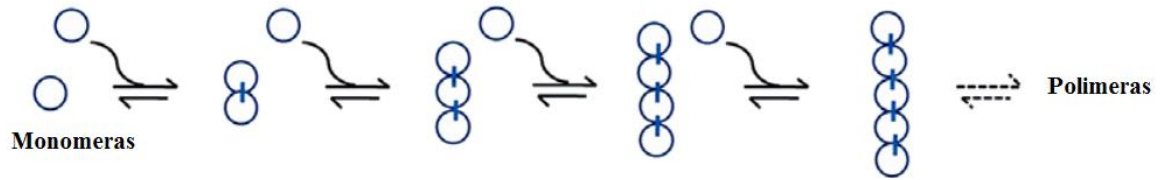
Žinoma, kad net ir nepatologiniai baltymai ir peptidai gali sudaryti amiloidines fibriles, todėl manoma, kad savybė formuoti amiloidinius agregatus, yra būdinga visoms polipeptidinėms grandinėms [2]. Fibrilių formavimasis, prasideda natyvos baltymo struktūros daliniu išsivyniojimu, susidarant labiau agreguoti linkusiai struktūrai. Tokios konformacijos pirmtakai hidrofobinių ir elektrostatiinių sąveikų dėka asocijuoja tarpusavyje sudarydami branduolio tipo ar linijinius oligomerus, kurie polimerizuojasi iki protofibrilių, iš kurių susidaro subrendusios amiloidinės fibrilės [31]. Parodyta, kad pre-fibriliniai agregatai dėl savo neteisingo susivyniojimo ir polipeptidinės grandinės hidrofobinių paviršių atsidengimo yra toksiškesni nei subrendusios fibrilės [18].

Dauguma autorių teigia, kad amiloidinių fibrilių susidarymą apibūdina branduolių susidarymo modelis [31–34]. Pagal šį modelį fibrilių formavimasis (1.1 pav.) sudarytas iš dviejų fazių: pradinės – lėtos (lag fazės), kurios metu baltymo monomero molekulės asocijuoja tarpusavyje sudarydamos branduolį, ir antros – greitos, eksponentinio ilgėjimo fazės. Inicijacijos stadija lėta, nes disociacijos konstanta yra didesnė nei asociacijos, taip pat jos greitis priklauso ir nuo susidaromo branduolio dydžio bei baltymo koncentracijos. Kai kurių baltymų atveju branduolių susidarymo modelis nevisiškai atitinka polimerizacijos kinetiką, todėl jis patobulintas įtraukiant antrinių branduolių susidarymą, kai nauji augimo centrai formuojasi jau susidariusioje fibrilėje.



1.1 pav. Branduolių susidarymo modelio schema (adaptuota iš [31]).

S. Kumar su bendraautoriais išskiria dar vieną fibrilių formavimosi modelį – Linijinės polimerizacijos modelį. Jis yra panašus į branduolių susidarymo modelio ilgėjimo stadiją, tik polimero susidarymas gali prasidėti nuo bet kurio vieno monomero (1.2 pav.). Monomerams asocijuojant, visada susidaro identišką ryšį, todėl polimerizacijos greičio konstanta yra nepriklausoma nuo polimero dydžio. Reakcijos pradžioje, esant didelei monomero koncentracijai, reakcijos greitis yra didelis, vėliau, artėjant prie pusiausvyros, jis mažėja.

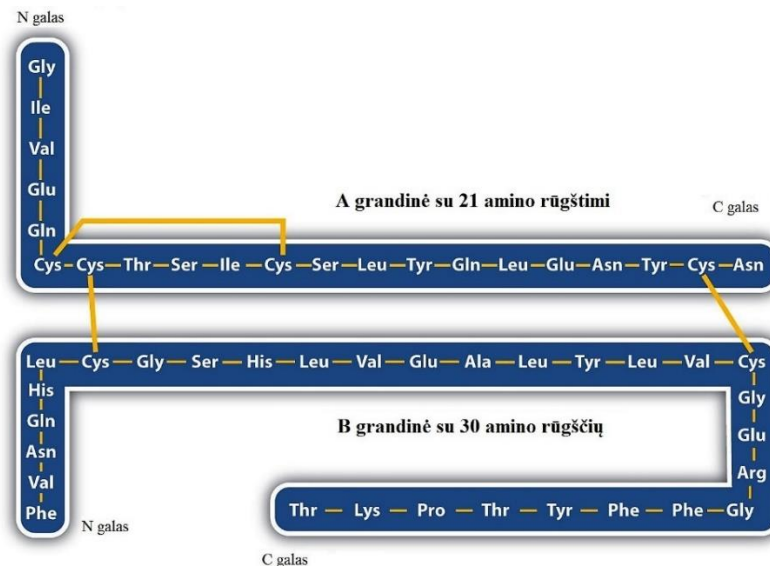


1.2 pav. Linijinio polimerizacijos modelio schema (adaptuota iš [31]).

Tas pats baltymas ar peptidas, esant skirtingoms agregacijos sąlygoms (pH, slėgiui, temperatūrai, ir t.t), gali sudaryti reikšmingai morfologiškai besiskiriančias amiloidines fibriles. Manoma, kad tokią fibrilių morfoliginę įvairovę lemia baltymo molekulinės struktūros heterogeniškumas [35, 36]. Pvz., hormonas gliukagonas esant skirtingoms temperatūroms (25°C ir 50°C) formuoja skirtingas amiloidines fibriles. Šiuos agregatus analizuojant apskritiminio dichroizmo ir Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopijos metodais išsiaiškinta, kad skirtingose temperatūrose susidariusios fibrilės yra nevienodos antrinės struktūros [37].

1.2. Insulinas

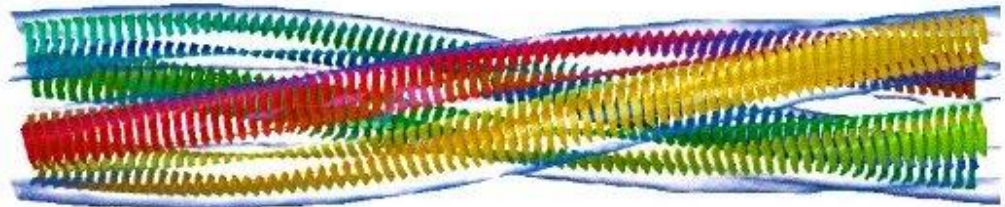
Insulinas – kasos Langerhalso salelių β ląstelėse sintetinamas hormonas, atsakingas už gliukozės kiekio reguliaciją kraujyje. Jis skatina gliukozės patekimą į ląsteles ir jos, kaip energijos šaltinio kaupimą. Insulino monomeras sudarytas iš dviejų polipeptidinių grandinių: A (21 amino rūgštis) ir B (30 amino rūgščių) sujungtų dviem tarpgrandininiais ir vienu vidugrandininio disulfidiniu ryšiu (1.3 pav.) [38]. Fiziologinėmis sąlygomis dominuojanti hormono forma yra heksamerinės struktūros (sudarytos iš trijų dimerų), kurią palaiko nuo dviejų iki keturių Zn^{+2} jonų [39].



1.3 pav. Insulino polipeptidinių grandinių schema (adaptuota iš [40]).

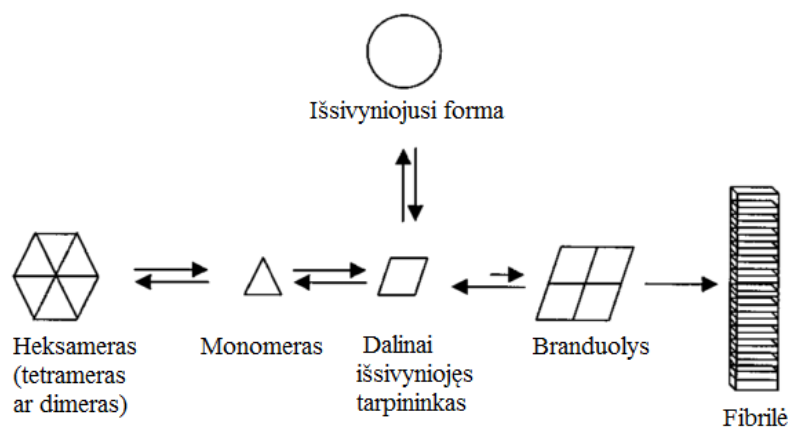
Nuo insulino koncentracijos, pH, joninės jėgos, metalo jonų ar tirpiklio priklauso insulino forma, kurios daugiausiai egzistuos tirpale. Esant nedidelei insulino koncentracijai jis egzistuoja dimerinėje formoje (nuo 2 iki 8 pH), kai insulino koncentracija didesnė nei 1,5 mg/mL – tetramerinėje, o tirpale esant 20 % acto rūgšties – monomerinėje [41].

Esant insulino nepakankamumui ar atsparumui sergant diabetu, pacientai dažnai gydomi hormono injekcijomis. Viena iš retesnių amiloidogeninių ligų yra injekcinė amiloidozė, kai nuolatinėje vaistų įšvirkštimo vietoje randama insulino agregatų [42, 43]. Be to, fibrilių susidarymas yra ir veiksnys ribojantis ilgalaikį insulino vaistų saugojimą [44]. Norint išvengti šių vyksmų, svarbu suprasti insulino amiloidinių fibrilių formavimąsi. Inkubuojant aukštoje temperatūroje ir žemame pH *in vitro* insulinas sudaro fibriles [11], kurios atitinka bendras amiloidų sąvybes [12]. Insulino fibrilės sudarytos iš β – klosčių susiformavusių keturių tarpusavyje susivijusių protofilamentų (1.4 pav.) [45].



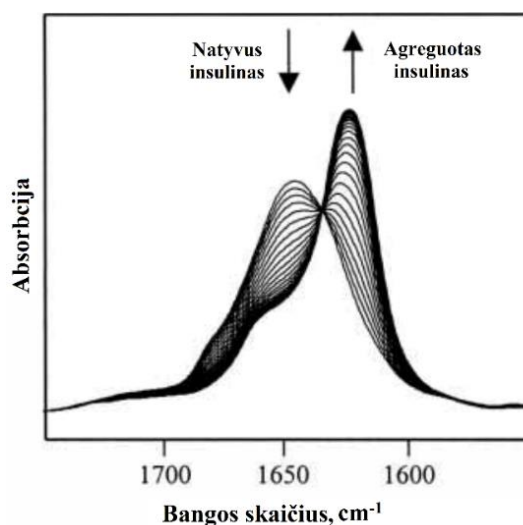
1.4 pav. Insulino fibrilės modelis, 4 fibrilę formuojantys protofilamentai (sudarytų iš β – klosčių) pavaizduoti skirtingomis spalvomis (adaptuota iš [12]).

Insulino agregacijos tyrimai ir jų metu gauti rezultatai gali padėti užkirsti kelią fibrilių susidarymui terapiniuose preparatuose ir suprasti amiloidinių fibrilių formavimosi mechanizmą. L. Nielsen 2001 metais pasiūlė galimą insulino agregacijos mechanizmą, kurio metu insulino molekulė, esanti heksamerinėje, tetramerinėje ar dimerinėje formoje disocijuoja į monomerus, kurie yra pusiausvyroje su dalinai išsivyniojusiomis tarpinėmis formomis, turinčiomis didelį polinkį oligomerizuotis. Pusiausvyrai pasislinkus, susidariusios tarpinės formos, esant kritinei koncentracijai, suformuoja branduolius, o vėliau ir fibriles (1.5 pav.).



1.5 pav. Insulino fibrilių susidarymo schema (adaptuota iš [29]).

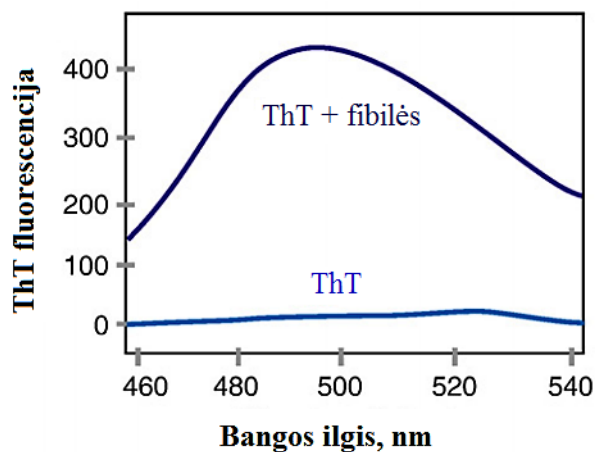
Baltymo struktūros pokytis, atsirandantis agregacijos metu (α -spiralių perėjimas į β klostes), gali būti stebimas naudojant Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopiją. Baltymo peptidinio ryšio vibracijų signalai matomi infraraudonojo spektro $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ regione, kuris vadinamas amido I virpesių ruožu. Jį daugiausia sudaro C=O ryšio vibracija (80%), apie 20% ryšio sudaro ir matoma N-H vibracija [46]. Kadangi baltymo antrinę struktūrą palaiko vandeniliniai ryšiai tarp C=O deguonies ir N-H vandenilio, jie veikia ir peptidinio ryšio vibracijų dažnį. Insulino agregacijos metu amido I vibracijos ruožo maksimumas pasislenka iš $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$, būdingo baltymo α -spiralems, į $\sim 1627\text{ cm}^{-1}$, kuris priskiriamas amiloidinės agregacijos metu susidariusioms β klostėms (1.6 pav.). Amido I virpesių ruožo poslinkis varijuoja tarp insulino fibrilių, susidariusių esant skirtingoms agregacijos sąlygoms [35].



1.6 pav. Indukuotos insulino agregacijos FTIR spektras parodantis palaipsnį amido I ruožo poslinkį natyvaus insulino amiloidogenezės metu (adaptuota iš [35]).

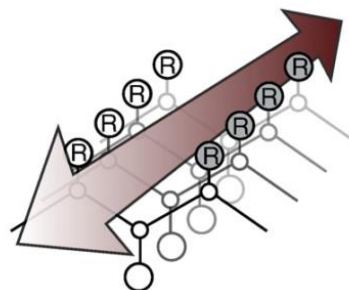
1.3. Tioflavino T fluorescencija

1959 metais P. S. Vassar ir C.F. Culling parodė, kad dažas Tioflavinas T (ThT) jungiasi prie amiloidinių sankaujų audiniuose. ThT prisijungus prie amiloidinių fibrilių drastiškai išauga jo fluorescencija [47] (emisija apytiksliai esant 480 nm, o sužadinimas esant 450 nm bangos ilgiu [48, 49] (1.7 pav.). ThT fluorescencijos signalo intensyvumas tiesiogiai proporcingas susidariusių fibrilių kiekiui. H. Naiki ir H. LeVine taip pat pademonstravo, kad ThT jungimasis prie fibrilių yra susijęs su jų β klostyta struktūra. Šios žinios lėmė ThT panaudojimą ne tik amiloidinių agregatų aptikimui audiniuose, bet ir realiu laiku susidarančių fibrilių stebėjimui, bei jų struktūrų analizavimui.



1.7 pav. ThT fluorescencijos padidėjimas jam prisijungus prie amiloidinių fibrilių (adaptuota iš [50]).

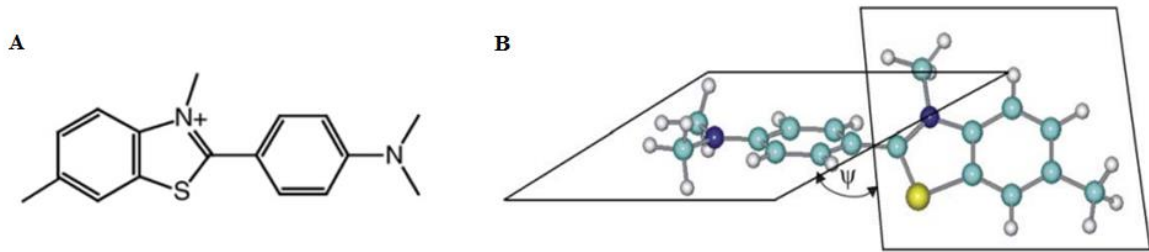
Nepaisant intensyvaus naudojimo amiloidiniuose tyrimuose, tikslus ThT jungimosi mechanizmas kol kas nėra žinomas, bet manoma, kad dažas jungiasi prie visoms fibrilėms bendro struktūrinio motyvo [51].



1.8 pav. ThT jungimosi prie amiloidinių fibrilių modelis. ThT jungiasi prie iš šoninių grandinių paviršiuje susiformavusio kanalo (adaptuota iš [50]).

β – klostės sudaro savitą šoninių grandinių išsidėstymą, vadinamą β – klosčių kopėčiomis [52], kuriam esant, fibrilėse suformuojamas kanalas, prie kurio gali jungtis ThT molekulės (1.8 pav.). Tokia šoninių grupių struktūra egzistuoja nepriklausomai nuo peptido sekos [53].

ThT yra optiškai neaktyvus fluoroforas sudarytas iš benzotiazolo ir benzeno žiedų, laisvai besisukančių aplink bendrą C–C ryšį. Amiloidinės fibrilės sudaro chiralinę aplinką, į kurią patekus ThT laisvas sukimasis tarp žiedų yra sustabdomas ir molekulės įgauna optiškai aktyvią konformaciją (1.9 pav.) [54].



1.9 pav. A) Tioflavino T struktūra [50] **B)** optiškai aktyvaus ThT konformacija, pažymėtas dvisienis kampas tarp plokštumų [54].

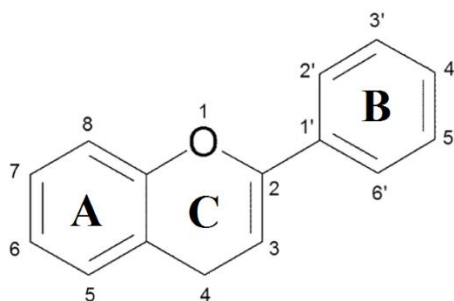
1.4. Amiloidinės agregacijos slopikliai

Dar 1993 m. FDA (Food and Drug Administration) patvirtino pirmąjį preparatą Alzheimerio ligai gydyti – cholinesterazės slopiklį – takriną. Dabar šis preparatas dėl savo hepatotoksiškumo yra vartojamas retai, o jį pakeitė kiti cholinesterazės slopikliai : donepezilas, rivastigminas, galantaminas ir kt. Specifiniams AL simptomams gydyti patvirtinta ir antroji klasė vaistų – N-metil-D-aspartato receptoriaus antagonistai ir jų atstovas memantinas. Taip pat Alzheimerio ligai gydyti siūlyta naudoti ginkmedžio preparatus, nesterodinius vaistus, statinus ir estrogenus. Vis dėl to, visi šie preparatai tik palengvina Alzheimerio ligos simptomus, bet visiškai nesustabdo jos progresavimo [55].

Norint išgydyti amiloidines ligas reikia rasti junginius gebančius sustabdyti amiloidinių agregatų susidarymą. Tokie junginiai galėtų stabilizuoti amiloidinio baltymo natyvią struktūrą, slopinti su neteisingu baltymų susivyniojimu susijusius fermentus, reguliuoti baltymo sintezę ir pagerinti blogai susivyniojusių baltymų kontrolę. Tačiau geriausia būtų rasti medžiagas, kurios selektyviai reaguotų su agreguojančiais polipeptidais ir galėtų slopinti amiloidinių fibrilių formavimąsi arba suardyti jau susidariusias fibriles [3]. Įvairiausi junginiai, tokie kaip salvianolinė rūgštis B [56], nitrofenoliai [57] ir kitos medžiagos gali slopinti fibrilių susidarymą. Alzheimerio ligos atveju, vienas perspektyviausių vaistinių preparatų buvo laikomas „Alzhemed™“, kuris efektyviai

slopino A β agregaciją *in vitro*. Deja, praėjęs I ir II klinikinių tyrimų stadijas, III stadijoje jis buvo pripažintas nepakankamai saugus ir efektyvus naudoti [5, 58].

Didelio mokslininkų susidomėjimo, dėl savo antioksidantinio, priešauglinio ir antimikrobinio aktyvumo sulaukė grupė augalinės kilmės polifenolių, vadinamų flavonoidais, kurie dažniausiai randami lapų epidermyje ir vaisių odelėje. Flavonoidai – mažos molekulinės masės organiniai junginiai, sudaryti iš 2-fenil-1-benzopirano pagrindu (1.10 pav.). Yra keletas flavonoidų klasių: flavonoliai (kaempferolis, quercetinas), flavonai (apigeninas, luteolinas), flavan-3-oliai (katechinas, epigalokatechin-3-galatas), flavononai (hesperidin) ir kiti [59]. Parodyta, kad flavonoidai gali slopinti fibrilių susidarymą ir *in vitro* ir *in vivo* [60].



1.10 pav. Flavonoidų struktūros pagrindas [59].

Vienas iš geriausiai žinomų amiloidinės agregacijos slopiklių – flavonoidas epigalokatechin-3-galatas (EGCG). EGCG efektyviai slopina transtiretino [6], α -sinukleino, amiloido β fibrilių susidarymą [7] bei prioninio baltymo PrP^{Sc} formavimąsi [8]. Taip pat jis gali paversti jau susiformavusias α -sinukleino ir amiloido β fibriles į mažiau ląstelėms toksiškus amorfinius agregatus [61]. Savo bakalaurnio darbo metu aš parodžiau, kad epigalokatechin-3-galatas yra efektyvus insulino amiloidinės agregacijos slopiklis. EGCG veikimo mechanizmas kol kas nėra tiksliai žinomas. EGCG nėra stabilus ir gali oksiduotis sudarydamas superoksidą ir chinonus [62]. Manoma, kad EGCG ar jo oksiduotų produktų ir amiloidinių fibrilių hidrofobinių jungimosi vietų susirišimas yra svarbus veiksnys fibrilių rekonstrukcijai. Kai fibrilių laisvos amino ar tiolinės grupės yra arti flavono hidrofobinių vietų, iš EGCG susidarę chinonai gali kovalentiškai modifikuoti amiloidinius baltymus, susidarant Šifo bazei ar panašioms junginiams. Toks pakeitimas apsaugo amiloidines fibriles nuo disociacijos ir fragmentacijos, kurių metu susidaro toksiški oligomerai. Hidrofobinė sąveika tarp EGCG ir baltymo greičiausiai yra atsakinga ir už EGCG savybę slopinti amiloidinę agregaciją [63].

Literatūroje aprašoma ir keletas kitų sintetinių ir natūralių flavonoidų, pasižyminčių slopinančiu poveikiu amiloido β agregacijai. Parodyta, kad fisetinas ir jo pagrindu susintetinti analogai, bei morinas, luteolinas ir kvercetas efektyviai slopina A β fibrilių susidarymą [9, 10, 64]. M. G. Sharoar su bendraautoriais aprašo keampferol-3-O-rhamnosido (k-3-rh) poveikį A β toksiškumui. Reakcijos mišinyje esant k-3-rh susidaro mažesni, tirpūs, neturintys β klostyto struktūros, netoksiški agregatai. Taip pat k-3-rh pertvarko jau susidariusius oligomerus ir fibriles [65].

Aprašyta ir keletos flavonoidų slopinantis poveikis transtiretino agregacijai [66]. Išsamiai ištirta kvercetino įtaka jaučio insulino amiloidinių fibrilių susidarymui. J. Wang ir bendraautorių tyrimai parodo, kad kvercetas slopina ne tik insulino agregaciją, bet ir suardo jau susidariusias insulino amiloidines fibriles [67].

Literatūros duomenimis, geriausiai amiloidinių fibrilių susidarymą slopina flavonai, turintys hidroksi grupes. Slopinimo efektyvumas taip pat priklauso ir nuo hidroksi grupių padėties. Amiloido β agregacijos slopinimu pasižymi flavonai, kurių hidroksi funkcinės grupės yra B žiedo 3' ir 4' pozicijose, o 3 ir 7 padėtyse esančios hidroksi grupės nedaro įtakos fibrilių susidarymui [9].

Vis dėlto, skirtingi flavonoidai gali veikti skirtingas amiloidines reakcijas, todėl kruopščiai tirti tik vieną potencialų slopiklį nėra tikslinga [68]. Šiame magistriniame darbe naudojant rutininę analizę ištirta 168 flavonoidai.

1.5. Flavonoidai arbatoje

Epigalokatechingalatas (EGCG) – labiausiai paplitęs flavonoidas žaliojoje arbatoje, bet nedideliais kiekiais jo randama ir kitose arbatos rūšyse. Parodyta, kad arbata pasižymi skrandžio, žarnyno, plaučių ir prostatos vėžio prevenciniu aktyvumu. Taip pat, kai kurių tyrimų duomenimis, arbata sumažina atrofino gastrito, koronarinės širdies ligos ir insulto riziką [69]. Literatūroje aprašomas žaliosios arbatos ar žaliosios arbatos ekstraktų poveikis šeiminės amiloidozės kardiomiopatijos pacientams. Sergantiesiems 12 mėnesių vartojus arbatą, nenustatytas kairiojo skilvelio sienos storio ir masės padidėjimas [70]. Paskelbtas ir klinikinis atvejis, galimai parodantis žaliosios arbatos, kaip sveikatą stiprinančios priemonės, poveikį pacientui su sisteminė lengvosios grandinės amiloidoze [71].

Be EGCG arbatoje yra ir kitų flavonoidų (2 lentelė) ir jų sudėtis priklauso nuo arbatos fermentacijos laipsnio (mažiausiai fermentuota žalioji arbata, labiausiai – juodoji). Labiausiai paplitę flavonoidai arbatoje yra flavan-3-oliai, o flavonolių ir flavonų arbatoje randama daug mažiau [72].

2 lentelė. Flavonoidų kiekiai skirtingose arbatose (mg/100 g sausos arbatos) (adaptuota iš [72]).

Arbatos	Juodoji arbata		Žalioji arbata	
Flavanoidai	Vidurkis	Koncentracijų ribos	Vidurkis	Koncentracijų ribos
Katechinai				
Katechinas	167	35–480	24	0–80
Epikatechinas	316	60–1100	793	190–2000
Epigalokatechinas	1257	29–3870	1712	100–5440
Epigalokatechin 3-galatas	1393	140–5090	8975	1182–18 810
Teaflavinai				
Teaflavinas	162	40–527	-	-
Teaflavin 3-galatas	105	7–260	-	-
Flavonoliai				
Kaempferolis	132	44–213	130	91–150
Myricetinas	25	0–80	101	52–131
Kvercetinas	210	89–416	175	140–230
Flavonai				
Apigeninas	54	21–91	77	25–128
Luteolinas	5	3–9	8	2–14

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Šio magistrinio darbo tyrimai buvo atliekami Vilniaus Universiteto Biotechnologijos institute, Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriuje bei Dortmundo Technikos Universiteto Chemijos fakultete (Vokietijoje).

2.1. Medžiagos

- **Fisher Scientific:** uranilacetatas, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , NaOH , HCl , NaCl , DMSO ,
- **Sigma Aldrich:** NaOD , D_3PO_4 , Tioflavinas T, rekombinantinis žmogaus insulinas
- **Indofine:** Flavonoidai (žiūrėti 1 priede)
- **Lipton:** žalioji arbata, juodoji arbata,
- **Twinnings:** pilkoji arbata, juodoji arbata

2.2. Metodai

2.2.1. Arbatos įtakos insulino agregacijai tyrimai

Insulinas: insulinas tirpintas 200 mM pH 2 fosfatiniame buferyje

Arbatų paruošimas: arbata (1,2-2 g) užpilama 100 mL dejonizuoto verdančio vandens ir 3 minutes inkubuojama. Arbatžolės nukošiamos filtriniu popieriumi. Gautas tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ir 128 kartus.

Arbatos įtakos insulino agregacijos tyrimai buvo atliekama ThT fluorescencijos metodu 60°C temperatūroje 15 valandų. Stebima 1 mM insulino agregacija esant skirtingos rūšies arbatoms (žaliajai, juodajai, pilkajai), bei skirtingomis arbatos koncentracijomis.

2.2.2. Flavonoidų įtakos insulino agregacijai tyrimai

Insulinas: insulinas tirpintas 100 mM pH 2 fosfatiniame buferyje.

Flavonų paruošimas: flavonai tirpinami dimetilsulfoksido (DMSO), ruošiant 20 mM koncentratų, kurie laikomi tamsoje.

Insulino agregacijos slopinimo tyrimai buvo atliekami 60°C temperatūroje 15 ar daugiau valandų. ThT fluorescencijos metodu buvo stebima 1 mM insulino agregacija esant 1 mM flavono. Visuose eksperimentuose galutinė ThT koncentracija reakcijos mišinyje buvo 50 μM , o DMSO kiekis neviršijo 5%.

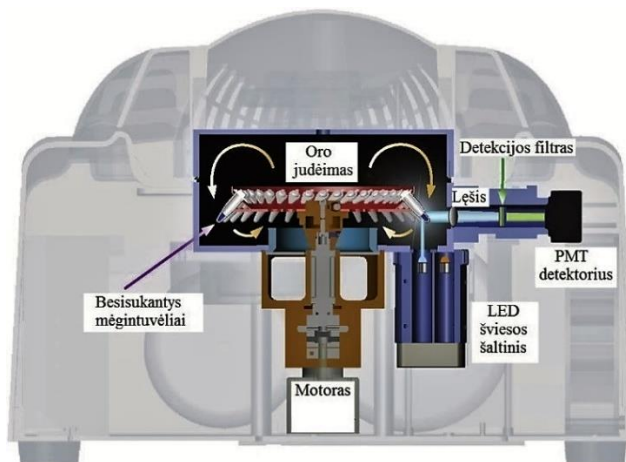
2.2.3. Spontaniai insulino fibrilių susidarymo tyrimai

Insulinas: pradiniam tyrimams insulinas tirpinamas skirtingo pH: 1,4; 1,6; 1,8; 2; 2,2; 2,4; 2,6 100 mM fosfatiniame buferyje.

Spontaniai insulino fibrilių susidarymo tyrimai atliekami ThT fluorescencijos metodu tokiomis pačiomis sąlygomis kaip ir agregacijos slopinimo tyrimai. Stebimas 1 mM insulino fibrilių susidarymas esant skirtingiems pH.

2.2.4. Tioflavino T fluorescencijos matavimas

ThT fluorescencija stebima naudojantis Rotor-Gene Q (Qiagen) ir Rotor-Gene 6000 (Corbett) realaus laiko PGR aparatais. Reakcijos mišiniai (po 20 μ l) išpilstomi į 200 ml mėgintuvėlius, kuriems, sukantis rotoriuje (400 apsisukimų per minutę), išcentrinė jėga sulaiko skystį mėgintuvėlio dugne. Patekęs į LED šviesos šaltinį, mėgintuvėlyje esantis mišinys yra sužadinamas 470 ± 10 nm ilgio šviesa, o emisija matuojama esant 510 ± 5 nm bangos ilgiui (žalioji emisija). Gaunamos fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo agregacijos laiko kreivės. Matavimo paklaidos mažos, nes, rotorui sukantis, visi mėginiai palaikomi toje pačioje temperatūroje judančio oro dėka.



2.1 pav. Rotor-Gene veikimo schema (adaptuota iš [73]).

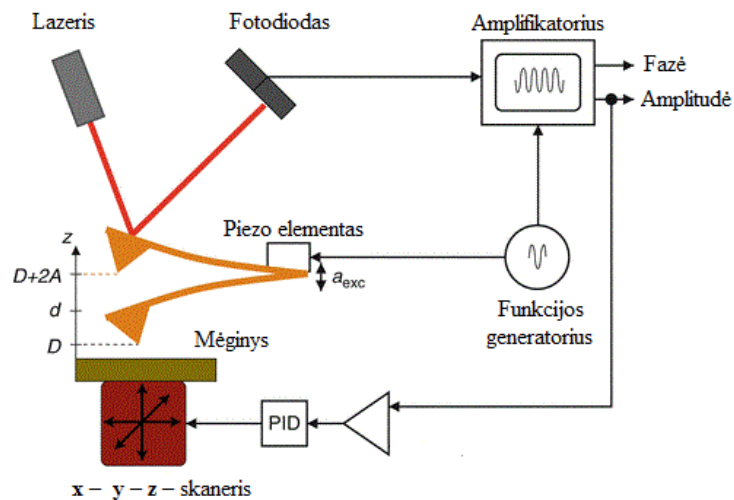
2.2.5. Atominės jėgos mikroskopija

Insulino agregatai: agregatai ruošiami 1mM insulino ir 1mM flavono tirpalą inkubuojant termomikseryje (purtymas – 300 apsisukimų per minutę, Ditas MHR 23) 60°C temperatūroje 2 dienas.

Susidarę agregatai 100 kartų skiedžiami dejonizuotu vandeniu ir 10 μ l mišinio užnešama ant švaraus, ką tik nulupto žėručio. AJM naudojamas žėrutis yra daugiasluoksnis. Norint pastebėti kelių nm aukščio skirtumus, žėručio paviršius turi būti labai lygus ir švarus, todėl mėginys kiekvieną kartą

užnešamas ant naujai nulupto žėručio sluoksnio. Agregatai 1 minutę paliekami adsorbuotis, paskui žėručio paviršius nuplaunamas 1 mL vandens ir atsargiai išdžiovinamas, naudojant suspaustas azoto dujas.

Insulino amiloidinių fibrilių vaizdai gauti su MultiMode skanuojamojo zondo mikroskopu su Nanoscope IIIa kontrolieriu ir AS-12 E skanieriu ir aliuminiu dengtu NCHR silicio zonu (adata) (Nanosensors). Mikroskopo skanieris juda (X, Y, Z ašimis) virš bandinio paviršiaus ore, o zondas kontaktuoja su mėginiu virpinamuoju (TappingMode™) režimu. Atominio mikroskopo zondas yra pritvirtintas prie lankstaus liežuvėlio, kuris virpa savo rezonansiniu dažniu (~ 250-330 kHz), 20 – 100 nm amplitude. Skanuojant adata lengvai stuksena bandinio paviršių, o liežuvėlio atsilenkimas registruojamas lazerio spinduliu. Atsispindėję lazerio spinduliai patenka į fotodiodinį detektoriu, paskui informacija keliauja į elektroninį detektoriu, kur iš lazerio nuokrypio kampo, kuris proporcingas zondo aukščiui, suprojektuojamas paviršiaus reljefo vaizdas (2.2 pav).



2.2 pav. Atominės jėgos mikroskopo veikiančiu virpinamuoju režimu veikimo principas [74].

2.2.6. Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija

Insulino agregatai: agregatai ruošiami sunkiame vandenyje 1mM insulino ir 1mM flavono tirpalą inkubuojant termomikseryje (purtymas – 300 apsisukimų per minutę, Ditabis MHR 23) 60°C temperatūroje 2 dienas.

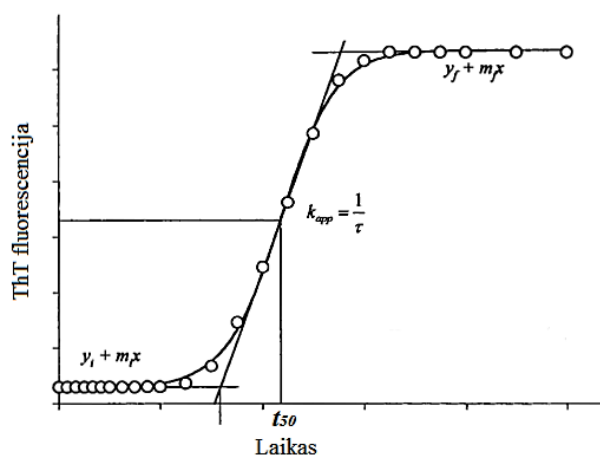
FTIR spektroskopinei analizei naudotas 15 μ L insulino agregatų mėginys, kuris įnešamas į CaF_2 matavimo celę su 0,05 mm tarpine (prieš kiekvieną bandymą celė išplaunama dejonizuotu vandeniu ir išdžiovinama). Mėginio FTIR spektras išvedamas iš 256 pakartojimų.

FTIR spektrai buvo gauti naudojant Nicolet 5700 spektrometrą su gyvsidabrio – kadmio – teliurido detektoriumi, kuris šaldomas skystu azotu. Spektrų antros išvestinės gautos pasitelkiant Savitzky-Golay skaitmeninį filtrą. Visi duomenys buvo apdoroti naudojantis Grams programine įranga.

2.2.7. Duomenų apdorojimas

Eksperimentų metu gautos ThT fluorescencijos kreivės buvo apdorojamos Microsoft Excel ir Origin 8 programomis.

Spontaninės insulino agregacijos kinetika gali būti apibūdinama sigmoidine kreive, kur pradžioje (*lag* fazėje) ThT fluorescencijos beveik nėra, paskui, didėjant susidariusių fibrilių kiekiui, matomas ThT fluorescencijos intensyvumo augimas, kuris galiausiai stabilizuojasi pasibaigus fibrilių formavimuisi (2.3 pav.) [41].



2.3 pav. Spontaninio insulino fibrilių susidarymo kreivė (adaptuota iš [41]).

Spontaninės insulino agregacijos metu gautos ThT fluorescencijos priklausomybės nuo laiko kreivės pirmiausia buvo normalizuotos nuo 0 (nėra susidariusių fibrilių – *lag* fazė) iki 1 (visas baltymas yra fibrilėse). Tada matavimai Origin programa buvo aproksimuoti naudojant sigmoidinę kreivę pagal lygtį:

$$Y = y_i + m_i x + \frac{y_f + m_f x}{1 + e^{-[(x - t_{50})/\tau]}}$$

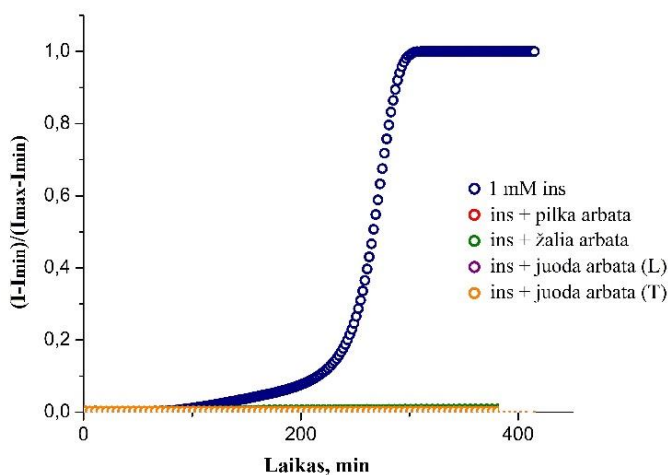
kur Y – fluorescencijos intensyvumas, x – laikas ir t_{50} – laikas, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio insulino, [41]. Skirtingų sąlygų įtaka spontaniniam insulino amiloidinių fibrilių susidarymui buvo vertinama lyginant gautą dydį t_{50} .

Statistinė analizė buvo atliekama iš 4 – 10 eksperimentų, naudojant Stjudento t skirstinį, kai $p = 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Arbatos įtakos insulino amiloidinei agregacijai tyrimai

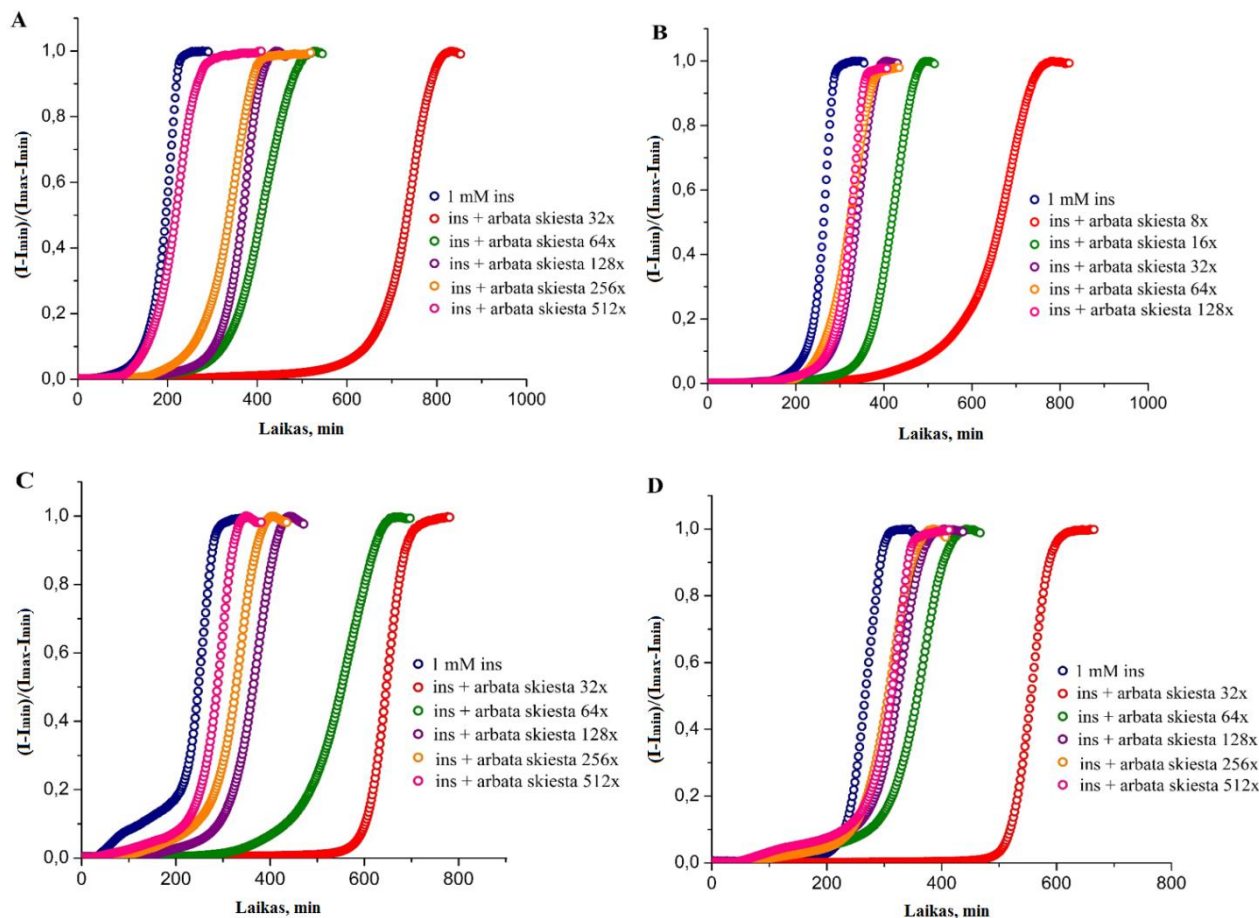
Pirmajame magistrinio darbo tyrimų etape buvo analizuojama skirtingų arbatų rūšių įtaka insulino amiloidogenezei. Tiriamajame mišinyje esant pradinei arbatos koncentracijai (pakelis: 1,2 – 2 g/100 mL) insulino fibrilių susidarymo neatstato (3.1 pav). Toks agregacijos signalo nebuvimas galimas dėl insulino amiloidogenezės slopinimo arba dėl arbatos poveikio ThT fluorescencijai.



3.1 pav. Insulino fibrilių susidarymo kreivės reakcijos mišinyje esant ir neesant arbatoms.

Norint nustatyti tikslesnį kiekvienos arbatos poveikį agregacijai buvo atlikti išsamesni insulino amiloidogenezės tyrimai su mažesnėmis arbatos koncentracijoms. Analizuojant pilkąją „Twinning“ arbatą, insulino fibrilių susidarymo slopinimas stebimas arbatos koncentracijai reakcijos mišinyje esant net 32 kartus mažesnei nei pradiniam tirpale. Toliau mažinant arbatos koncentraciją, agregacijos laikas trumpėja, todėl galima daryti išvadą, kad pradinuose bandymuose insulino fibrilių susidarymas nebuvo stebimas dėl efektyvaus arbatos slopinančio poveikio. Arbatos koncentracijai reakcijos mišinyje esant 512 kartų mažesnei nei pradiniam tirpale, insulino agregacijos laikas beveik nesiskiria nuo kontrolės (3.2 pav. A). Tiriant žaliosios arbatos įtaką insulino fibrilių susidarymui, stiprus agregacijos slopinimas pastebimas žaliosios arbatos koncentracijai reakcijos mišinyje esant 8 kartus mažesnei nei pradiniam arbatos tirpale. Mažinant arbatos koncentraciją (skiedžiant iki 128 kartų), insulino agregacijos laikas trumpėja (3.2 pav. B). Dviejų skirtingų firmų („Lipton“ ir „Twinning“) juodosios arbatos buvo tiriamos norint nustatyti šių arbatų poveikį insulino agregacijai. Abiejų arbatų analizės atveju didžiausia arbatos koncentracija, kuriai esant dar buvo matoma insulino

agregacija, buvo 32 kartus mažesnė nei pradiniam tirpale. Slopinimo stiprumas mažinant arbatos koncentraciją silpnėja ir reakcijos mišinyje esant 512 kartų mažesnei arbatos koncentracijai yra minimalus (3.2 pav. C, D).



3.2 pav. Spontaninės insulino agregacijos laiko priklausomybė nuo arbatos koncentracijos. **A)** insulino fibrilių susidarymo kreivės esant skirtingoms pilkosios arbatos koncentracijoms; **B)** insulino agregacijos kreivės reakcijos mišinyje esant skirtingoms žaliosios arbatos koncentracijoms; Insulino amiloidogenezės kreivės esant skirtingoms koncentracijoms juodosioms arbatoms **C)** „Lipton“ firmos, **D)** „Twinnings“ firmos.

Norint tarpusavyje palyginti visų arbatų įtaką insulino amoloidogenezei, kiekvienam eksperimentui apskaičiuojame santykinę agregacijos puslaikį (t_{50}), iš kurio galima spręsti apie arbatos slopinimo efektyvumą (santykinis t_{50} priklauso nuo insulino agregacijos ir parodo kiek kartų ilgiau vyko insulino agregacija reakcijos mišinyje esant arbatai). Iš šių duomenų (3 lentelė) galima daryti išvadą, kad stipriausiai insulino fibrilių susidarymą slopina pilkoji arbata: esant arbatos koncentracijai 32 kartus mažesnei nei pradiniam arbatos tirpale, insulino agregacija vyksta tris kartus ilgiau nei

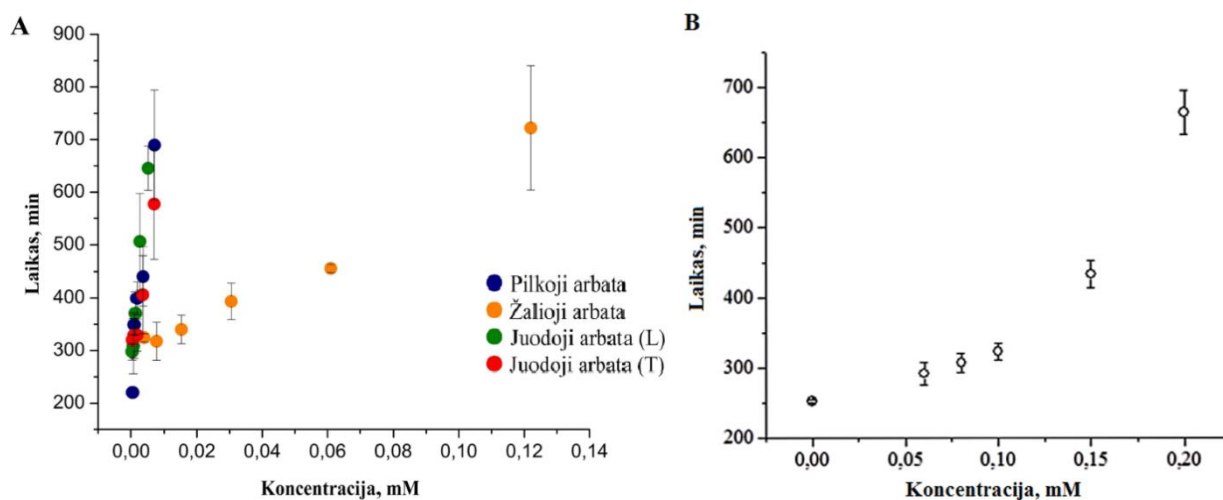
insulino agregacija be arbatos. Juodosios arbatos insulino amiloidogenezę veikia šiek tiek silpniau. Esant tokiai pačiai juodosios „Lipton“ arbatos koncentracijai, insulino agregacijos laikas pailgėja beveik 2,5 karto, o juodosios „Twinning“ – apie du kartus. Žaliosios arbatos slopinantis poveikis atrodo silpniausias: reakcijos mišinyje esant arbatos koncentracijai tik 8 kartus mažesnei nei pradiniam arbatos tirpale insulino agregacijos laikas pailgėja apie 2,7 karto.

3 lentelė. Arbatų slopinimo efektyvumo palyginimas (paklaidos paskaičiuotos iš 4-10 eksperimentų).

		8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x
Pilkoji arbata	Santykinis <i>t₅₀</i>	-	-	3,03 ±0,74	1,94 ± 0,34	1,77 ± 0,31	1,54 ± 0,21	1,09 ± 0,05
Žalioji arbata	Santykinis <i>t₅₀</i>	2,72 ± 0,45	1,72 ± 0,03	1,48 ± 0,13	1,28 ± 0,10	1,19 ± 0,14	1,22 ± 0,03	-
Juodoji arbata (L)	Santykinis <i>t₅₀</i>	-	-	2,47 ± 0,16	1,93 ± 0,35	1,42 ± 0,15	1,18 ±0,20	1,14 ±0,06
Juodoji arbata (T)	Santykinis <i>t₅₀</i>	-	-	2,07 ±0,37	1,48 ±0,25	1,20 ±0,11	1,19 ±0,15	1,18 ±0,03

Susanne M. Henning su bendrautoriais nustatė EGCG kiekį esantį šio magistrinio darbo metu tirtose arbatose [69]. Jeigu darysime prielaidą, kad arbatos slopinantis poveikis priklauso tik nuo EGCG, tai remiantis Susanne M. Henning duomenis galima apskaičiuoti EGCG koncentraciją esančią kiekvienos arbatos pradiniam tirpale bei jos praskiedimuose ir nubraižyti insulino agregacijos laiko priklausomybės nuo EGCG kiekio esančio arbatose grafiką (3.3 pav. A).

Insulino fibrilių susidarymo priklausomybė nuo EGCG koncentracijos taip pat buvo tirta mano bakalaurnio darbo metu (3.3 pav. B). Tik, skirtingai nuo šių tyrimų, analizei buvo naudojamas grynas EGCG, o ne arbatos.



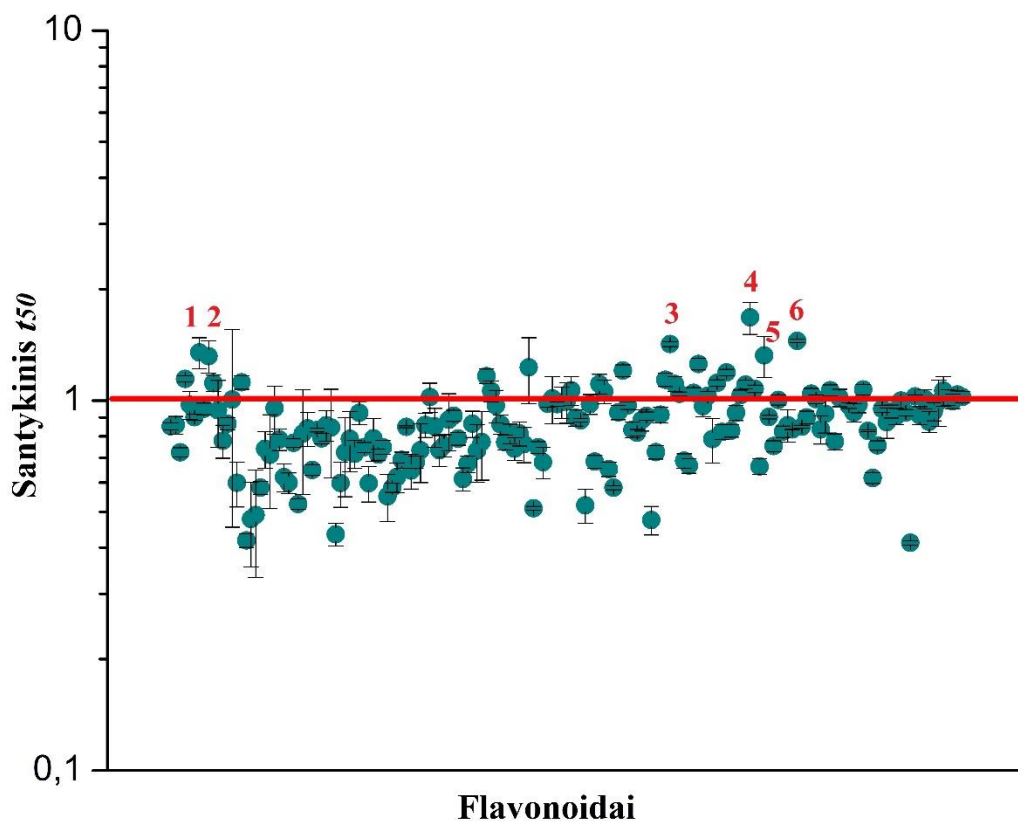
3.3 pav. Spontaninės insulino agregacijos laiko priklausomybė nuo EGCG koncentracijos arbatose (A) ir nuo gryno EGCG koncentracijos (B) (tyrimai atlikti bakalaurinio darbo metu). Paklaidos paskaičiuotos iš 6 – 10 eksperimentų.

Palyginus šiuos grafikus susidaro įspūdis, kad arbatoje esantis EGCG slopina insulino agregaciją geriau nei grynas EGCG. Reakcijos mišinyje esant 8 kartus praskiestai žaliajai arbatai, EGCG koncentracija apie 0,12 mM, tuo tarpu insulino agregacijos laikas labai panašus į tą, kuris būtų EGCG koncentracijai esant 0,2 mM. Pilkosios ir juodosios arbatų atveju panašus amiloidogenezės laikas stebimas esant dar mažesnėms EGCG koncentracijoms arbatose (apie 0,01 mM). Arbatos slopina insulino fibrilių susidarymą žymiai efektyviau, nei grynas EGCG, todėl galima manyti, kad insulino agregacijos slopinimą lemia ne tik arbatose esantis EGCG, bet ir kiti junginiai. Insulino fibrilių susidarymo laikas yra panašus žaliosios arbatos ir gryno EGCG koncentracijoms skiriantis tik apie du kartus, todėl galima daryti išvadą, kad šios arbatos slopinantį poveikį daugiausiai lemia EGCG. Juodosios ir pilkosios arbatų atveju EGCG koncentracijos skiriasi apie 20 kartų, vadinasi šiose arbatose esančių kitų medžiagų poveikis yra žymiai didesnis nei EGCG.

3.2. Flavonoidų įtakos insulino amiloidinei agregacijai tyrimai

Arbatos sudėtyje be EGCG yra ir įvairių kitų flavonoidų, kurie taip pat galėtų slopinti amiloidinių baltymų agregaciją ir būti potencialiais vaistiniais preparatais, kovojant su amiloidogeninėmis ligomis. Šio magistrinio darbo metu buvo ištirtas 168 flavonoidų poveikis insulino agregacijai. Iš gautų duomenų apskaičiuotas santykinis insulino agregacijos puslaikis (t_{50}) (1 priedas), jų palyginimas pateikiamas 3.4 paveiksle. Buvo nustatyta, kad dauguma ištirtų flavonoidų neturėjo įtakos insulino amiloidogenezei, o kai kurie net ir greitino agregaciją. Vidutiniškai insulino

amiloidogenezę lėtino : 4'-hidroksiflavonas (1) apie 1,34 karto, 8-karboksi-3-metoksiflavonas (2) apie 1,31 karto, 3,6,3',4'-tetrametoksiflavonas (3) apie 1,42 karto, 3-hidroksi-7,8,2'-trimetoksiflavonas (4) apie 1,67 karto, Myricetinas (5) apie 1,32 karto, o 3'-hidroksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavonas (6) insulino agregaciją lėtino apie 1,45 karto.



3.4 pav. Flavonų įtakos insulino agregacijai palyginimas. Pavaizduotas kiekvieno flavono santykinis t_{50} , parodantis kiek kartų insulino amiloidogenezė esant flavono skyrėsi nuo kontrolės (insulino agregacijos esant DMSO). Flavonai, kurių santykinis t_{50} didesnis nei 1 lėtina insulino fibrilių susidarymą, o tie kurie mažesnis – greitina. Skaičiais pažymėti vidutiniškai agregaciją slopinantys flavonoidai: 1 – 4'-hidroksiflavonas, 2 – 8-karboksi-3-metoksiflavonas, 3 – 3,6,3',4'-tetrametoksiflavonas, 4 – 3-hidroksi-7,8,2'-trimetoksiflavonas, 5 – Myricetinas, 6 – 3'-hidroksi-5,6,7,4'-tetrametoksiflavonas. Paklaidos paskaičiuotos iš 4 – 6 eksperimentų.

Palyginus šio magistrinio darbo metu gautus rezultatus su literatūros duomenimis, pastebėta keletas neatitikimų. Savo darbuose T. Akaish, H. Ushikubo ir K. Ono aprašo, fisetino, morino ir kvercetino slopinantį poveikį amiloido β fibrilių susidarymui, o J. Wang – kvercetino slopinantį poveikį insulino fibrilių susidarymui. Šio darbo metu ištyrus fisetino, morino ir kvercetino poveikį

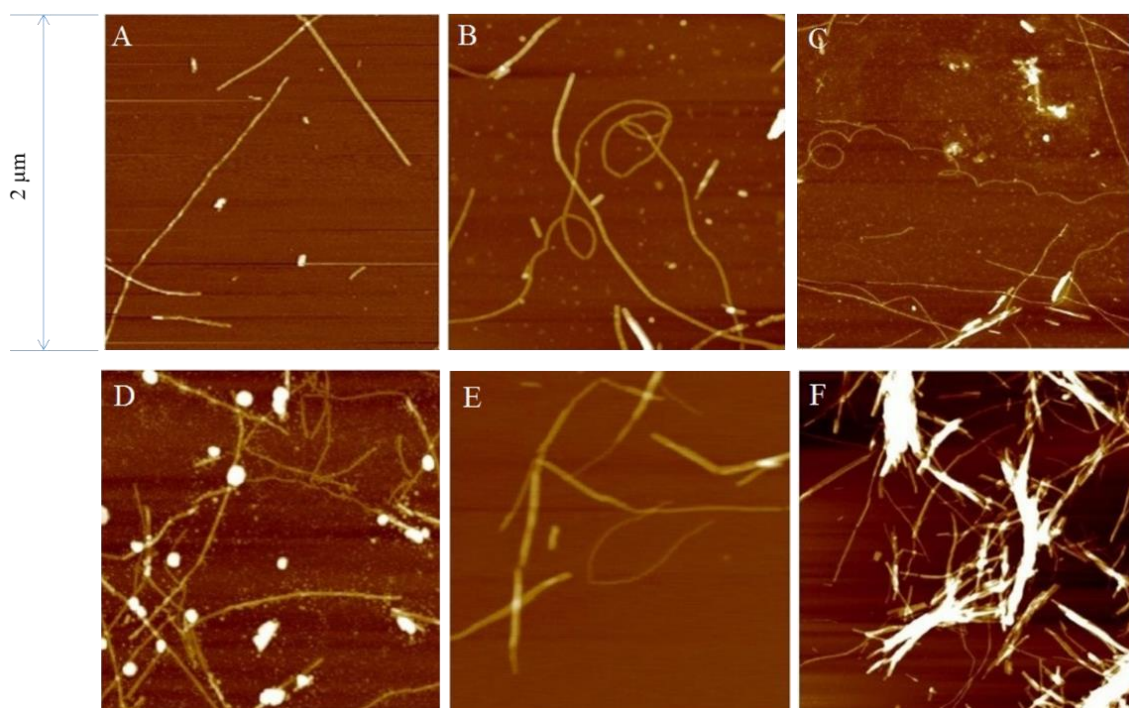
insulino agregacijai, slopinanti įtaka nepastebėta. Fisetino santykinis agregacijos puslaikis yra apie 0,60, morino – apie 0,93, kvercetino – apie 0,94, tai yra < 1 (santykinio t_{50} duomenys pateikiami 1 priede). Agregacijai stebėti šie autoriai taip pat naudoja ThT fluorescenciją, bet apie teigiamą flavonoidų įtaką amiloidogenezei sprendžia tik remdamiesi jos intensyvumo sumažėjimu. Tai nėra teisinga, nes fluorescencijos intensyvumas gali smarkiai keistis net jei flavonoidų molekulės tiesiogiai nedaro įtakos insulino agregacijai. Tai atvejais, jei flavonoidai tiesiog trukdytų ThT jungtis prie amiloidinių fibrilių, absorbuotų ThT fluorescenciją ar tiesiogiai sąveikautų su ThT molekulėmis, fluorescencijos intensyvumas pasikeistų nepriklausomai nuo insulino agregacijos greičio. Todėl flavonų įtaka amiloidinei agregacijai turėtų būti vertinama lyginant agregacijos greičius (remiantis agregacijos puslaikio (t_{50}) nustatymu), o ne ThT fluorescencijos intensyvumus. Esant fibrilių susidarymo slopinimui amiloidinės agregacijos laikas išauga, o t_{50} didėja [68].

Iš viso, kartu su kolegomis, ištyrėme 265 flavonoidus, tarp kurių buvo rasti penki labai efektyvūs amiloidinės agregacijos slopikliai: 7,8,2'-trihidroksiflavonas, Scutelareinas, Luteolinas, 3,6,2',4',5'-pentahidroksiflavonas, Gosypetinas. Apibendrinant visų tyrėjų duomenis buvo pastebėta, kad slopinančiu poveikiu pasižymėjo tik flavonoidai turintys metoksi ir hidroksi šonines grupes. Efektyviausi fibrilių susidarymo slopikliai turėjo keturis hidroksi pakaitus, nors tris, penkias ar šešias hidroksi grupes turintys flavonoidai taip pat gerai slopino insulino agregaciją. Dvi ar mažiau hidroksi grupes turintys flavonoidai neturėjo įtakos amiloidogenezei. Padaryta išvada, kad potencialiu slopinančiu poveikiu pasižymi flavonoidas, turintis mažiausiai tris hidroksi pakaitus, o papildomos šoninės grupės taip pat gali padidinti ar sumažinti slopinimo efektyvumą [68].

Norint tikrai įsitikinti, kad 7,8,2'-trihidroksiflavonas, Scutelareinas, Luteolinas, 3,6,2',4',5'-pentahidroksiflavonas ir Gosypetinas tikrai yra potencialūs amiloidinės agregacijos slopikliai reikėtų atlikti platesnius šių flavonoidų tyrimus, kuriuose būtų nustatytas jų poveikis kitiems amiloidines fibriles sudarantiems baltymams.

Nors dauguma tirtų flavonų nedarė įtakos insulino agregacijos kinetikai, bet, išanalizavus insulino fibrilių, susidariusių esant flavonoidams, struktūras, pastebėti akivaizdūs skirtumai. Atominės jėgos mikroskopijos pagalba gautose fibrilių vaizduose matome, kad skirtingiems flavonoidams esant reakcijos mišinyje, susidaro nevienodos morfologijos insulino fibrilės (3.5 pav). Paveiksle 3.5. A matome, kad tirpale esant 5 % DMSO susidaro tiesios, nešakotos insulino fibrilės. Insulino agregacijos metu reakcijos mišinyje esant flavono, susidarę agregatai atrodo ilgesni, labiau

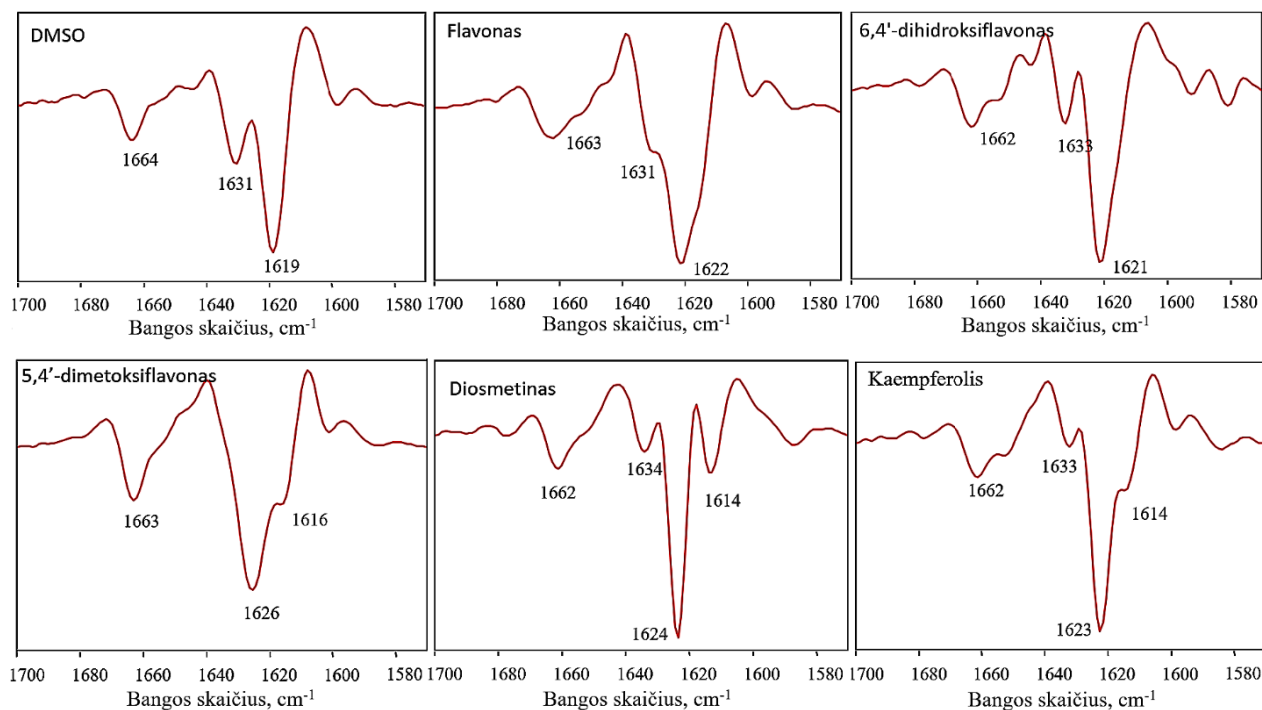
susiviję (3.5 B). Tirpale esant 6,4'-dihidroksiflavono susiformavusios insulino fibrilės banguotos, taip pat linkusios suktis (3.5 C). Agreguojant insulinui reakcijos mišinyje esant 5,4'-dimetoksiflavono, matome susidariusias agregatų sancaupas (D). Diosmetino poveikyje susiformavusios insulino fibrilės atrodo storesnės ir didenės. Reakcijos mišinyje esant Kaempferolio, fibrilės sudaro plaušinius agregatus (3.5 F). Iš žemiau pateiktų vaizdų matome, kad insulino fibrilės, susidariusios esant įvairiems flavonoidams, skiriasi nuo insulino fibrilių, susiformavusių tik esant DMSO.



3.5 pav. Insulino fibrilės, susidariusios esant skirtingoms sąlygoms: **A)** agregacijos mišinyje esant 5% DMSO; **B)** Flavono; **C)** 6,4'-dihidroksiflavonas, **D)** 5,4'-dimetoksiflavono; **E)** Diosmetino, **F)** Kaempferolio.

Insulino fibrilių, susidariusių esant skirtingoms sąlygoms, antrinės struktūros pokyčius parodo ir FTIR spektroskopija (3.6 pav.). Insulino fibrilių, susidariusių esant DMSO, spektro antroje išvestinėje matome du pagrindinius amido I ruožo minimumus būdingus β – klostėms (1631 cm^{-1} , 1619 cm^{-1}). Flavono ir 6,4'-dihidroksiflavono poveikyje susiformavusių fibrilių spektro antrosios išvestinės labai panašios į DMSO spektro išvestines. Matome, kad amido I ruožo smailių formos beveik nesiskiria, o jų poslinkis nedidelis. Galime teigti, kad flavono ir 6,4'-dihidroksiflavono poveikis insulino amiloidinių fibrilių struktūrai yra nedidelis. Agregatų, susidariusių reakcijos mišinyje esant 5,4'-dimetoksiflavono, spektro antrosios išvestinės amido I ruožo minimumai pasislinkę link mažesnių bangos skaičių (1626 cm^{-1} , 1616 cm^{-1}). Insulino fibrilių, susidariusių tirpale

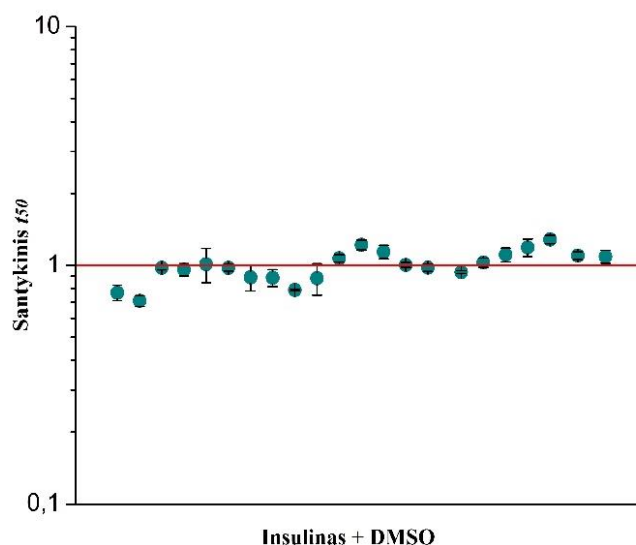
esant Diosmetino, spektro antroji išvestinė labai skiriasi nuo buvusių prieš tai. Matome tris amido I ruožo minimumus (1634 cm^{-1} , 1624 cm^{-1} , 1614 cm^{-1}), be to smailės forma visiškai kitokia nei DMSO išvestinės atveju. Keampferolio poveikyje susidariusių insulino fibrilių spektro antroje išvestinėje taip pat matome tris minimumus (1633 cm^{-1} , 1623 cm^{-1} , 1614 cm^{-1}) ir kitokią smailių formą. Fibrilių, susiformavusių tirpale esant Diosmetino ir Keampferolio, spektro antrosios išvestinės labai skiriasi nuo insulino fibrilių, susidariusių esant DMSO, spektro išvestinės. Vadinasi, šių flavonoidų poveikyje susidariusios fibrilės yra skirtingos ir turi skirtingą β -klostytą struktūrą.



3.6 pav. Insulino agregatų, susidariusių esant skirtingiems flavonams, FTIR spektrų antrosios išvestinės.

3.3. Insulino agregacijos priklausomybės nuo pH tyrimai

Atlikdami flavonoidų įtakos insulino agregacijai tyrimus, pastebėjome nedidelius kontrolių (insulino esant DMSO) agregacijos laikų skirtumus. Paskaičiavę santykinius kontrolių agregacijos puslaikius, įsitikinome didesne nei paklaidų ribos insulino agregacijos variacija (3.7 pav.). Tokia didelė agregacijos puslaikio variacija tyrimą atliekant tokiomis pačiomis sąlygomis nėra normali. Kilo įtarimas, kad dėl šių insulino agregacijos kinetikos skirtumų gali būti kaltas netinkamas insulino tirpalo paruošimas.



3.7 pav. Insulino agregacijos esant DMSO santykinių agregacijos puslaikių palyginimas.

Visuose ankstesniuose tyrimuose insulinas buvo tirpinamas buferiniame tirpale, ruoštame pagal teorinius apskaičiavimus, manant, kad nedideli pH skirtumai nepaveiks insulino fibrilių susidarymo kinetikos. Hipotezei patikrinti buvo atlikti insulino agregacijos priklausomybės nuo pH tyrimai, kurių rezultatai pateikiami ketvirtoje lentelėje.

4 lentelė. Insulino agregacijos puslaikiai esant skirtingiems pH (paklaidos paskaičiuotos iš 4 eksperimentų).

pH	Agregacijos t_{50} , min
1,4	208,76 ± 24,26
1,6	300,09 ± 40,89
1,8	354,36 ± 14,77
2	257,31 ± 3,50
2,2	191,89 ± 2,58
2,4	207,89 ± 6,88
2,6	281,48 ± 11,94

Iš 4 lentelės matome, kad pH, iš tikrųjų, turi didelę įtaką insulino amiloidogenezei. Net nedideli pH skirtumai lemia insulino agregacijos kinetikos pokyčius. Esant pH 1,8 insulino agregacijos puslaikis yra apie 354 min., esant pH 2 ~ 257 min., o insuliną tirpinant buferiniame tirpale, kurio pH 2,2 agregacijos puslaikis sumažėja iki ~ 191 min. Taigi, teoriniais apskaičiavimais remiantis

paruošto buferinio tirpalo pH skirtumai, galėjo lemti kontrolės agregacijos kinetikos pokyčius (tyrimuose naudojamas insulinas tirpintas teoriškai paruoštame 100 mM PB pH2).

Esant skirtingiems flavonoidams, susidariusių insulino fibrilių morfologiniai pokyčiai taip pat galėjo būti lemti nedidelių pH pokyčių (3.5. pav.). Šio teiginio patikrinimui buvo paruošti insulino agregatai skirtinguose pD sunkiame vandenyje. Insulino fibrilės mano kolegų buvo iširtos atominiu mikroskopu ir Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopu. Gauti fibrilių vaizdai ir FTIR spektrų antrosios išvestinės. Skirtinguose pD atsiradę insulino fibrilių struktūros pokyčiai ir Amido I vibracijos ruožo poslinkiai buvo labai panašūs į pokyčius, kurie, manyta, buvo atsiradę dėl skirtingų flavonoidų įtakos. Padaryta išvada, kad insulino fibrilių morfologinius skirtumus lėmė ne flavonoidai, o nedideli pH skirtumai [75].

IŠVADOS

- Nustatyta, kad epigalokatechin-3-galatas yra nevienintelis arbatos komponentas, slopinantis insulino fibrilių susidarymą. Žaliosios arbatos slopinantį poveikį daugiausiai lemia EGCG, o pilkosios ir juodosios arbatų atveju – kitos medžiagos.
- Tarp ištirtų 168 skirtingų flavonoidų nebuvo rasta efektyvaus insulino amiloidinės agregacijos slopiklio. Dauguma flavonoidų neturėjo įtakos arba greitino insulino amiloidogenezę.
- Apibendrinus šio magistrinio darbo metu gautus duomenis, buvo iškelta hipotezė, kad flavonoidai lemia insulino fibrilių struktūrą. Vis dėlto, vėlesni tyrimai šią hipotezę paneigė.

Effect of flavonoids on insulin amyloid aggregation

SUMMARY

Protein amyloid-like fibril formation is responsible for a number of widespread diseases, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. In order to cure these conditions, it is important to find amyloidogenic aggregation inhibitors or compounds, which could remodel amyloid fibrils. Polyphenols flavonoids, commonly found in fruits and vegetables, could be potential therapeutic agents for curing amyloidosis. Flavonoids are best known for their antioxidant, antimicrobial and anticancer effect.

The purpose of this work was to test the effect of different flavonoids on insulin amyloid-like fibril formation.

Methods. Using Thioflavin T assay we examined the influence of three different types of teas and 168 flavonoids. Moreover, the effect of flavonoids on insulin fibrils structure was investigated by atomic microscopy and Fourier transform infrared spectroscopy.

Results and conclusions. It was found out that green, grey and black teas inhibit insulin amyloidogenic aggregation. The inhibiting effect of green tea was due to its common flavonoid epigallocatechin-3-gallate, while other substances were the major compounds accountable for the influence of grey and black teas. Furthermore, from a total of 168 flavonoids we were able to determine that most of the tested flavonoids had no significant effect on insulin aggregation. Finally, it has been found that structural changes in insulin fibrils are mostly induced by pH variation rather than flavonoids.

Keywords: insulin, amyloid aggregation, flavonoids, tea, Thioflavin T

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Mokslinės publikacijos:

- Malisauskas R, Botyriute A, Cannon JG, Smirnovas V. Flavone derivatives as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation. *PLoS One* 2015; 10: e0121231.
- Sneideris T, Darguzis D, Botyriute A, Grigaliunas M, Winter R, Smirnovas V. pH-Driven Polymorphism of Insulin Amyloid-Like Fibrils. *PLoS One* 2015; 10: e0136602.

LITERATŪROS SARAŠAS

- [1] Alzheimer's Disease International. 2016 Alzheimer's Statistics. Interneto prieiga: <http://www.alzheimers.net/resources/alzheimers-statistics/>.
- [2] Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 333–66.
- [3] Hudson S a, Ecroyd H, Dehle FC, Musgrave IF, Carver J a. (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) maintains kappa-casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway. *J Mol Biol* 2009; 392: 689–700.
- [4] Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* 2010; 9: 702–716.
- [5] Doig AJ, Derreumaux P. Inhibition of protein aggregation and amyloid formation by small molecules. *Curr Opin Struct Biol* 2015; 30: 50–56.
- [6] Ferreira N, Cardoso I, Domingues MR, Vitorino R, Bastos M, Bai G, et al. Binding of epigallocatechin-3-gallate to transthyretin modulates its amyloidogenicity. *FEBS Lett* 2009; 583: 3569–76.
- [7] Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, et al. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 558–566.
- [8] Rambold AS, Miesbauer M, Olschewski D, Seidel R, Riemer C, Smale L, et al. Green tea extracts interfere with the stress-protective activity of PrP and the formation of PrP. *J Neurochem* 2008; 107: 218–29.
- [9] Akaishi T, Morimoto T, Shibao M, Watanabe S, Sakai-Kato K, Utsunomiya-Tate N, et al. Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid β protein. *Neurosci Lett* 2008; 444: 280–285.
- [10] Ushikubo H, Watanabe S, Tanimoto Y, Abe K, Hiza A, Ogawa T, et al. Neuroscience Letters 3, 3, 4, 5, 5 -Pentahydroxyflavone is a potent inhibitor of amyloid β fibril formation. *Neurosci Lett* 2012; 513: 51–56.
- [11] Librizzi F, Rischel C. The kinetic behavior of insulin fibrillation is determined by heterogeneous nucleation pathways. *Protein Sci* 2005; 14: 3129–3134.
- [12] Burke MJ, Rougvie MA. Cross- β protein structures. I. Insulin fibrils. *Biochemistry* 1972; 11:

2435–2439.

- [13] Puchtler H, Sweat F. A review of early concepts of amyloid in context with contemporary chemical literature from 1839 to 1859. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 123–134.
- [14] Makin OS, Serpell LC. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J* 2005; 272: 5950–5961.
- [15] Sipe JD, Cohen a S. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* 2000; 130: 88–98.
- [16] Marshall KE, Serpell LC. Insights into the Structure of Amyloid Fibrils. *Open Biol J* 2009; 185–192.
- [17] Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2007; 159: 1–77.
- [18] Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl)* 2003; 81: 678–99.
- [19] Armstrong RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease. *Folia Neuropathol* 2009; 289–299.
- [20] Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Preformed β -amyloid fibrils are destabilized by coenzyme Q10 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 111–116.
- [21] Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis* 2012; 2012: 731526.
- [22] Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW. Tau, tangles, and Alzheimer’s disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2005; 1739: 216–223.
- [23] Brion JP. Neurofibrillary tangles and Alzheimer’s disease. *Eur Neurol* 1998; 40: 130–140.
- [24] Gong C-X, Iqbal K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem* 2008; 15: 2321–8.
- [25] Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, et al. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer’s disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur J Neurol* 2007; 14: 1–26.
- [26] Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, Malm T. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2015; 1862: 403–410.
- [27] Kawikova I, Askenase PW. Diagnostic and therapeutic potentials of exosomes in CNS diseases. *Brain Res* 2015; 1617: 63–71.
- [28] Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, et al. Identification of preclinical Alzheimer’s disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer’s Dement* 2015; 11: 600–607.e1.

- [29] Demencijų diagnostiniai kriterijai ir vertinimo skalės. Neurologijos seminarai 2000. *Neurologijos Seminarai 2000*; 2(10): 18–9.
- [30] Margevičiūtė R, Bagdonas A, Butkus K, Kuzmickienė J, Vaitkevičius A, Kaubrys GF, et al. Adenbruko kognityvinio tyrimo metodikos – taisytos adaptacija lietuviškai kalbantiems gyventojams (ACE-R LT). *Neurologijos Seminarai 2013*; 17(55): 29–51.
- [31] Kumar S, Udgaonkar J. Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Curr Sci*; 98.
- [32] Andersen CB, Yagi H, Manno M, Martorana V, Ban T, Christiansen G, et al. Branching in amyloid fibril growth. *Biophys J* 2009; 96: 1529–36.
- [33] Buell AK, Dhulesia A, White D a, Knowles TPJ, Dobson CM, Welland ME. Detailed analysis of the energy barriers for amyloid fibril growth. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51: 5247–51.
- [34] Lin M-S, Chen L-Y, Tsai H-T, Wang SS-S, Chang Y, Higuchi A, et al. Investigation of the mechanism of beta-amyloid fibril formation by kinetic and thermodynamic analyses. *Langmuir* 2008; 24: 5802–8.
- [35] Dzwolak W, Smirnovas V, Jansen R, Winter R. Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner: An FT-IR spectroscopic study. *Protein Sci* 2004; 13: 1927–1932.
- [36] Pedersen JS, Andersen CB, Otzen DE. Amyloid structure – one but not the same : the many levels of fibrillar polymorphism. 2010; 277: 4591–4601.
- [37] Pedersen JS, Dikov D, Flink JL, Hjuler HA, Christiansen G, Otzen DE. The changing face of glucagon fibrillation: Structural polymorphism and conformational imprinting. *J Mol Biol* 2006; 355: 501–523.
- [38] Kučinskienė ZA. Klinikinės biochemijos ir laboratorinės diagnostikos pagrindai. *Vilnius Vilniaus Universiteto l-kla* 2008; 409 p.
- [39] Lee C-C, Nayak A, Sethuraman A, Belfort G, McRae GJ. A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophys J* 2007; 92: 3448–58.
- [40] Ball DW, Hill JW, Scott RJ. The basics of general, organic, and biological chemistry. *Flat World Knowledge*; 2011.
- [41] Nielsen L, Khurana R, Coats a, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, et al. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* 2001; 40: 6036–46.
- [42] Dische FE, Wernstedt C, Westermark GT, Westermark P, Pepys MB, Rennie JA, et al. Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* 1988; 31: 158–61.

- [43] Shikama Y, Kitazawa J, Yagihashi N, Uehara O, Murata Y, Yajima N, et al. Localized Amyloidosis at the Site of Repeated Insulin Injection in a Diabetic Patient. *Intern Med* 2010; 49: 397–401.
- [44] Ivanova MI, Sievers SA, Sawaya MR, Wall JS, Eisenberg D. Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 18990–5.
- [45] Jiménez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson C V, Dobson CM, Saibil HR. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9196–201.
- [46] Kong J, Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; 39: 549–559.
- [47] Vassar PS, Culling CF. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* 1959; 68: 487.
- [48] LeVine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 1993; 2: 404–10.
- [49] Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Anal Biochem* 1989; 177: 244–249.
- [50] Biancalana M, Makabe K, Koide A, Koide S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to the surface of beta-rich peptide self-assemblies. *J Mol Biol* 2009; 385: 1052–63.
- [51] Sabaté R, Lascu I, Saupe SJ. On the binding of Thioflavin-T to HET-s amyloid fibrils assembled at pH 2. *J Struct Biol* 2008; 162: 387–396.
- [52] Tsai H-H, Gunasekaran K, Nussinov R. Sequence and Structure Analysis of Parallel β Helices: Implication for Constructing Amyloid Structural Models. *Structure* 2006; 14: 1059–1072.
- [53] Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AØ, Riekkel C, Grothe R, et al. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 2005; 435: 773–8.
- [54] Dzwolak W, Pecul M. Chiral bias of amyloid fibrils revealed by the twisted conformation of Thioflavin T: an induced circular dichroism/DFT study. *FEBS Lett* 2005; 579: 6601–3.
- [55] Sun. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discov Ther* 2012; 6: 285–290.
- [56] Durairajan SSK, Yuan Q, Xie L, Chan WS, Kum WF, Koo I, et al. Salvianolic acid B inhibits A β fibril formation and disaggregates preformed fibrils and protects against A β -induced cytotoxicity. *Neurochem Int* 2008; 52: 741–750.
- [57] De Felice FG, Houzel J-CC, Garcia-Abreu J, Louzada PR, Afonso RC, Meirelles MN, et al. Inhibition of Alzheimer's disease beta-amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo

- deposition by nitrophenols: implications for Alzheimer's therapy. *FASEB J* 2001; 15: 1297–9.
- [58] Aisen P, Gauthier S, Vellas B, Briand R, Saumier D, Laurin J, et al. Alzhemed: A Potential Treatment for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2007; 4: 473–478.
- [59] Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009; 26: 1001–1043.
- [60] Chandrashekar IR, Adda CG, MacRaid C a, Anders RF, Norton RS. Inhibition by flavonoids of amyloid-like fibril formation by Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2. *Biochemistry* 2010; 49: 5899–908.
- [61] Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H, Neugebauer K, et al. EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 7710–7715.
- [62] Sang S, Lee M-J, Hou Z, Ho C-T, Yang CS. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 9478–84.
- [63] Palhano FL, Lee J, Grimster NP, Kelly JW. Toward the molecular mechanism(s) by which EGCG treatment remodels mature amyloid fibrils. *J Am Chem Soc* 2013; 135: 7503–10.
- [64] Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2003; 87: 172–181.
- [65] Sharoar MG, Thapa A, Shahnawaz M, Ramasamy VS, Woo E, Shin SY, et al. Keampferol-3-O-rhamnoside abrogates amyloid beta toxicity by modulating monomers and remodeling oligomers and fibrils to non-toxic aggregates. *J Biomed Sci* 2012; 19: 104.
- [66] Trivella DBB, dos Reis C V, Lima LMTR, Foguel D, Polikarpov I. Flavonoid interactions with human transthyretin: combined structural and thermodynamic analysis. *J Struct Biol* 2012; 180: 143–53.
- [67] Wang J-B, Wang Y-M, Zeng C-M. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 415: 675–9.
- [68] Malisauskas R, Botyriute A, Cannon JG, Smirnovas V. Flavone derivatives as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation. *PLoS One* 2015; 10: e0121231.
- [69] Henning SM, Fajardo-Lira C, Lee HW, Youssefian AA, Go VLW, Heber D. Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutr Cancer* 2003; 45: 226–35.

- [70] Kristen A V, Lehrke S, Buss S, Mereles D, Steen H, Ehlermann P, et al. Green tea halts progression of cardiac transthyretin amyloidosis: an observational report. *Clin Res Cardiol* 2012; 101: 805–813.
- [71] Mereles D, Wanker EE, Katus HA. Therapy effects of green tea in a patient with systemic light-chain amyloidosis. *Clin Res Cardiol* 2008; 97: 341–344.
- [72] Peterson J, Dwyer J, Bhagwat S, Haytowitz D, Holden J, Eldridge AL, et al. Major flavonoids in dry tea. *J Food Compos Anal* 2005; 18: 487–501.
- [73] Qiagen. Rotor-Gene Q rotary optics. Interneto prieiga: <http://www.slideshare.net/QIA>.
- [74] Aliano A, Cicero G, Nili H, Green NG, García-Sánchez P, Ramos A, et al. AFM, Tapping Mode. In: *Encyclopedia of Nanotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 99 p.
- [75] Sneideris T, Darguzis D, Botyriute A, Grigaliunas M, Winter R, Smirnovas V. pH-Driven Polymorphism of Insulin Amyloid-Like Fibrils. *PLoS One* 2015; 10: e0136602.

1 PRIEDAS

5 lentelė. Santykiniai insulino agregacijos puslaikiai reakcijos mišinyje esant skirtingiems flavonoidams (paklaidos paskaičiuotos iš 4-6 eksperimentų).

Flavonoidas	Santykinis <i>t</i> ₅₀	Paklaidos
3-hidroksiflavonas	0,85	0,02
5-hidroksiflavonas	0,86	0,05
6-hidroksiflavonas	0,72	0,02
7-hidroksiflavonas	1,14	0,02
2'-hidroksiflavonas	0,97	0,08
3'-hidroksiflavonas	0,90	0,02
4'-hidroksiflavonas	1,35	0,13
3-methoxyflavone	0,95	0,03
8-karboksi-3-metoksiflavonas	1,32	0,13
Kaempferolis	1,11	0,06
Kvercetas	0,94	0,19
7,8-dihidroksiflavonas	0,78	0,08
3-hidroksi-7-metoksiflavonas	0,87	0,03
Baikaleinas	1,01	0,55
Fisetinas	0,60	0,08
Flavonas	1,12	0,05
7,8-dimetoksiflavonas	0,42	0,02
2'-metoksiflavonas	0,48	0,12
5-metoksiflavonas	0,49	0,16
6-metoksiflavonas	0,58	0,02
7-metoksiflavonas	0,74	0,08
Apigeninas	0,71	0,20
Chrisinas	0,95	0,14
4'-hidroksi-5-metoksiflavonas	0,78	0,05
5,2'-dimetoksiflavonas	0,62	0,05

6,2'-dimetoksiflavonas	0,60	0,04
6,4'-dimetoksiflavonas	0,77	0,02
3,3'-dimetoksiflavonas	0,52	0,02
4'-hidroksi-7-metoksiflavonas	0,81	0,26
3-hidroksi-2'-metoksiflavonas	0,84	0,09
3-hidroksi-5-metoksiflavonas	0,65	0,02
3-hidroksi-6-metoksiflavonas	0,83	0,01
3-hydroxy-7-metoksiflavonas	0,79	0,03
7,2'-dimetoksiflavonas	0,86	0,08
3,6-dimetoksiflavonas	0,84	0,23
5,4'-dimetoksiflavonas	0,43	0,03
3,4'-dimetoksiflavonas	0,60	0,08
7,3'-dimetoksiflavonas	0,72	0,17
7,4'-dimetoksiflavonas	0,79	0,15
3,7-dimetoksiflavonas	0,72	0,06
3,2'-dimetoksiflavonas	0,93	0,07
5,3'-dimetoksiflavonas	0,75	0,02
6,3'-dimetoksiflavonas	0,60	0,07
6,7-dimetoksiflavonas	0,79	0,10
3-hidroksi-3'-metoxyflavone	0,71	0,02
3-hidroksi-4'-metoksiflavonas	0,75	0,03
4'-hidroksi-6-metoksiflavonas	0,55	0,08
2',5'-dimetoksiflavonas	0,58	0,02
4'-hidroksi-3'-metoksiflavonas	0,62	0,06
3',4'-dimetoksiflavonas	0,69	0,03
5,7-dimetoksiflavonas	0,85	0,01
3',4'-dihidroksiflavonas	0,65	0,07
6,7-dihidroksiflavonas	0,68	0,03
7,4'-dihidroksiflavonas	0,73	0,13
5,4'-dihidroksiflavonas	0,86	0,06
7,2'-dihidroksiflavonas	1,02	0,09

2',3'-dihidroksiflavonas	0,85	0,10
5,3'-dihidroksiflavonas	0,73	0,07
6,3'-dihidroksiflavonas	0,76	0,05
7,3'-dihidroksiflavonas	0,89	0,16
5,2'-dihidroksiflavonas	0,91	0,03
3,6-dihidroksiflavonas	0,79	0,03
4'-metoksiflavonas	0,61	0,04
3',5'-dihidroksiflavonas	0,67	0,03
3,4'-dihidroksiflavonas	0,87	0,07
3,3'-dihidroksiflavonas	0,73	0,13
3,2'-dihidroksiflavonas	0,77	0,16
3,7-dihidroksiflavonas	1,16	0,05
6,4'-dihidroksiflavonas	1,06	0,07
2',3'-dimetoksiflavonas	0,97	0,10
3'-metoksiflavonas	0,86	0,05
5,6-dihidroksiflavonas	0,77	0,04
3,5-dihidroksiflavonas	0,81	0,05
6,2'-dihidroksiflavonas	0,74	0,05
Karanjinas	0,81	0,06
2',4'-dihidroksiflavonas	0,76	0,08
2',4'-dimetoksiflavonas	0,51	0,01
6,2',3'-trihidroksiflavonas	0,75	0,03
3,6,2'-trihidroksiflavonas	0,68	0,07
5-hidroksi-3'-metoksiflavonas	0,98	0,02
7-hidroksi-2-metoksiflavonas	1,01	0,15
5-hidroksi-7-metoksiflavonas	0,98	0,01
3,6,4'-trihidroksiflavonas	0,99	0,10
6-hidroksi-3'-metoksiflavonas	0,99	0,13
6-hidroksi-7-metoksiflavonas	1,07	0,10
6-hidroksi-2'-metoksiflavonas	0,90	0,04
5,3',4'-trihidroksiflavonas	0,88	0,01

7,3',4'-trimetoksiflavonas	0,52	0,06
3,2',4',5'-tetrametoksiflavonas	0,98	0,06
6,7,3',4'-tetrametoksiflavonas	0,68	0,03
3,6,2',4'-tetrahidroksiflavonas	1,11	0,07
3,6,2'-trimetoksiflavonas	1,06	0,08
6,7,3',4'-tetrahidroksiflavonas	0,65	0,03
5,7,2'-trimetoksiflavonas	0,58	0,01
7,3',4',5'-tetrametoksiflavonas	0,93	0,04
3,6,2',3'-tetrahidroksiflavonas	1,20	0,04
3,7,8,2'-tetrametoksiflavonas	0,97	0,02
3,3',7,8-tetrametoksiflavonas	0,83	0,04
6,2',3'-trimetoksiflavonas	0,82	0,02
6,2',4'-trimetoksiflavonas	0,89	0,06
3,6,2',3'-tetrametoksiflavonas	0,91	0,02
5,7,3',4'-tetrametoksiflavonas	0,47	0,04
3,7,8,4'-tetrametoksiflavonas	0,73	0,03
3,6,3',4'-tetrahidroksiflavonas	0,91	0,05
3,6,3'-trimetoksiflavonas	1,14	0,05
3,6,3',4'-tetrametoksiflavonas	1,42	0,02
7,3',4',5'-tetrahidroksiflavonas	1,11	0,05
7,2',3'-trimetoksiflavonas	1,04	0,01
5,7,3'-trimetoksiflavonas	0,69	0,03
5,7,4'-trimetoksiflavonas	0,67	0,03
3,7,3'-trimetoksiflavonas	1,05	0,04
3,7,8,2'-tetrahidroksiflavonas	1,25	0,05
3,3',4'-trimetoksiflavonas	0,96	0,06
7,2',4'-trimetoksiflavonas	1,03	0,03
7,8,3',4'-tetrahidroksiflavonas	0,79	0,11
3-hidroksi-7,8,2',3'- tetrametoksiflavonas	1,12	0,02
Robinetinas	0,82	0,04

3-hidroksi-7,8,4'- trimetoksiflavonas	1,19	0,02
3-hidroksi-7,3',4',5'- tetrametoksiflavonas	0,83	0,03
Morinas	0,93	0,04
3-hidroksi-7,2',4'- trimetoksiflavonas	1,03	0,03
3-hidroksi-6,2',4'- trimetoksiflavonas	1,10	0,03
3-hidroksi-7,8,2'- trimetoksiflavonas	1,68	0,17
3-hidroksi-7,2',3'- trimetoksiflavonas	1,08	0,03
5,7,3',4',5'- pentametoksiflavonas	0,66	0,03
Myricetinas	1,32	0,17
7,8,3',4'-tetrametoksiflavonas	0,90	0,01
5,7,3',4',5'- pentahidroksiflavonas	0,75	0,03
5,6-dihidroksi-7- metoksiflavonas	1,00	0,03
3-hidroksi-7,8,3'- trimetoksiflavonas	0,82	0,03
5,4'-dihidroksi-7- metoksiflavonas	0,86	0,09
Gardeninas	0,84	0,00
3'-hidroksi-5,6,7,4'- tetrametoksiflavonas	1,45	0,01
3-hidroksi-2',4',5',6- tetrametoksiflavonas	0,85	0,01
3,2',4',5',6- pentametoksiflavonas	0,90	0,04

3,7,2',4',5'- pentametoksiflavonas	1,04	0,03
3-hidroksi-6,3',4'- trimetoksiflavonas	1,01	0,03
3,7,3',4',5'- pentametoksiflavonas	0,84	0,07
5,6,7,3',4'- pentametoksiflavonas	0,92	0,10
3-hidroksi-2',4',5'- trimetoksiflavonas	1,07	0,04
3-hidroksi-3',4',5'- trimetoksiflavonas	0,77	0,04
3-hidroksi-6,2',3'- trimetoksiflavonas	1,02	0,06
3',4'-dimethoxy-a- naphthoflavone	0,97	0,02
3,7-dihidroksi-3',4'- dimetoksiflavonas	0,93	0,05
6,2'-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	0,97	0,05
2,4'-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	1,07	0,04
Akacetinas	0,83	0,00
3',4'-dimetoksiflavonolis	0,62	0,02
Tangeretinas	0,76	0,02
6,4'-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	0,95	0,02
3',4'-dimethoxy-b- naptoflavonas	0,87	0,08
6,2'-dimetilflavonas	0,93	0,04
Galanginas	0,91	0,05

7,4'-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	1,00	0,00
7,3'-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	0,93	0,02
2',5'-dimethoxy-6-fluorflavonas	0,41	0,01
5,7-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	1,03	0,01
3',6-dimetilflavonas	0,91	0,05
3',4'-dimethoxy-3-hidroksi-6'- metilflavonas	1,01	0,06
3,4'-dimethoxy-5,7,3'- trihidroksiflavonas	0,88	0,06
2',3'-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	0,93	0,05
3,5,7,4'-tetrahidroksi-3',5'- dimetoksiflavonas	0,99	0,14
Ramnetinas	1,06	0,10
5,3'-dihidroksi-6,7,4'- trimetoksiflavonas	1,02	0,05
6,3'-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	1,00	0,04
7,2'-dimethoxy-3- hidroksiflavonas	1,04	0,02
2',4'-dimethoxy-3-hidroksi-6- metilflavonas	1,02	0,04

2 PRIEDAS

2 priede pateikiamos magistrinio darbo metu išleistos mokslinės publikacijos.

RESEARCH ARTICLE

Flavone Derivatives as Inhibitors of Insulin Amyloid-Like Fibril Formation

Ricardas Malisauskas^{1,2}, Akvile Botyriute¹, Jonathan G. Cannon³, Vytautas Smirnovas^{1*}

1 Department of Biothermodynamics and Drug Design, Vilnius University Institute of Biotechnology, Vilnius, Lithuania, **2** Department of Chemistry and Bioengineering, Vilnius Gediminas Technical University, Vilnius, Lithuania, **3** Department of Natural Sciences and Engineering, Middle Georgia State College, Cochran, Georgia, USA

* vytautas.smirnovas@bti.vu.lt



OPEN ACCESS

Citation: Malisauskas R, Botyriute A, Cannon JG, Smirnovas V (2015) Flavone Derivatives as Inhibitors of Insulin Amyloid-Like Fibril Formation. PLoS ONE 10(3): e0121231. doi:10.1371/journal.pone.0121231

Academic Editor: Ilia V Baskakov, University of Maryland School of Medicine, UNITED STATES

Received: September 3, 2014

Accepted: January 12, 2015

Published: March 23, 2015

Copyright: © 2015 Malisauskas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was funded by the European Social Fund under the Global Grant Measure, project number VP1-3.1-ŠMM-07-K-02-020. RM was supported by a PhD fellowship from the European Social Fund, project number VP1-3.1-ŠMM-01-V-03-001. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Several natural and synthetic flavone derivatives have been reported to inhibit formation of amyloid fibrils or to remodel existing fibrils. These studies suggest that the numbers and positions of hydroxyl groups on the flavone rings determine their effectiveness as amyloid inhibitors. In many studies the primary method for determining the effectiveness of inhibition is measuring Thioflavin T (ThT) fluorescence. This method demonstrably results in a number of false positives for inhibition. We studied the effects of 265 commercially available flavone derivatives on insulin fibril formation. We enhanced the effectiveness of ThT fluorescence measurements by fitting kinetic curves to obtain half-time of aggregation (t_{50}). Maximal values of ThT fluorescence varied two fold or more in one third of all cases, but this did not correlate with changes in t_{50} . Changes in t_{50} values were more accurate measures of inhibition of amyloid formation. We showed that without a change in an assay, but just by observing complete kinetic curves it is possible to eliminate numbers of false positive and sometimes even false negative results. Examining the data from all 265 flavones we confirmed previous observations that identified the importance of hydroxyl groups for inhibition. Our evidence suggests the importance of hydroxyl groups at locations 5, 6, 7, and 4', and the absence of a hydroxyl group at location 3, for inhibiting amyloid formation. However, the main conclusion is that the positions are not additive. The structures and their effects must be thought of in the context of the whole molecule.

Introduction

Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, transmissible spongiform encephalopathies, familial amyloid neuropathy, and diabetes are among the diseases associated with formation of amyloid fibrils. Both mature amyloid fibrils, and oligomers or protofibrils which can exist on pathway of fibril formation, may be responsible for pathogenesis, depending on the disease. Small molecules able to change kinetics or alter the pathway of protein aggregation are of interest to treat or prevent these diseases. A number of compounds have been reported to inhibit amyloid fibril formation. Some of these, such as epi-gallocatechine-3-gallate

(EGCG) can even remodel mature fibrils into non-toxic aggregates [1]. In cases where oligomeric intermediates are responsible for the pathology, compounds which accelerate fibril formation may also prove useful in treatment [2].

Several flavone derivatives have been reported to inhibit fibril formation of different proteins and peptides. Ono et al. found that certain flavone derivatives and related compounds inhibited and/or destabilized amyloid beta ($A\beta$) fibrils [3]. Kim et al. tested a large number of small molecules for inhibition of thioflavin T (ThT) fluorescence in $A\beta$ fibril formation and for protection of neuroblastoma cells against the effects of $A\beta$ fibril induced oxidative stress [4]. While numerous flavones reduced ThT fluorescence, none protected neuroblastoma cells against oxidative stress. Akaishi et al. used ThT fluorescence to test the effectiveness of ten flavonoids in $A\beta$ fibril formation, and from this concluded the importance of hydroxyl substituents at particular locations for fibril inhibition [5]. Sharoar et al. used numerous methods to show that a flavone-rhamnoside was effective at preventing $A\beta$ fibrillation or remodelling $A\beta$ fibrils into non-toxic oligomers [6]. Ushikubo et al. used ThT fluorescence to test several synthesized flavonoids for inhibition and remodelling of $A\beta$ fibrils. They also used electron microscopy to confirm morphological changes for representative experiments [7]. Similar kinds of studies have examined the effects of flavonoids on other amyloid forming proteins. Green et al [8] and Trivella et al. [9] studying transthyretin (TTR) report effects of only a few flavone derivatives, but employed a wide variety of methods to present a quite detailed description of their effects. Unlike with $A\beta$, a significant contribution to fibril inhibition is from interactions of the flavonoids with native TTR tetramers. Fibrillation inhibition by hydroxyflavones has also been studied for islet amyloid polypeptide (IAPP) [10]. Noor et al. employed ThT fluorescence, kinetic measurements, electron microscopy, and light scattering to learn as much as possible about the effects of four flavonoids. Borana et al. added molecular dynamics simulations and binding energy calculations to multiple biochemical studies of the effects of two flavone derivatives on lysozyme fibril formation [11], but could only simulate interactions with the native monomers. One flavonoid has been studied in some depth as it affects bovine insulin amyloid formation [12]. In addition to morphological characterization of amyloid and other aggregates, protection of erythrocytes from hemolysis was measured and found to be dose dependent.

A few generalizations and a number of questions arise from surveying these various studies. Hydroxyflavones can inhibit fibril formation with many amyloid forming proteins. Different flavonoids may affect different amyloid reactions. Investigating any one inhibitor thoroughly is both labor and resource intensive, and the easiest method for screening large numbers of small molecules is observing ThT fluorescence—a technique employed by nearly every study. It may be possible to design better inhibitors by optimizing side groups of flavones, as suggested for $A\beta$ [7], but we need to emphasize again the difficulty and time required to study a single inhibitor thoroughly, performing both biophysical studies of fibril formation and morphology and biochemical, inhibition of toxicity studies. An improved screening method for small molecule inhibitors of fibril formation could be valuable to direct future studies toward greater focus and productivity.

We selected insulin as an initial model for amyloid-like fibril formation to demonstrate our improved screening methodology. Insulin is relatively inexpensive and forms amyloid under a variety of conditions [13–15]. Formation of insulin amyloid-like deposits has also been reported in several cases of injection-localized amyloidosis [16–18] among diabetics. We found 265 commercially available flavone derivatives to test as inhibitors of insulin amyloid formation.

We used the nearly universal thioflavin T fluorescence assay, but collected and analysed kinetic data as an additional check for amyloid formation. A number of studies have evaluated the ability of compounds to inhibit or accelerate fibril formation based primarily on the

decrease or increase of ThT fluorescence intensity in the presence of presumed fibrils [3–7, 12]. Several reports have shown reasons to use additional techniques to confirm the results of ThT assays because pH, time, temperature, and other small molecules can all interfere with the ThT fluorescence, thus biasing results [19–21]. In particular, Noormagi et al showed that upon addition of some compounds (Basic Blue 41, Basic Blue 12, Azure C, or Tannic acid) to preformed insulin fibrils, ThT fluorescence intensity strongly decreases, however neither lag time, nor the rate constant is affected by these compounds; it was concluded that most probably these compounds compete with ThT for the same binding sites in fibrils [20]. Hudson et al showed that Quercetin (one of the flavones we also used in our study) and Curcumin decreases ThT fluorescence in a concentration-dependent manner when added to A β fibrils. They also showed that in case of reduced and carboxymethylated kappa-casein fibrils, Quercetin acts the same as with A β , however concentrations of Curcumin up to 10 μ M can increase ThT fluorescence, but higher concentrations quench it. The study concludes that spectroscopic effects are the prominent contributor to the interference with ThT fluorescence by these two polyphenols [19]. We show here that simply observing complete kinetic curves of protein aggregation in presence of flavones, and using aggregation halftimes as the main parameter for the determination of the influence of the compound eliminates at least 80% of false positives for amyloid inhibition resulting from uncorrelated decreases in ThT fluorescence. In this way, nearly 300 small molecules were tested for inhibitory effects and we were able to reduce the number of candidates for future study to just a handful.

Materials and Methods

Recombinant human insulin was purchased from Sigma Aldrich, and flavones were purchased from Indofine Chemical Company. Flavones were dissolved at a concentration of 20 mM in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored in the dark at room temperature for up to two weeks. Fresh 1.05 mM insulin solution in 100 mM phosphate buffer, pH2, containing 50 μ M ThT was mixed with flavone derivative stock solution (or with pure DMSO as a control) in ratio 19:1 leading to final concentrations of 1 mM insulin, 1 mM flavone derivative and 5% DMSO. Each batch was divided into three 20 μ l aliquots (in 200 μ l thin-wall PCR tubes). Aggregation kinetics was followed at constant 60°C temperature using Qiagen Rotor-Gene Q real-time analyser. Increase of ThT fluorescence intensity upon fibril formation was observed using the green channel (excitation 470 nm; emission 510 nm). To obtain t_{50} values we used the method, described by Nielsen et al [13]. According to nucleated growth mechanism, it takes time to form aggregation nuclei, which is reflected as initial lag phase with no change in ThT fluorescence intensity. Once formed, nuclei can recruit protein molecules and grow into fibrils, which is reflected as the growth phase in our kinetic curves. Finally, due to depletion of free protein molecules, the process enters into the final equilibrium phase, reflected in a plateau of ThT fluorescence. This type of kinetics can be fitted by a sigmoidal curve, described by the following equation [13]:

$$I = I_{min} + m_{min}t + \frac{I_{max} + m_{max}t}{1 + e^{-[(t-t_{50})k_{app}]}} \quad (1)$$

where I is the fluorescence intensity, t is time, and t_{50} is the time to 50% of maximal fluorescence, I_{min} and I_{max} are values of minimal and maximal fluorescence intensities, respectively, $m_{min}t$ and $m_{max}t$ describe drift of the baseline at the beginning and at the end of the reaction respectively. k_{app} is the apparent rate constant. Observed t_{50} and I_{max} values in presence of flavone derivatives were divided by the observed values for the control samples to obtain relative t_{50} and I_{max} . Fitting was performed using MathCad software. Average values and errors were

calculated using three different batch preparations of flavones and three samples within each batch (a total of 9 repeats per flavone derivative). See an example of raw data and fitting in [S1 Fig](#) and [S2 Fig](#).

To check possible impact of ThT on fibrillation kinetics insulin samples with or without flavones in presence or absence of 50 μM ThT were prepared as described above. Samples were divided into 200 μl aliquots, in 96-well plates. Plates were sealed using clear polyolefin sealing tape. Aggregation kinetics was followed at constant 60°C temperature using Biotek Synergy H4 plate reader. ThT fluorescence intensity upon fibril formation was observed using 440 nm excitation and 480 nm emission with simultaneous measurement of absorbance at 600 nm. The data confirmed no interference by ThT of the inhibition by flavones ([S3 Fig](#)).

Seeding experiments were performed as described earlier [22]. Briefly, seeds were prepared by incubation of 1mM insulin solution (100mM phosphate, pH2) at 60°C for 24 hours with 300 rpm agitation and subsequent ultrasonic treatment. One part of the fibrils were mixed with 9 parts of the fresh 1 mM insulin solution containing 50 mM Thioflavin T, 1 mM of tested flavone, and 5% residual DMSO. Elongation kinetics was measured at constant 37°C temperature using Qiagen Rotor-Gene Q real-time analyzer. Rates of elongation in the absence and presence of flavones were determined by linear fits to the curves in a range between 40–60% of the ordinate maxima, as described earlier [23]. Observed rate (v) values in presence of flavone derivatives were divided by the observed values for the control samples to obtain relative v .

Results and Discussion

[Fig. 1](#) summarizes how all 265 flavone derivatives influence insulin fibril formation. Changes in t_{50} relative to control samples are shown in blue with the best inhibitors on the left moving across to flavonoids which enhance amyloid formation at the right. Most flavone derivatives have no impact on time of aggregation, with 243 (92%) of the flavonoids giving relative values of t_{50} between 1.50 and 0.67, and only 8 changing t_{50} by more than a factor of two. By contrast, maximal ThT fluorescence varies over a wide range and correlates very weakly with fibrillation kinetics. 33 of the flavonoids decreased maximum ThT fluorescence by more than a factor of two, and 36 increased fluorescence two fold or more, despite the majority of these having minimal impact on fibrillation. The best inhibitors showed both increases in aggregation halftimes and decreases in ThT intensity. However, relying solely on the ThT fluorescence would have resulted in 10% false positives for amyloid inhibition, which is significant considering only 2% of flavonoids significantly inhibited fibrillation. Similar problems are evident for identifying fibrillation accelerators.

It is known that the rate of amyloid fibril formation depends on protein concentration and the concentration of nucleation sites on existing fibrils [24, 25]. If ThT fluorescence intensity is interpreted as the concentration of amyloid-like fibrils, lower fluorescence means a portion of the protein is kept away from the fibrillation pathway, so the concentration of nucleating fibrils and the concentration of monomers available for fibrillation are both lower. Thus, aggregation time should increase. No change in t_{50} means that changes in ThT fluorescence are caused by factors other than concentration of amyloid, such as interference from the flavonoids [19, 20].

Beyond testing ThT fluorescence we looked for patterns in the effects of substituent groups on the flavone rings in inhibiting fibrillation. Aggregation time dependence on the number of substituents is shown in [Fig. 2](#). Flavone without any side groups shows no impact on the rate of fibril formation. As noted above, the majority of flavones, no matter how many substituent groups, have little effect on fibrillation rates. We now note the outliers. No flavones with one or two side groups inhibit fibrillation. Most of the best fibrillation accelerators have two side groups, while one has three substituents. The first strong inhibitor, 7,8,2'-trihydroxyflavone,

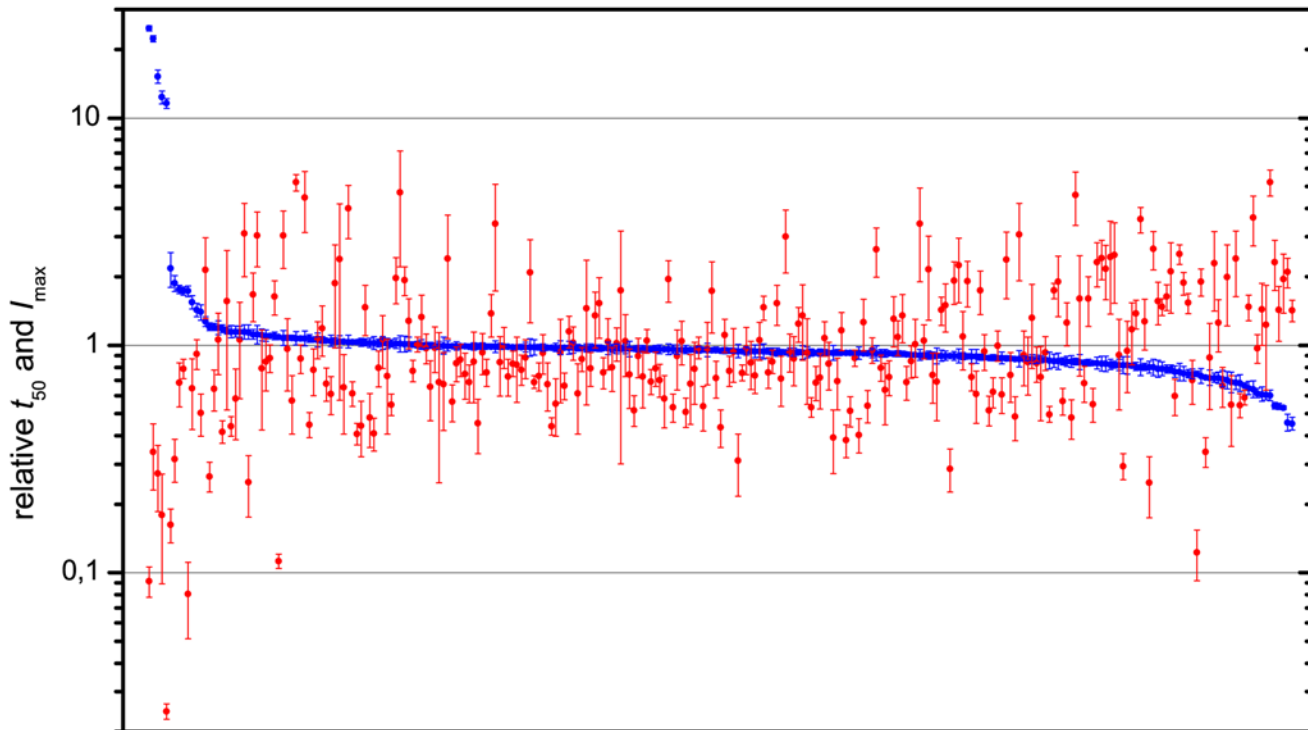


Fig 1. Evaluation of flavones as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation. Blue dots represent relative t_{50} values for fibril formation in the presence of each flavonoid. Red dots represent relative I_{max} of the corresponding samples (see complete list of names and values in [S1 Table](#)). Error bars represent standard errors, calculated using normal distribution with $P = 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0121231.g001

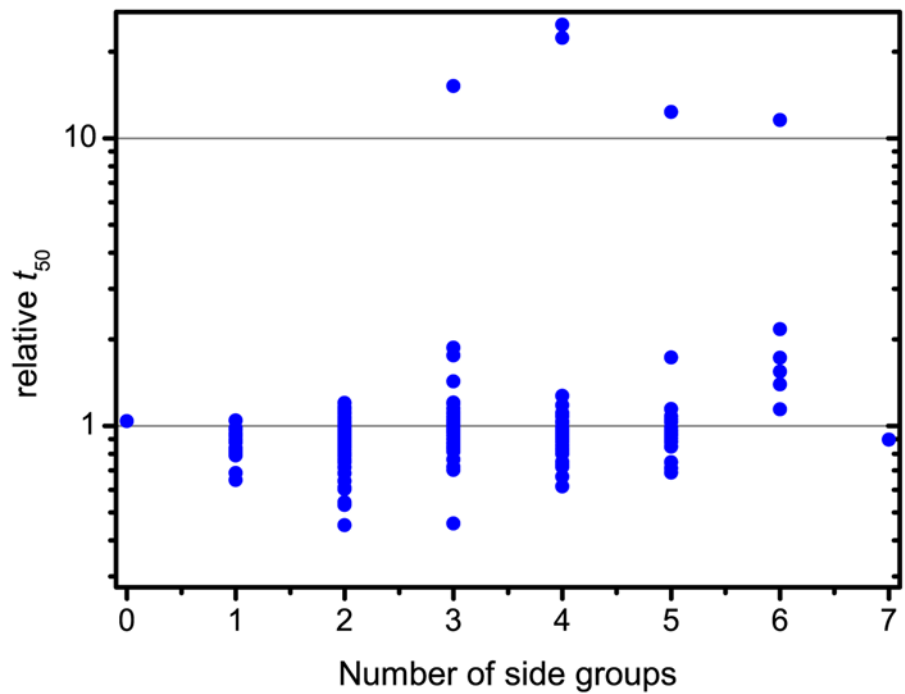


Fig 2. Distribution of inhibition potential by the number of side groups.

doi:10.1371/journal.pone.0121231.g002

also has three side groups. The tetra-substituted flavones include the two strongest inhibitors, Scutellarein and Luteolin. Penta-substituted flavones include one medium and one strong inhibitor (3,6,2',4',5'-Pentahydroxyflavone). All hexahydroxyflavones tested show some inhibition, and one of these is a strong inhibitor (Gossypetin). However, we had only six such flavones available, so it is impossible to make strong generalizations. Overall we can state that flavones with two or fewer hydroxyl groups have no inhibition potential. The best inhibitors yet measured are tetra-substituted flavones, though there are also good inhibitors among tri-, penta-, and hexa-substituted flavones. Such distribution means that three residues around the flavone backbone are enough to have a potent inhibitor, however, the inhibition potential can be both increased and decreased by additional residues.

Among the commercially available flavones the majority contain hydroxyl and methoxy groups. There are also some flavones containing chloride, bromide, or methyl groups, some flavone glucosides, and naphthoflavones. Surprisingly, no flavone containing substituents other than hydroxyl and methoxy side groups inhibited insulin amyloid-like fibril formation. For some chemical groups our data may be inconclusive due to the low numbers of representative compounds, however in the cases of bromo- (20 compounds), chloro- (41 compounds), and methyl- (35 compounds) flavones it may be significant.

Fig. 3A shows distribution of relative halftimes of aggregation among all tested flavones. Two thirds of the compounds have no impact or slightly accelerate the fibril formation. Almost 20% of tested flavones moderately accelerate fibrillation, and only about 5% are medium or strong inhibitors. Flavones containing at least one hydroxyl group have a similar distribution profile to all flavones (Fig. 3B), but include all of the medium and strong inhibitors (~8%) and a reduced fraction of accelerators (~11%). In case of methoxy groups, the profile is shifted towards acceleration of aggregation (Fig. 3C). More than 25% of the medium accelerators and only a few moderate inhibitors contain methoxy groups. This leads to the conclusion that, among the tested side groups, only hydroxyl groups can increase the ability of flavones to inhibit amyloid-like fibril formation.

To understand how the position of hydroxyl groups affects inhibition potential, we plotted relative t_{50} as a function of hydroxyl group position around the flavone backbone (Fig. 4). For discussion we will consider five ranges of relative t_{50} values: < 0.65 (moderate accelerator), 0.65–0.85 (weak accelerator), 0.85–1.15 (no effect), 1.15–3.0 (weak inhibitor), and > 10.0 (strong inhibitor). More divisions are retained in Fig. 5 to give a more complete account of the distribution of effects from flavones on amyloid formation. Fig. 5 shows the observed effects of hydroxyl groups at all of the nine positions available for substitution without having a penta-substituted phenyl group. Out of the 265 flavones studied, there are 10 moderate accelerators,

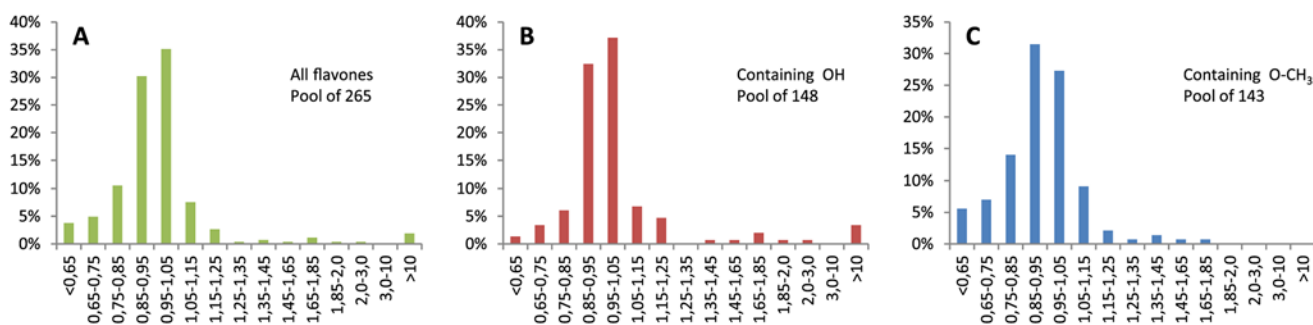


Fig 3. Distribution of relative t_{50} among flavones. All tested flavones (A), flavones with at least one hydroxyl group (B), and with at least one methoxy group (C). The height of the bars shows the percentage of total flavones in each range of relative t_{50} values.

doi:10.1371/journal.pone.0121231.g003

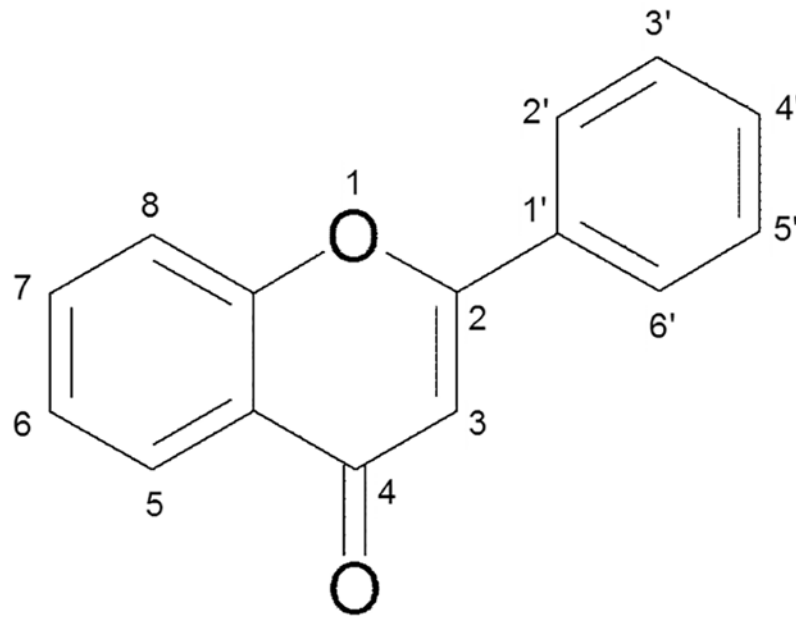


Fig 4. Flavone backbone with numbered positions for residues.

doi:10.1371/journal.pone.0121231.g004

41 weak accelerators, 16 weak inhibitors, and 5 strong inhibitors. One thing made clear by our groupings is that no flavones resulted in relative t_{50} between 3 and 10. This leads to our first observation—hydroxyl groups do not simply have an additive effect, but must interact cooperatively with insulin or insulin aggregates. Despite this clear cooperativity, we looked to see if any single positions could be identified as essential or important to inhibition or acceleration.

The most common position for a hydroxyl group among commercially available flavone derivatives is 3 (Fig. 5A). Predictably, the majority of this group of flavone derivatives have no effect on t_{50} , but 2 of the 5 strong inhibitors, and 1 of 10 moderate accelerators are included in this group. A hydroxyl at position 5 (Fig. 5B) is present in 3 of 5 strong and 6 of 16 weak inhibitors, and only in 2 of 41 weak accelerators. Position 6 (Fig. 5C) is similar to 5 in that 2 of 5 strong and 5 of 16 weak inhibitors have hydroxyl groups at this position, while only 3 of 41 weak accelerators have hydroxyls at 6. Hydroxyl at position 7 (Fig. 5D) is present in 4 of 5 strong inhibitors, as is hydroxyl at position 4' (Fig. 5H), but hydroxyls are also present at these positions in the only moderate accelerator containing four hydroxyl groups. Few flavones had hydroxyl groups at 8, 2', and 5' (Fig. 5E, F, and J), but hydroxyl groups were found in each of these positions in 1 or 2 of the strong inhibitors. Also, hydroxyl groups were not at these positions in any of the accelerators, but with such small sample sizes that is not very informative. A hydroxyl at 3' is also ambiguous, being present in 2 strong inhibitors and 1 moderate accelerator. Other than the general trend that more hydroxyl groups are more likely to result in inhibition of amyloid formation, little can be said about hydroxyl groups in specific positions removed from the context of the rest of the molecule.

Despite the recognized ambiguities, we have tested enough flavone derivatives with hydroxyl groups at certain positions to suggest positions which may be more or less likely to increase t_{50} . We determined the numbers of possible mono- to hexa-substituted hydroxyflavonoids, including a group at each given position (e.g. 236 possible different 3-, mono- to hexa- hydroxyflavone derivatives). We then used the number of hydroxyflavonoids tested to calculate a percentage of the total, as shown in Table 1. With 11% of all possible 3-hydroxyflavone

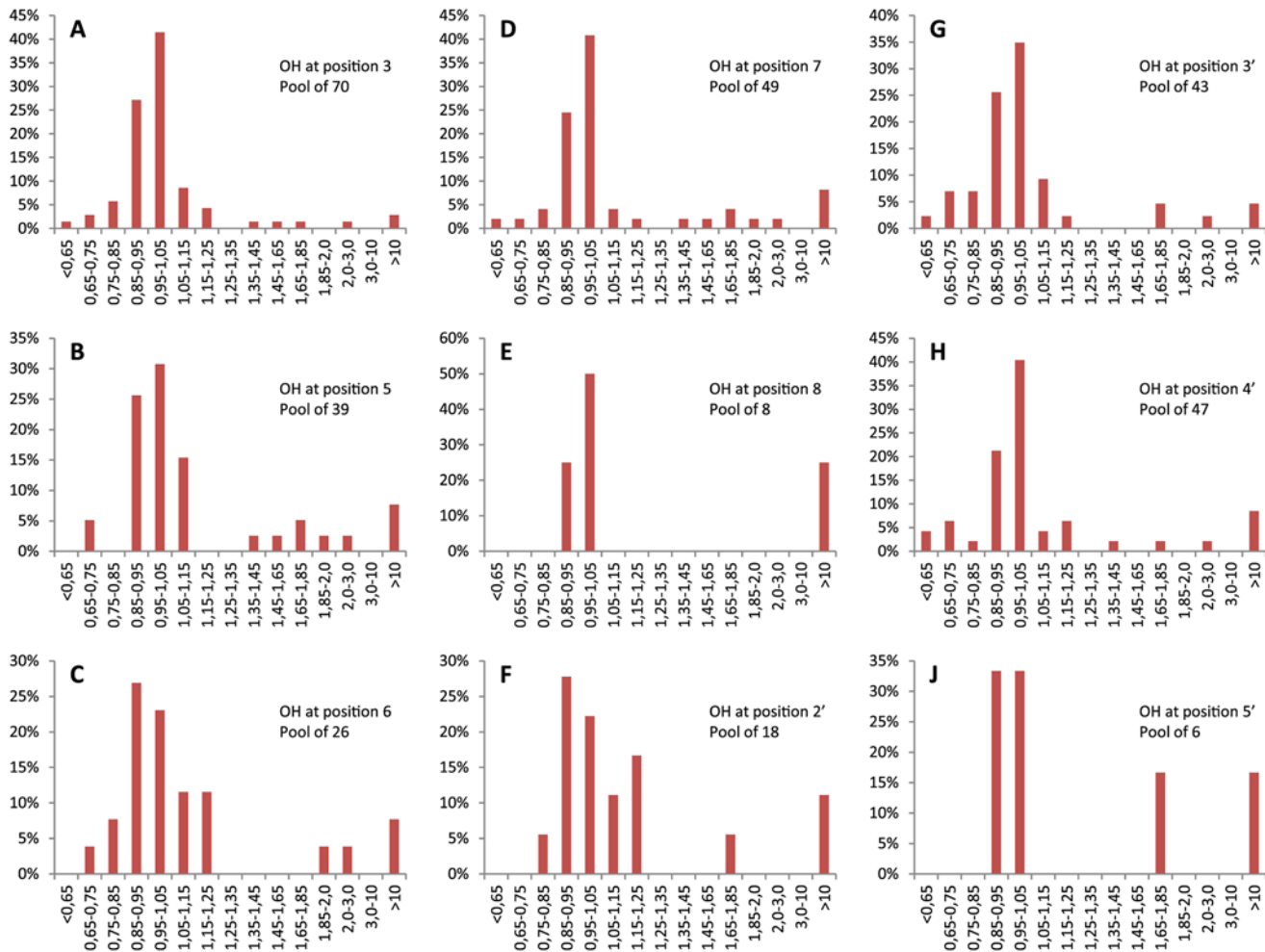


Fig 5. Influence of hydroxyl residue position on the relative halftimes of aggregation.

doi:10.1371/journal.pone.0121231.g005

Table 1. Number of hydroxyflavones with a hydroxyl group at a given position.

Position	total flavones*	tested flavones	% tested
3	236	27	11
5	236	21	9
6	236	21	9
7	236	34	14
8	236	7	3
2'	340	16	5
3'	283	30	11
4'	236	32	14
5'	178	6	3

*Only flavones with 1–6 hydroxyl groups were included.

doi:10.1371/journal.pone.0121231.t001

Table 2. Comparison of inhibition potentials of Luteolin and similar flavones.

Compound	Substituents									t_{50}
	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	
Luteolin	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	22.3 ± 0.7
Quercetin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	1.03 ± 0.02
5,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavone	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	0.97 ± 0.05
7,3',4'-Trihydroxyflavone	H	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	0.98 ± 0.08
Apigenin	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	0.96 ± 0.04
5,3',4'-Trihydroxyflavone	H	OH	H	H	H	H	OH	OH	H	0.93 ± 0.02
Diosmetin	H	OH	H	OH	H	H	OH	O-CH₃	H	0.90 ± 0.07
7,3',4',5'-Tetrahydroxyflavone	H	H	H	OH	H	H	OH	OH	OH	0.96 ± 0.05
7,8,3',4'-Tetrahydroxyflavone	H	H	H	OH	OH	H	OH	OH	H	0.93 ± 0.07
6,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone	H	H	OH	OH	H	H	OH	OH	H	0.80 ± 0.05
Fisetin	OH	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	0.62 ± 0.03
Kaempferol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	0.98 ± 0.05
Scutellarein	H	OH	OH	OH	H	H	H	OH	H	24.8 ± 0.7

doi:10.1371/journal.pone.0121231.t002

derivatives tested, 3 appears to be a weak position for favouring either inhibition or acceleration. 9–14% of all possible 5-, 6-, 7-, 3'-, or 4'- hydroxyflavone derivatives were tested, revealing 5, 6 and 7 as more likely positions for favouring inhibition, 3' as less likely to favour inhibition, and 4' as potentially the most likely to contribute to either inhibition or acceleration and not simply have a neutral effect. Insufficient numbers of other hydroxyflavone derivatives were tested to even consider general statistical assertions.

To examine the effects of hydroxyl groups in context, we compared the five strongest inhibitors with the other most structurally similar compounds. One of the best inhibitors is 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone (also known as Luteolin). There were 12 similar flavones in our pool. One of these is among five strongest inhibitors, however none of the rest showed any inhibition potential (Table 2). It looks like either removal of a hydroxyl group at 5,7 or 3', or addition of a hydroxyl group at 3 or 5' leads to the complete loss of inhibition. Exchange of a hydroxyl from position 5 to positions 3, 6, 8, or 5' also results in the loss of inhibition. Moreover, two of these rearranged tetrahydroxyflavones accelerate insulin fibril formation. The only exchange without a loss of inhibition is from position 3' to 6.

According to our data, the best inhibitor is 5,6,7,4'-tetrahydroxyflavone (also known as Scutellarein), providing a 25 fold increase in t_{50} . Exchange of the hydroxyl from position 6 to position 3' does not affect inhibition, however moving the hydroxyl group from 5 to 3' leads to weak acceleration of fibrillation (Table 3). Exchange from 6 to 3 leads to loss of inhibitory

Table 3. Comparison of inhibition potentials of Scutellarein and similar flavones.

Compound	Substituents									t_{50}
	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	
Scutellarein	H	OH	OH	OH	H	H	H	OH	H	24.8 ± 0.7
Baicalein	H	OH	OH	OH	H	H	H	H	H	1.87 ± 0.15
Apigenin	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	0.96 ± 0.04
6,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone	H	H	OH	OH	H	H	OH	OH	H	0.80 ± 0.05
Kaempferol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	0.98 ± 0.05
Luteolin	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	22.3 ± 0.7

doi:10.1371/journal.pone.0121231.t003

Table 4. Comparison of inhibition potentials of 7,8,2'-Trihydroxyflavone and similar flavones.

Compound	Substituents									t_{50}
	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	
7,8,2'-Trihydroxyflavone	H	H	H	OH	OH	OH	H	H	H	15.2 ± 1.0
3,7,8,2'-Tetrahydroxyflavone	OH	H	H	OH	OH	OH	H	H	H	0.99 ± 0.02
5,7,2'-Trihydroxyflavone	H	OH	H	OH	H	OH	H	H	H	1.76 ± 0.07
7,8,3'-Trihydroxyflavone	H	H	H	OH	OH	H	OH	H	H	0.97 ± 0.03
7,8,4'-Trihydroxyflavone	H	H	H	OH	OH	H	H	OH	H	0.97 ± 0.04

doi:10.1371/journal.pone.0121231.t004

activity. Loss of a hydroxyl group at position 6 eliminates inhibition; however, loss of the hydroxyl at position 4' only reduces the relative t_{50} to ~2.

The only strong inhibitor with three side groups is 7,8,2'-trihydroxyflavone. Addition of a hydroxyl at position 3 or exchange of hydroxyl at position 2' to 3' or 4' leads to no inhibition (Table 4). Exchange of position 8 to 5 leads to 10 fold weaker inhibition.

Although all hexahydroxyflavones tend to inhibit insulin fibrillation, the only rather strong inhibitor is 3,5,7,8,3',4'-hexahydroxyflavone (also known as Gossypetin). Loss of the hydroxyl group at position 8 or modification of it with a glucoside leads to loss of inhibition, whereas exchange of the position to 6 or 5' only lowers inhibition (Table 5).

For the last identified strong inhibitor, 3,6,2',4',5'-pentahydroxyflavone ($t_{50} = 12.2 \pm 0.8$), there was only one very similar compound within our pool, 3,6,2',4'-tetrahydroxyflavone ($t_{50} = 1.18 \pm 0.05$). We can only note that the 5' position is important in the specific interactions of this molecule.

Nucleated growth mechanism of fibril formation assumes two main processes—nucleation and elongation. Relative t_{50} values obtained in our experiments are mostly influenced by changes in times of nucleation. To test if the rate of insulin fibril elongation can be slowed down, we did additional seeding experiments in presence of the five best-inhibiting flavones. Fig. 6 shows normalized curves of seeded insulin aggregation in the absence and presence of 1 mM Scutellarein. It clearly shows that Scutellarein inhibits fibril elongation; however it is not slowed down as many times as nucleation. In fact, calculated relative rates of elongation in the presence of Scutellarein, Luteolin, and 7,8,2'-trihydroxyflavone were the same ($v = 0.44 \pm 0.07$), in the presence of Gossypetin aggregation was a bit slower ($v = 0.40 \pm 0.07$), and 3,6,2',4',5'-pentahydroxyflavone was found to be the weakest inhibitor of elongation ($v = 0.72 \pm 0.13$). In all cases nucleation was inhibited more strongly than elongation, suggesting that these flavones affect monomers or intermediates rather than mature fibrils.

Additional experiments were done to check aggregation inhibition at different Scutellarein concentrations. As at equimolar concentration Scutellarein slows down spontaneous insulin

Table 5. Comparison of inhibition potentials of Gossypetin and similar flavones.

Compound	Substituents									t_{50}
	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	
Gossypetin	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	H	11.6 ± 0.6
Quercetin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	1.03 ± 0.02
Quercetagenin	OH	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	H	2.17 ± 0.38
Myricetin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	1.73 ± 0.10
Gossypin	OH	OH	H	OH	O-C₆H₁₁O₅	H	OH	OH	H	1.15 ± 0.08

doi:10.1371/journal.pone.0121231.t005

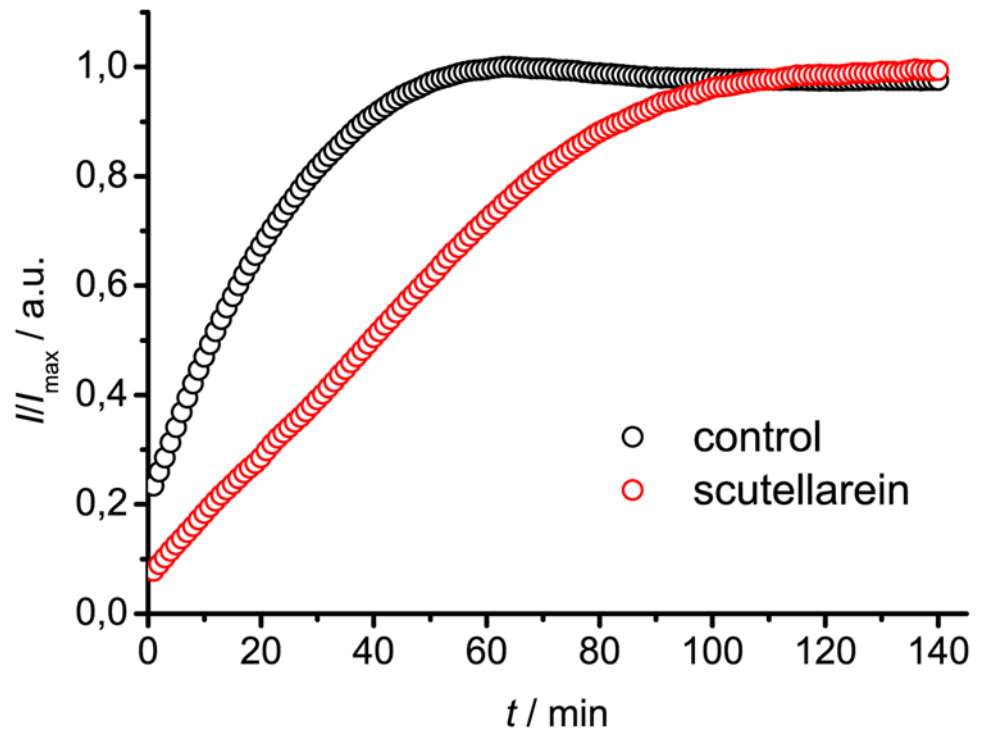


Fig 6. Impact of Scutellarein on insulin fibril elongation.

doi:10.1371/journal.pone.0121231.g006

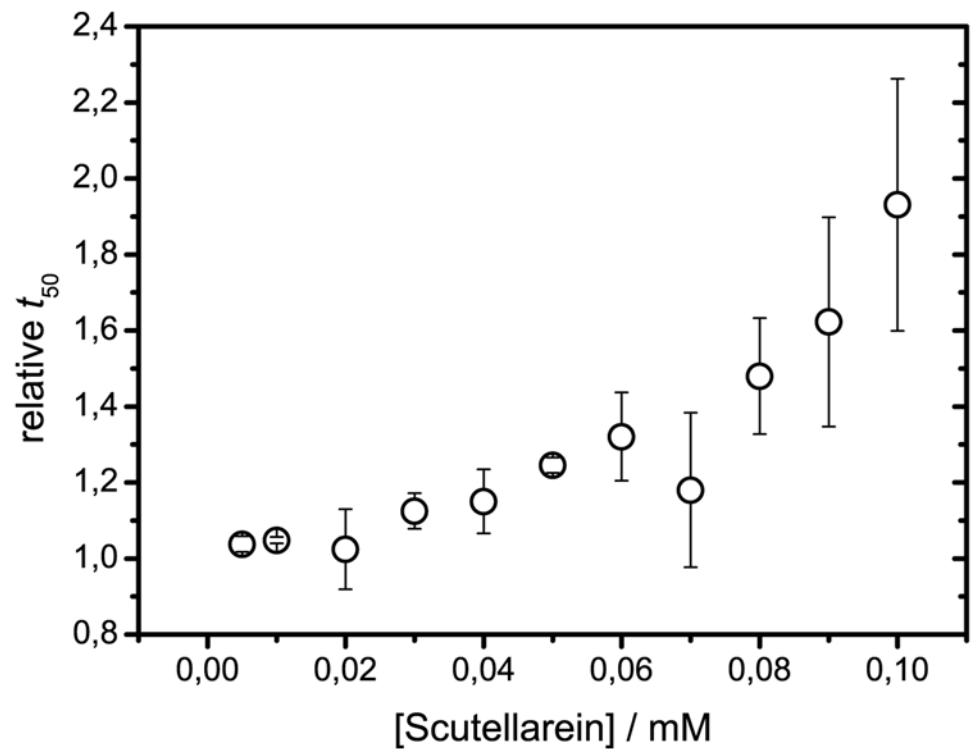


Fig 7. Dependence of relative aggregation times of insulin on Scutellarein concentration.

doi:10.1371/journal.pone.0121231.g007

aggregation almost 25 times, we decided to test if any inhibition can be detected in range of 0.01–0.1 mM (Insulin:Scutellarein ratios 100:1–10:1). Our data reveal that Scutellarein can make some impact even at very low concentrations and that the dependence of relative t_{50} t_{50} on concentration of the flavone is non-linear (Fig. 7). In this concentration range, relative I_{max} values are close to 1. It shows another advantage of analysing kinetics in screening for inhibitors of amyloid-like aggregation, as really strong inhibitors may be detected even at much smaller concentrations.

With these kinetic studies we have confirmed the need to corroborate ThT fluorescence measurements with results from other methods, demonstrated that multiple hydroxyl groups are essential for flavone derivatives to inhibit insulin amyloid formation, discovered that the effects of hydroxyl groups at specific positions are not additive, and suggested that hydroxyl groups at certain positions may be more likely to contribute to inhibition than at others. We did find that all of the strong inhibitors of fibrillation also reduced ThT fluorescence, but among the approximately 250 remaining flavonoids there were a high percentage of false positives for inhibition, and a significant number of compounds which increased ThT fluorescence without changing fibrillation kinetics. These findings are consistent with previously reported observations [19, 20].

Because we were able to test as many as 9–14% of the possible flavone derivatives with hydroxyl groups at specific positions, and through comparisons between the strongest inhibitors and flavonoids similar to them, we were able to conclude that, while not additive in their effects, hydroxyflavones with hydroxyl groups at positions 7 and 4' on the flavone rings are likely to be present in strongly inhibiting flavonoids. Were someone to synthesize hydroxyflavones specifically to try to optimize inhibition of insulin amyloid formation, hydroxyl groups at position 5 and 6 are also somewhat likely candidates for increasing inhibition, while hydroxyl groups at 3 and 3' should possibly be avoided.

There are a few direct comparisons that can be made between our results and the effects of flavonoids on inhibiting formation of fibrils by proteins other than insulin. Among compounds we studied, we found fewer than 20 studied by methods other than ThT fluorescence and reported as effective inhibitors of different kinds of amyloid fibrils [3, 6, 9–11, 26, 27]. Of these only one was also a strong inhibitor of insulin fibrillation; luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) inhibited formation of human transthyretin fibrils [9]. A study on prion protein (PrP) aggregates found that flavone derivatives effective at preventing amyloid fibre formation in PrP from mouse were ineffective at preventing aggregation in sheep PrP [26]. Combined, these observations indicate that effects of flavonoids may be highly protein specific, sensitive to even relatively small changes in protein sequence.

Further investigations are needed to reveal either more general principles or specific solutions regarding flavone inhibition of amyloid formation. It is likely that, although no single flavone derivative is effective in inhibiting amyloid formation generally, the flavone backbone appears to provide a common base upon which inhibitors can be built for many different amyloids. Thus, the similarities among amyloids find a potentially useful reflection in this family of hydroxyflavones.

Supporting Information

S1 Fig. Example of data fitting and extraction of relative parameters.
(PDF)

S2 Fig. Example of raw data set of a single batch experiment.
(PDF)

S3 Fig. Example of simultaneous absorbance and fluorescence experiments. The presented data is an average of 7 repeats.

(PDF)

S1 Table. Evaluation of flavones as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation.

(PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RM VS. Performed the experiments: RM AB. Analyzed the data: RM VS. Contributed reagents/materials/analysis tools: VS. Wrote the paper: JGC VS.

References

1. Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H, Neugebauer K, et al. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *P Natl Acad Sci USA*. 2010 Apr; 107(17):7710–5. doi: [10.1073/pnas.0910723107](https://doi.org/10.1073/pnas.0910723107)
2. Bieschke J. Natural compounds may open new routes to treatment of amyloid diseases. *Neurotherapeutics*. 2013 Jul; 10(3):429–39. doi: [10.1007/s13311-013-0192-7](https://doi.org/10.1007/s13311-013-0192-7) PMID: [23670234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23670234/)
3. Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2003 Oct; 87(1):172–81. doi: [10.1046/j.1471-4159.2003.01976.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01976.x) PMID: [12969264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12969264/)
4. Kim H, Park BS, Lee KG, Choi CY, Jang SS, Kim YH, et al. Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. *J Agricult Food Chem*. 2005 Nov; 53(22):8537–41. doi: [10.1021/jf051985c](https://doi.org/10.1021/jf051985c)
5. Akaishi T, Morimoto T, Shibao M, Watanabe S, Sakai-Kato K, Utsunomiya-Tate N, et al. Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid beta protein. *Neurosci Lett*. 2008 Oct; 444(3):280–5. doi: [10.1016/j.neulet.2008.08.052](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.08.052) PMID: [18761054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18761054/)
6. Sharoar MG, Thapa A, Shahnawaz M, Ramasamy VS, Woo ER, Shin SY, et al. Keampferol-3-O-rhamnoside abrogates amyloid beta toxicity by modulating monomers and remodeling oligomers and fibrils to non-toxic aggregates. *J Biomed Sci*. 2012 Jan; 19(1):104. doi: [10.1186/1423-0127-19-104](https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-104) PMID: [23259691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23259691/)
7. Ushikubo H, Watanabe S, Tanimoto Y, Abe K, Hiza A, Ogawa T, et al. 3,3',4',5,5'-Pentahydroxyflavone is a potent inhibitor of amyloid β fibril formation. *Neurosci Lett*. 2012 Mar; 513(1):51–6. doi: [10.1016/j.neulet.2012.02.006](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.006) PMID: [22343025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22343025/)
8. Green NS, Foss TR, Kelly JW. Genistein, a natural product from soy, is a potent inhibitor of transthyretin amyloidosis. *P Natl Acad Sci USA*. 2005 Oct; 102(41):14545–50. doi: [10.1073/pnas.0501609102](https://doi.org/10.1073/pnas.0501609102)
9. Trivella DBB, dos Reis CV, Lima LMTR, Foguel D, Polikarpov I. Flavonoid interactions with human transthyretin: combined structural and thermodynamic analysis. *J Struct Biol*. 2012 Oct; 180(1):143–53. doi: [10.1016/j.jsb.2012.07.008](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.07.008) PMID: [22842046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22842046/)
10. Noor H, Cao P, Raleigh DP. Morin hydrate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide and disaggregates amyloid fibers. *Protein Sci*. 2012 Jan; 000:1–10.
11. Borana MS, Mishra P, Pissurlenkar RRS, Hosur RV, Ahmad B. Curcumin and kaempferol prevent lysosome fibril formation by modulating aggregation kinetic parameters. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar; 1844(3):670–80. doi: [10.1016/j.bbapap.2014.01.009](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.01.009) PMID: [24468532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24468532/)
12. Wang JB, Wang YM, Zeng CM. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov; 415(4):675–679. doi: [10.1016/j.bbrc.2011.10.135](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.135) PMID: [22079288](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22079288/)
13. Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, et al. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*. 2001 May; 40(20):6036–46. doi: [10.1021/bi002555c](https://doi.org/10.1021/bi002555c) PMID: [11352739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11352739/)
14. Dzwolak W, Grudzielanek S, Smirnovas V, Ravindra R, Nicolini C, Jansen R, et al. Ethanol-perturbed amyloidogenic self-assembly of insulin: looking for origins of amyloid strains. *Biochemistry*. 2005 Jun; 44(25):8948–58. doi: [10.1021/bi050281t](https://doi.org/10.1021/bi050281t) PMID: [15966720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15966720/)

15. Smirnovas V, Winter R. Revealing different aggregation pathways of amyloidogenic proteins by ultrasound velocimetry. *Biophys J*. 2008 Apr; 94(8):3241–6. doi: [10.1529/biophysj.107.123133](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.123133) PMID: [18192359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18192359/)
16. Swift B. Examination of insulin injection sites: an unexpected finding of localized amyloidosis. *Diabetic Med*. 2002 Oct; 19(10):881–2. doi: [10.1046/j.1464-5491.2002.07581.x](https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2002.07581.x) PMID: [12358880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12358880/)
17. Yumlu S, Barany R, Eriksson M, Röcken C. Localized insulin-derived amyloidosis in patients with diabetes mellitus: a case report. *Hum Pathol*. 2009 Nov; 40(11):1655–60. doi: [10.1016/j.humpath.2009.02.019](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.02.019) PMID: [19683329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19683329/)
18. Shikama Y, Kitazawa Ji, Yagihashi N, Uehara O, Murata Y, Yajima N, et al. Localized Amyloidosis at the Site of Repeated Insulin Injection in a Diabetic Patient. *Intern Med*. 2010; 49(5):397–401. doi: [10.2169/internalmedicine.49.2633](https://doi.org/10.2169/internalmedicine.49.2633) PMID: [20190472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20190472/)
19. Hudson SA, Ecroyd H, Kee TW, Carver JA. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS J*. 2009 Oct; 276(20):5960–72. doi: [10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x) PMID: [19754881](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19754881/)
20. Noormägi A, Primar K, Tõugu V, Palumaa P. Interference of low-molecular substances with the thioflavin-T fluorescence assay of amyloid fibrils. *J Pept Sci*. 2012 Jan; 18(1):59–64. doi: [10.1002/psc.1416](https://doi.org/10.1002/psc.1416) PMID: [22083646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22083646/)
21. Foderà V, Groenning M, Vetri V, Librizzi F, Spagnolo S, Cornett C, et al. Thioflavin Thydroxylation at basic pH and its effect on amyloid fibril detection. *J Phys Chem B*. 2008 Nov; 112(47):15174–81. doi: [10.1021/jp805560c](https://doi.org/10.1021/jp805560c) PMID: [18956897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18956897/)
22. Milto K, Botyriute A, Smirnovas V. Amyloid-Like Fibril Elongation Follows Michaelis-Menten Kinetics. *PLoS One*. 2013 Jul; 8(7):e68684. Available from: doi: [10.1371/journal.pone.0068684](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068684) PMID: [23874721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23874721/)
23. Milto K, Michailova K, Smirnovas V. Elongation of mouse prion protein amyloid-like fibrils: effect of temperature and denaturant concentration. *PLoS One*. 2014 Jan; 9(4):e94469. Available from: doi: [10.1371/journal.pone.0094469](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094469) PMID: [24747600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24747600/)
24. Hellstrand E, Boland B, Walsh DM, Linse S. Amyloid β -Protein Aggregation Produces Highly Reproducible Kinetic Data and Occurs by a Two-Phase Process. *ACS Chem Neurosci*. 2010 Jan; 1(1):13–18. doi: [10.1021/cn900015v](https://doi.org/10.1021/cn900015v) PMID: [22778803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22778803/)
25. Cohen Sla, Linse S, Luheshi LM, Hellstrand E, White Da, Rajah L, et al. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *P Natl Acad Sci USA*. 2013 Jun; 110(24):9758–63. doi: [10.1073/pnas.1218402110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218402110)
26. Kocisko Da, Engel AL, Harbuck K, Arnold KM, Olsen Ea, Raymond LD, et al. Comparison of protease-resistant prion protein inhibitors in cell cultures infected with two strains of mouse and sheep scrapie. *Neurosci Lett*. 2005 Nov; 388(2):106–11. doi: [10.1016/j.neulet.2005.06.053](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.06.053) PMID: [16039063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16039063/)
27. Park SY. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch Pharm Res*. 2010 Oct; 33(10):1589–609. doi: [10.1007/s12272-010-1010-y](https://doi.org/10.1007/s12272-010-1010-y) PMID: [21052936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21052936/)

RESEARCH ARTICLE

pH-Driven Polymorphism of Insulin Amyloid-Like Fibrils

Tomas Sneideris¹, Domantas Darguzis¹, Akvile Botyriute¹, Martynas Grigaliunas¹, Roland Winter², Vytautas Smirnovas^{1*}

1 Department of Biothermodynamics and Drug Design, Vilnius University Institute of Biotechnology, Vilnius, Lithuania, **2** Physical Chemistry I–Biophysical Chemistry, Faculty of Chemistry and Chemical Biology, TU Dortmund University, Dortmund, Germany

* vytautas.smirnovas@bti.vu.lt



OPEN ACCESS

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

Editor: Byron Caughey, Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, UNITED STATES

Received: April 28, 2015

Accepted: August 5, 2015

Published: August 27, 2015

Copyright: © 2015 Sneideris et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was funded by the European Social Fund under the Global Grant Measure, project number VP1-3.1-ŠMM-07-K-02-020. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Prions are infective proteins, which can self-assemble into different strain conformations, leading to different disease phenotypes. An increasing number of studies suggest that prion-like self-propagation may be a common feature of amyloid-like structures. Thus it is important to unravel every possible factor leading to the formation of different amyloid strains. Here we report on the formation of two types of insulin amyloid-like fibrils with distinct infrared spectroscopic features grown under slightly different pH conditions. Similar to prion strains, both insulin fibril types are able to self-propagate their conformational template under conditions, favoring spontaneous formation of different type fibrils. The low-pH-induced insulin amyloid strain is structurally very similar to previously reported strains formed either in the presence of 20% ethanol, or by modification of the amino acid sequence of insulin. A deeper analysis of literature data in the context of our current findings suggests a shift of the monomer-dimer equilibrium of insulin as a possible factor controlling the formation of different strains.

Introduction

Amyloid-like structures are associated with a number of pathological conditions including neurodegenerative diseases, such as Alzheimer’s and Parkinson’s, and infectious prion diseases, also a number of nonneuropathic systemic amyloidoses, and even type II diabetes [1]. In some cases amyloid-like folds can play a positive role as well: they have a structural function in spider silk and biofilm formation in bacteria, and a regulatory function in fungi or hormone storage in humans [2]. Experiments *in vitro* revealed even more amyloid-forming proteins and peptides, including proteins with no link to *in vivo* amyloids, such as polyaminoacids (e.g., polylysine, polythreonine and polyglutamic acid) [3], and short oligopeptides [4–6]. Finally, even an amyloid-like self-assembly of phenylalanine was recently reported [7]. All these findings support the idea that amyloid-like folds may be a generic property of all polypeptides, while the propensity of fibril formation would depend on the sequence of the polypeptide and on the environmental conditions (i.e., temperature, pressure, solution milieu, interaction with lipid interfaces, pH) [1].

Prions stand out among other amyloid-forming proteins as the only proteinaceous infectious pathogens [8]. Identical amino acid sequences of prion protein can adopt distinct pathogenic conformations, referred to as prion strains [9,10]. Different strains lead to distinct incubation periods and patterns of neuropathology in prion diseases [10]. Similar conformational variations were detected in other amyloid-forming proteins both *in vitro* [11–22] and *in vivo* [23–25]. With growing evidence of the involvement of prion-like mechanisms in the progression of other amyloid-related diseases [23–33], it is indispensable to understand all the factors determining formation of different amyloid strains.

The new variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) is thought to be caused by a bovine spongiform encephalopathy (BSE) strain [34]. In this case, the determining factor for the formation of distinct prion strains is cross-species infection. Similar to prions, formation of distinct amyloid strains for two slightly different insulin forms was recently reported [19,35]. When protein sequences are identical, the environment plays the key role in straining of amyloid-like fibrils. The presence of co-solvents [11,14,15,20], different temperatures [36–38], different concentrations of denaturants [38,39] and salts [21], or different ways of agitation [12,40] may lead to distinct amyloid fibril strains. Here we report on the formation of distinct insulin amyloid strains at slightly different pH values.

As diagnostic tool, Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy has been used, which has proven to be an important method for the characterization of secondary structural changes of prion and amyloid strains [11,19,41], supplemented by atomic force microscopy (AFM) measurements of the topology of amyloid fibrils and thioflavin T (ThT) fluorescence for recording the fibrillation kinetics.

Results and Discussion

In our recent work on potential inhibitors of insulin amyloid-like fibrillation, we followed the aggregation of insulin at pH 2 in the presence of 5% residual dimethylsulfoxide (DMSO) [42]. To test if the presence of a small amount of DMSO affects the fibrillation process, we compared the FTIR spectra of insulin amyloid-like fibrils spontaneously formed in D₂O in the presence (Fig 1A) and absence (Fig 1B) of 5% DMSO. To reveal possible changes upon using D₂O instead of H₂O, as required for the better quality FTIR measurements, and for looking into subtle pH changes on the fibrillation propensity of insulin, fibrils were prepared in heavy water samples at two pH* values (where pH* is the pH-meter readout uncorrected for isotopic effects, see Methods section), pH* 1.6 to mimic similar concentrations of H⁺ and D⁺, and pH* 2 to reach the same ionization state of the protein in the two solvents. The FTIR spectra look similar in the presence and absence of DMSO, but a rather small difference in pH* leads to significant differences in amide I' band contours (Fig 1A and 1B). Spectra of fibrils prepared at pH* 2 exhibit maxima in the amide I' region at ~1628 cm⁻¹ (with the main minimum of the second derivative at 1628 cm⁻¹ and a weaker one at 1615 cm⁻¹), while spectra of fibrils grown at pH* 1.6 exhibit maxima in the amide I' region at ~1621–22 cm⁻¹ (with the main minimum of the second derivative at 1619 cm⁻¹ and a weaker one at 1631 cm⁻¹), pointing toward predominantly beta-sheet structures but with a significantly different hydrogen-bonding patterns. A small band outside of the amide I' region at ~1728 cm⁻¹ is present only in the spectra of fibrils grown at pH* 1.6 and can be attributed to deuterated carboxyl groups [19]. Very similar spectral characteristics were recently described as a hallmark of two different insulin amyloid strains [19,35].

Fibrils grown at pH* 1.6 in the presence of 5% DMSO are usually 2–4 nm in diameter and exhibit both a curved and straight morphology (Fig 1C), while fibrils grown at pH* 2 both in the presence (Fig 1D) and absence (Fig 1E) of DMSO are thicker (4–16 nm) and usually

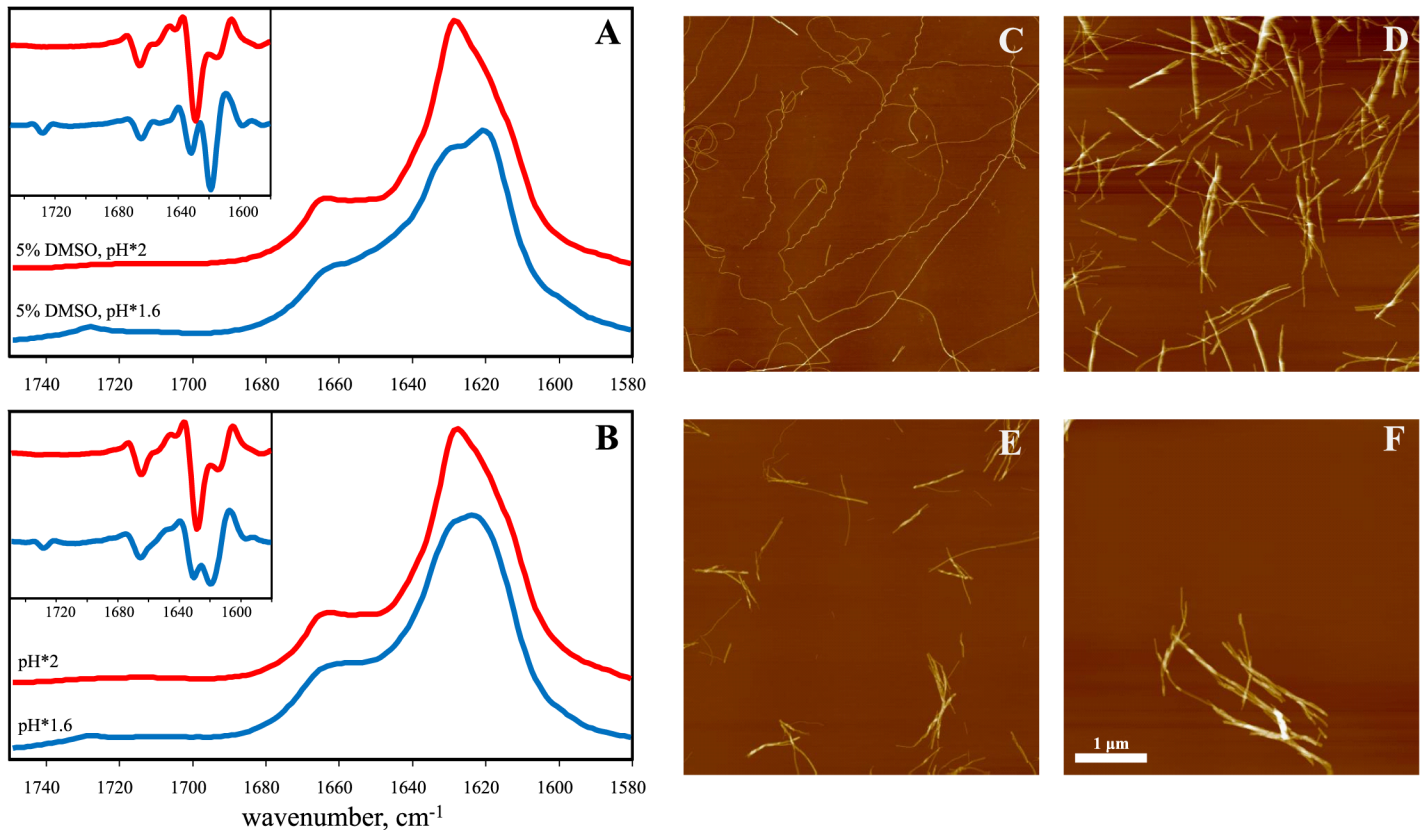


Fig 1. Polymorphism of insulin amyloid-like fibrils formed at different pH* values. FTIR absorption spectra (second derivative spectra in the inset) of fibrils grown in the presence (A), and absence (B) of 5% DMSO (spectra were repeated using different FTIR instruments in different labs, see S1 Fig). AFM images of fibrils prepared in the presence of DMSO at pH*1.6 (C), and pH*2 (D) or in absence of DMSO at pH*1.6 (E), and pH*2 (F). Fibril height measurements are shown in S2 Fig.

doi:10.1371/journal.pone.0136602.g001

straight. The structure of the fibrils at pH*1.6 in the absence of DMSO (Fig 1E) looks similar to the case at pH*2, suggesting no clear morphological differences between strains.

Both types of fibril seeds induce aggregation of insulin at either pH* and 37°C (Fig 2). Seeds grown at pH*1.6 fibrillate insulin at similar rates under both pH* conditions and faster than seeds grown at pH*2. The latter seeds elongate faster at solution conditions of the same pH*. As clearly visible, the fluorescence intensity of Thioflavin T (ThT), which marks formation of fibrillar amyloid states, is seed-dependent: pH*1.6-seed-induced aggregates result in an about double ThT intensity when compared to pH*2-seed-induced aggregates (Fig 2A). The light absorbance data at 600 nm—as measure of formation of larger insulin aggregates due to light scattering—show the reverse effect (Fig 2B). The pH*2-type fibrils induce aggregates which strongly absorb visible light (600 nm), the absorbance being ~25% lower in the case of seeding in the pH*1.6 environment. pH*1.6-type fibrils induce weakly absorbing aggregates (about 5 times lower than pH*2-type fibrils); however, the absorbance is strongly increased in the pH*2 solution.

The FTIR spectra of the seeded fibrils clearly demonstrate the superiority of the seed template versus the pH*-environment in controlling the fibrillar structure (Fig 3). The spectra of pH*2-seed-induced aggregates grown at pH*2 and pH*1.6 look identical. In case of the pH*1.6-seeded aggregates, the spectral signature is similar for both solution conditions; however, in pH*2, the intensity of the band at 1631 cm⁻¹ is increased. These data confirm the ability

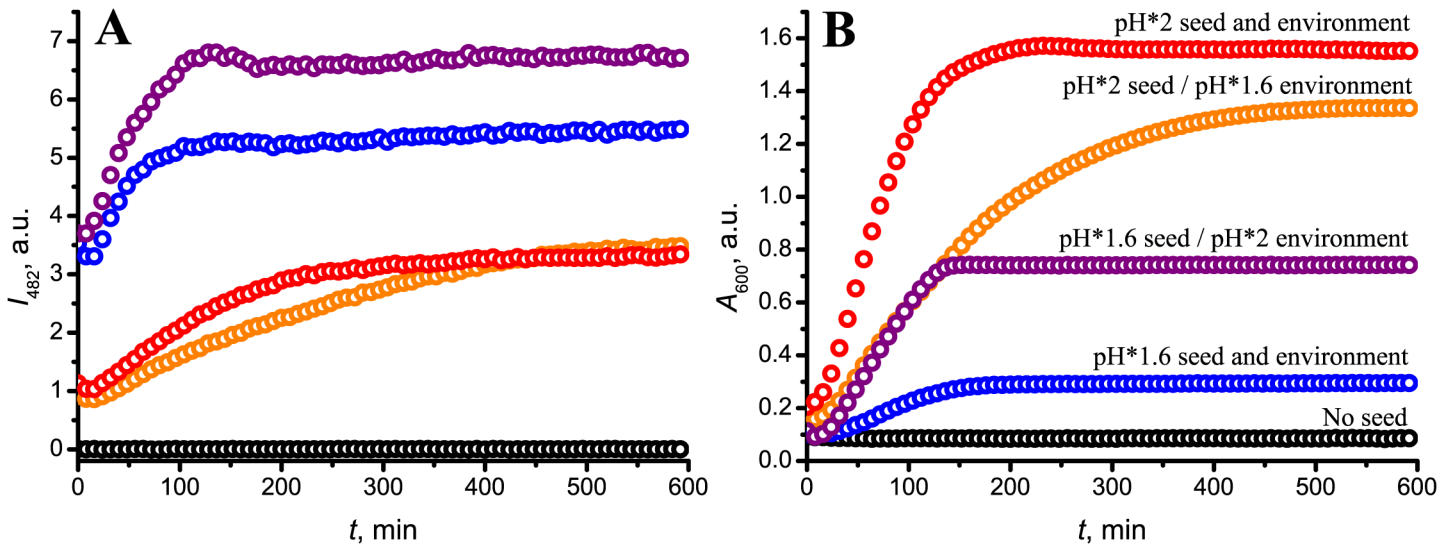


Fig 2. Kinetics of seed-induced aggregation of insulin; followed by ThT fluorescence intensity (A) as maker of fibril formation, and light absorbance at 600 nm (B). Measurements were repeated using 3 batch preparations showing similar results.

doi:10.1371/journal.pone.0136602.g002

of both types of insulin fibrils to self-propagate their conformational template in spite of unfavorable environmental factors (here different pH conditions), suggesting the existence of two different insulin amyloid strains.

Surprisingly, the FTIR spectra of insulin amyloid-like fibrils spontaneously formed in H₂O at pH 1.6 and pH 2 look almost identical (Fig 4). Both spectra exhibit maxima in the amide I/I' region at ~1628 cm⁻¹ (with the main minimum of the second derivative at 1628 cm⁻¹ and a weaker one at 1641 cm⁻¹), and a small band outside of the amide I/I' region at ~1730 cm⁻¹. A different spectrum was obtained using fibrils spontaneously formed in H₂O at a slightly higher pH, at pH 2.4: it also exhibits a maximum in the amide I/I' region at ~1628 cm⁻¹, but the second derivative profile is different—two similar sized bands, at 1625 cm⁻¹ and 1636 cm⁻¹, respectively. As the amyloid-like fibrils are highly protected from hydrogen/deuterium exchange, most of the amide hydrogens stay unchanged despite resuspension of the aggregates in D₂O. It reflects in the blue-shift of the spectra compared to insulin fibrils, prepared in D₂O.

Different types of insulin fibrils were first mentioned more than 60 years ago [43], however no structural or cross-seeding data were presented. In more recent studies, formation of different strains were reported in the presence and absence of 20% ethanol (at pH*1.5–1.8) [11,14,15], and using slightly different insulin forms (bovine insulin (BI) and recombinant Lys^{B31}-Arg^{B32} human insulin analog (KR)) at pH*1.9 [19,35]. Spectral characteristics of the latter strains are very similar to our data. The spectrum of the fibrils formed at pH*2 is similar to the spectrum of the BI strain, and the spectrum of the fibrils formed at pH*1.6 reminds us of the one of the KR strain. So the effect of two additional positively charged amino acids on the fibrillar structure is similar to the effect of ΔpH by -0.4 units. The change in net charge of the protein due to such ΔpH is minor, and taking into account that in normal water at pH 1.6 and pH 2 insulin aggregates into the same strain, we may conclude that ionization state of the protein is not the factor inducing formation of different strains. So what is the factor?

A possible answer to that question can be found by analyzing recent studies, which, at first sight, seem to contradict our findings [44–46]. In these works, no differences in the FTIR spectra of insulin fibrils formed at different pH values in the range between 1.3 and 3.1 are reported, however, a marked change of the vibrational circular dichroism (VCD) spectra are seen

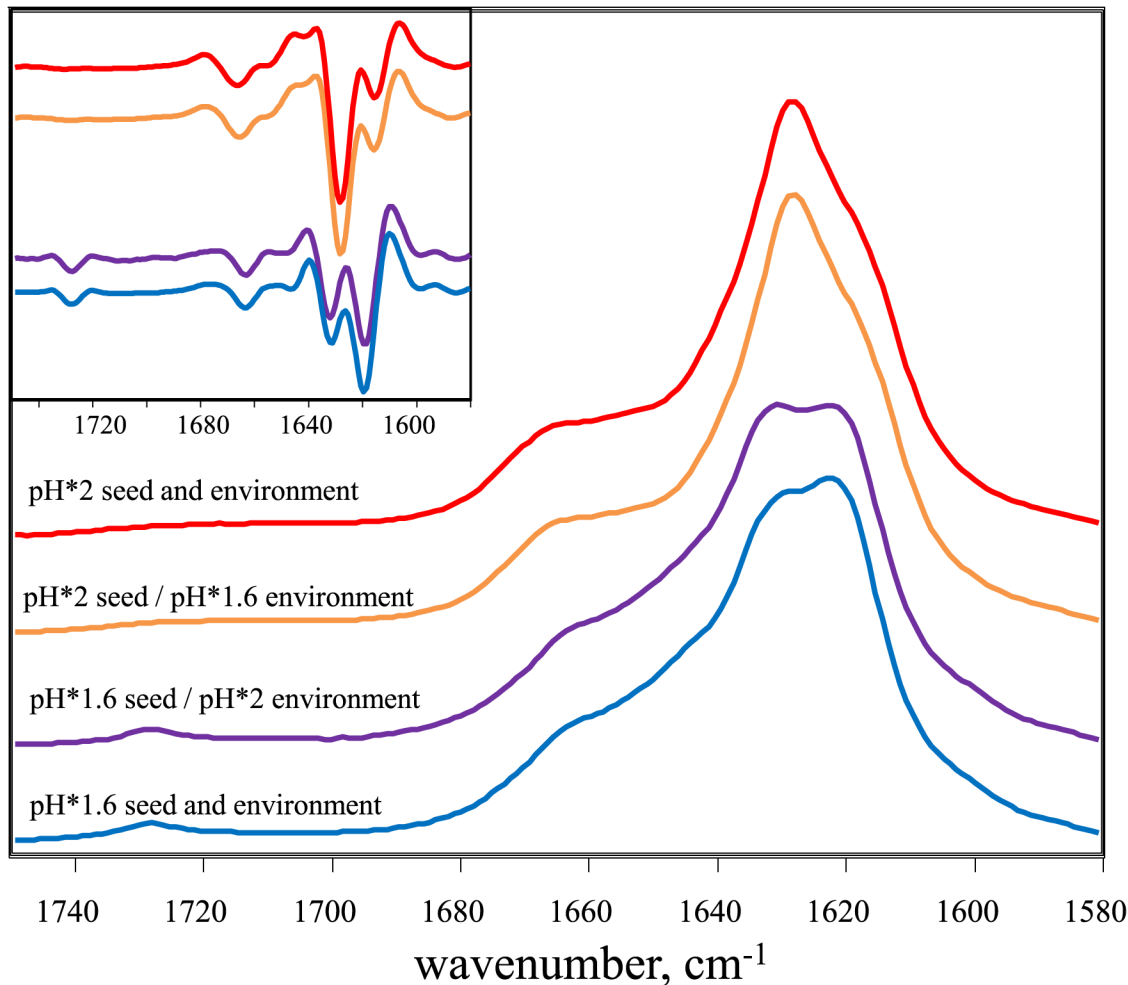


Fig 3. Infrared spectral features determined by the seeding template. Absorption and second derivative (inset) FTIR spectra.

doi:10.1371/journal.pone.0136602.g003

between pH 2.1 and 2.4, which is explained by a different supramolecular chirality [44,45]. Furthermore, it was shown that the chirality can be converted by incubation of preformed fibrils at different pH, thus excluding the possibility of different strains [46]. The reported FTIR spectra lack a detailed description, however, the shape of the amide I band looks very similar to the amide I' band of the pH*2 fibrils [44–46]. A closer inspection reveals one major experimental difference, which can affect the mechanism of insulin fibrillation. The concentration of insulin used in the aforementioned studies was 60 mg/mL (compared to 1 mM (~5.8 mg/mL) in our study), which means a strong shift towards a higher oligomeric state of insulin in solution, as even at much lower concentrations insulin tends to oligomerize [47–49]. Hence, the factor which determines the formation of different strains could be due to a shift in the monomer-oligomer equilibrium.

The spectral features of the insulin amyloid strain formed in the presence of 20% ethanol [11,14,15] are similar to those of the pH*1.6 and KR strain [19,35]. In all three cases the second derivative FTIR spectra in the amide I' region exhibit strong minima at 1619–1620 cm^{-1} , and a weaker one at 1630–31 cm^{-1} , plus a small band outside of amide I' region at 1728–30 cm^{-1} . Hence, it should be concluded that the same amyloid strain is present in all three cases. It is known that the presence of 20% ethanol strongly increases the dissociation of insulin dimers

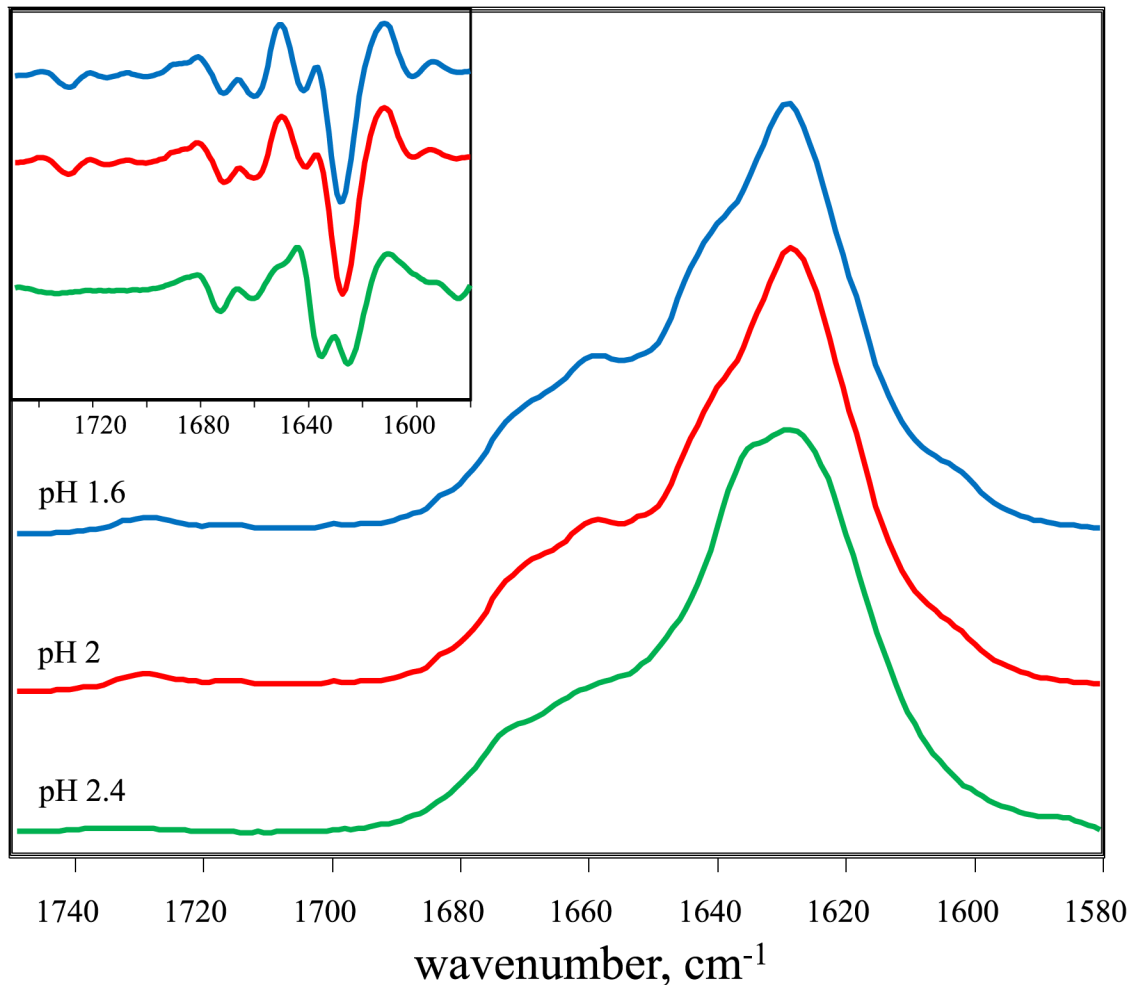


Fig 4. Infrared spectra of insulin amyloid-like fibrils formed in normal water (H₂O). Absorption and second derivative (inset) FTIR spectra.

doi:10.1371/journal.pone.0136602.g004

[50], leading to predominantly monomeric insulin at moderate concentrations [14,51]. The C-terminal part of the B-chain of insulin is involved in the formation of intramolecular antiparallel β -sheet that binds together native insulin dimers [19]. Thus there is a high probability that two additional charged amino acids would lead to dissociation of dimers in case of KR insulin. There is no data on the monomer-dimer equilibrium of insulin at pH*1.6, but the fact that different strains can be formed not only with increasing pH*, but also with increased concentration of insulin, suggests a shift of the equilibrium to the monomeric state. We may hence hypothesize that the major factor which determines formation of different strains is a shift of the equilibrium between insulin monomers and dimers (oligomers) (Fig 5). If the equilibrium

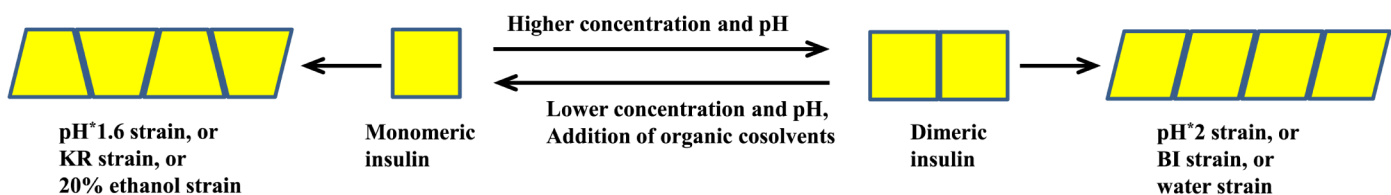


Fig 5. Proposed scheme of insulin amyloid straining.

doi:10.1371/journal.pone.0136602.g005

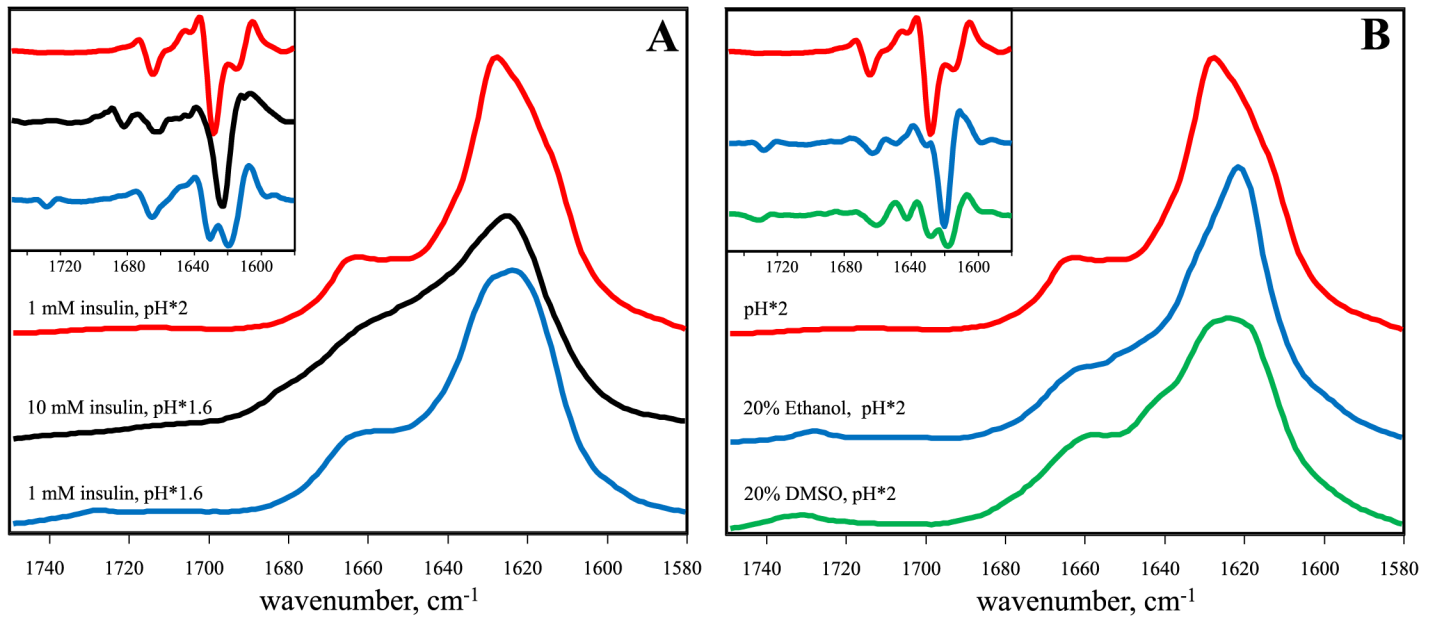


Fig 6. The effect of high insulin concentration (A), and organic cosolvents (B). Absorption and second derivative (inset) FTIR spectra.

doi:10.1371/journal.pone.0136602.g006

is shifted towards dimers (or higher oligomers), insulin aggregation would result in the pH*2-like strain, and in case that the equilibrium is shifted towards monomers, growth of the pH*1.6-like strain is fostered.

To further test the hypothesis we carried out several additional experiments. First we checked if an increased insulin concentration would explain the differences observed between the pH*1.6 and pH*2 data. As seen in Fig 6A, and Table 1, the spectrum of 10 mM insulin aggregates, prepared in the pH*1.6 environment, is slightly different from the other spectra. The blue shift of the amide I' maximum, when compared to the spectra of the pH*1.6 strain, and the absence of the band around 1728 cm⁻¹ suggests that the increased protein

Table 1. Summary of FTIR band positions of insulin amyloid-like fibrils.

Insulin aggregation conditions	Amide I/I' band (2 nd derivative), cm ⁻¹		Additional bands, cm ⁻¹
	Beta-sheets	Turns/loops	
1 mM insulin, pH*1.6	1619/1631 ^a	1665	1728
1 mM insulin, pH*2	1628/1615	1665	absent
1 mM insulin, pH*1.6, 5% DMSO	1619/1631	1664	1728
1 mM insulin, pH*2, 5% DMSO	1628/1615	1665	absent
10 mM insulin, pH*1.6	1623	1662	absent
1 mM insulin, pH*2, 20% ethanol	1620/1631	1663	1728
1 mM insulin, pH*2, 20% DMSO	1619/1629	1661	1731
1 mM insulin, pH 1.6	1628/1641	1672/1661	1729
1 mM insulin, pH 2	1628/1641	1672/1661	1729
1 mM insulin, pH 2.4	1625/1636	1673/1661	absent

^aAll FTIR measurements were repeated at least three times showing similar results.

^bBand assigned to carboxyl groups according to Surmacz-Chwedoruk et al [19]

doi:10.1371/journal.pone.0136602.t001

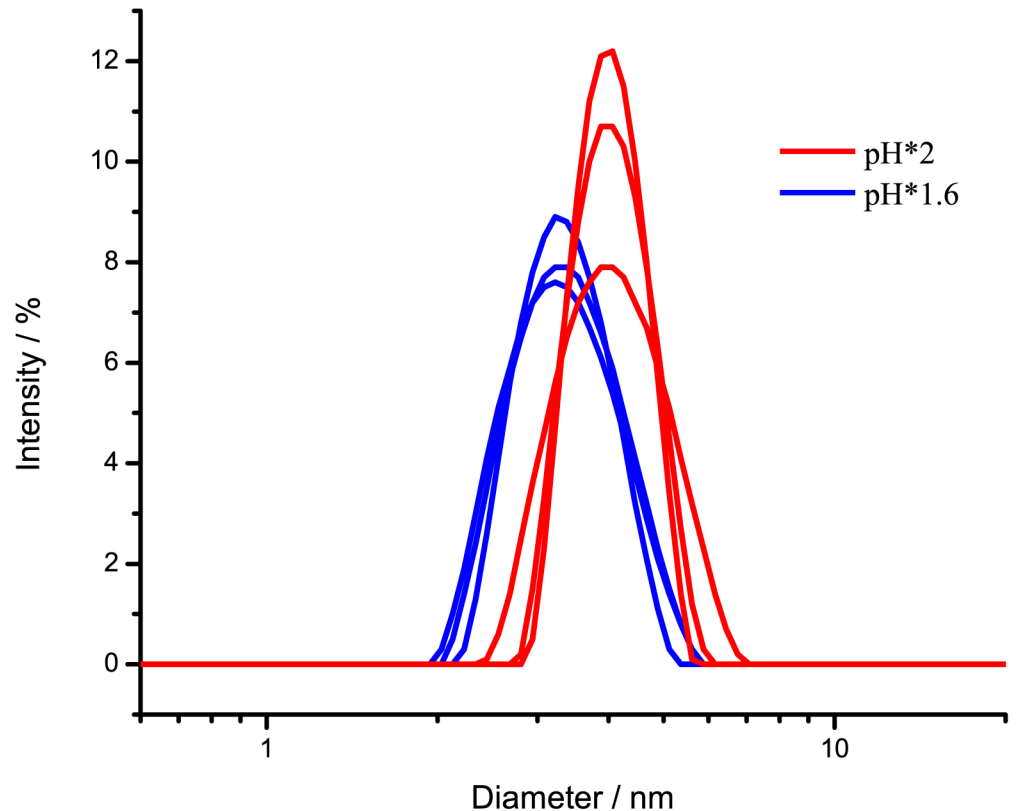


Fig 7. Size distribution of insulin in solution. DLS measurements were repeated using 3 batch preparations with similar results.

doi:10.1371/journal.pone.0136602.g007

concentration leads to formation of different strain. Nevertheless, the spectrum is also different from the pH*2 strain, so this data does not add much to strengthen our hypothesis. It is worth to mention that at high insulin concentration insulin aggregates form gel-like substance (which is not the case at lower insulin concentrations). It may point to the different aggregation mechanism thus explaining difference in FTIR spectra.

We also repeated previously described data on insulin aggregation in the presence of ethanol and examined the effect of higher DMSO concentrations. As seen in Fig 6B, the presence of 20% of both organic cosolvents during insulin aggregation in the pH*2 environment leads to formation of aggregates exhibiting pH*1.6-like IR spectra. This confirms that ethanol and, to a lower extent DMSO shifts the equilibrium towards formation of pH*1.6-like insulin amyloid strains.

Finally, we used dynamic light scattering (DLS) to determine the size distribution of insulin under the various solution conditions. The data reveal that average size of insulin, dissolved in pH*1.6 is lower than in pH*2 (Fig 7). The measured diameter of insulin in pH*1.6 is 3.4 ± 0.7 nm, which is bigger than monomer, but smaller than dimer, while in pH*2, the diameter is 4.0 ± 0.6 , which is a little bigger than insulin dimer. Owing to the polydispersity of the sample, the method does not allow the exact estimation of the monomer and oligomer content, however the shift of the equilibrium towards dimeric/oligomeric species at higher pH* is unarguable, hence supporting our hypothesis.

Taken together, our data indicates different factors inducing polymorphism of insulin amyloid-like fibrils. However it seems that all the presented cases can be reduced to the formation

of two amyloid strains and possibly explained by the differences in the equilibrium between insulin monomers and dimers (oligomers).

Materials and Methods

Preparation of insulin fibrils

Recombinant human insulin was purchased from Sigma Aldrich (91077C). Insulin amyloid-like fibrils were prepared as described previously [52]. Briefly, fresh 1 mM insulin solution (in 100 mM phosphate buffer (PB), at different pH (in H₂O) and pH* (in D₂O) values was incubated at 60°C for 24 hours with 300 rpm agitation (using a MHR 23 thermomixer, Dtabis, Germany). The secondary structures and morphological signatures of the aggregates obtained were tested using FTIR spectroscopy and AFM.

Seeds were prepared as described previously [52]. Briefly, 1 mL of fibrils were sonicated for 10 minutes using a Bandelin Sonopuls 3100 ultrasonic homogenizer equipped with a MS73 tip (using 50% of the power, cycles of 30 s/30 s sonication/rest, total energy applied to the sample per cycle, 0.56 kJ). The sample was kept on ice during the sonication procedure. Right after the treatment, one part of the fibrils was mixed with 9 parts of the fresh 1 mM insulin solution in the appropriate buffer and incubated at 37°C for 24 hours without agitation. The secondary structures of the aggregates obtained were tested using FTIR spectroscopy.

Elongation kinetics

To follow the seeding kinetics, samples were prepared as described above, with addition of 50 μM ThT. Right after the mixing the fresh insulin with seeds, samples were divided into 200 μL aliquots, in 96-well plates. The plates were sealed using clear polyolefin sealing tape. The aggregation kinetics was followed at constant 37°C temperature using a Biotek Synergy H4 plate reader without agitation. ThT fluorescence intensity upon fibril formation was observed using 440 nm excitation and 482 nm emission with simultaneous measurement of absorbance at 600 nm.

Infrared spectroscopy

To avoid overlapping of protein amide I and water bands, D₂O is used as solvent in FTIR measurements. At equal concentrations of D⁺ and H⁺, respectively, the pH-meter reading with a glass electrode is 0.4 pH units lower in D₂O than in H₂O [53]. However, isotopes affect the pK_a of protein ionizable groups, and for solutions of globular proteins the ΔpK_a was found to be 0.4 pH units in the acidic range, thus the isotope effect on the glass electrode and the ionization constant cancel each other, so that an identical pH-meter reading (in the acidic range) refers to an identical ionization state of the biopolymer in D₂O and H₂O solutions [54]. To prepare samples for the FTIR measurements, insulin fibrils prepared in H₂O were separated from water by centrifugation (30 min., 15000 g), and resuspended in D₂O, the procedure was repeated three times. All samples were sonicated for 1 minute using a Bandelin Sonopuls 3100 ultrasonic homogenizer equipped with a MS73 tip. The FTIR spectra were recorded using a Nicolet 5700 spectrometer from Thermo Scientific equipped with a liquid-nitrogen-cooled mercury-cadmium-telluride (MCT) detector, and using Bruker Alpha spectrometer equipped with deuterium triglycine sulfate (DTGS) detector. For all measurements, CaF₂ transmission windows and 0.05 mm Mylar spacers or 0.05 and 0.1 mm Teflon spacers (with Bruker instrument) were used. Spectra were recorded at room temperature. For each spectrum, 256 interferograms of 2 cm⁻¹ resolution were co-added. A corresponding buffer spectrum was subtracted from each sample spectrum. All the spectra were baseline-corrected and normalized to the

same area of amide I/I' band ($1700\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$) before further data processing. All data processing was performed using GRAMS software.

Dynamic light scattering

For DLS experiments, freshly prepared insulin solutions at different buffers were filtered using $0.22\text{ }\mu\text{m}$ syringe filter. The size measurements were performed using Zetasizer μV (Malvern instruments) with low-volume quartz batch cuvette at 60°C .

Atomic force microscopy

For AFM experiments, 1 mM insulin was diluted 100 times with deionized water, $30\text{ }\mu\text{L}$ of the sample were deposited on freshly cleaved mica and left to adsorb for 1 min, the sample was rinsed with 1 mL of water and dried gently using airflow. AFM images were recorded in the Tapping-in-Air mode at a drive frequency of approximately 300 kHz , using a MultiModee SPM microscope equipped with a NanoScope IIIa controller. PointProbe NCHR aluminium-coated silicon tips from Nanosensors were used as a probe.

Supporting Information

S1 Fig. Example of the repeatability of FTIR spectra. Red and blue spectra were collected using Thermo Nicolet instrument in TU Dortmund University, black and green—using Bruker Alpha instrument in Vilnius University.

(PDF)

S2 Fig. Fibril height measurements.

(PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VS. Performed the experiments: TS DD AB MG VS. Analyzed the data: TS DD VS. Contributed reagents/materials/analysis tools: RW VS. Wrote the paper: RW VS.

References

1. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75: 333–366. doi: [10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901) PMID: [16756495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16756495/)
2. Pham CL, Kwan a H, Sunde M. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose. *Essays Biochem.* 2014; 56: 207–219. doi: [10.1042/BSE0560207](https://doi.org/10.1042/BSE0560207) PMID: [25131597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25131597/)
3. Fändrich M, Dobson CM. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* 2002; 21: 5682–5690. doi: [10.1093/emboj/cdf573](https://doi.org/10.1093/emboj/cdf573) PMID: [12411486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12411486/)
4. Azriel R, Gazit E. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 34156–34161. doi: [10.1074/jbc.M102883200](https://doi.org/10.1074/jbc.M102883200) PMID: [11445568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11445568/)
5. Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers S a, Apostol MI, et al. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature.* 2007; 447: 453–457. doi: [10.1038/nature05695](https://doi.org/10.1038/nature05695) PMID: [17468747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17468747/)
6. Tamamis P, Adler-Abramovich L, Reches M, Marshall K, Sikorski P, Serpell L, et al. Self-assembly of phenylalanine oligopeptides: Insights from experiments and simulations. *Biophys J. Biophysical Society.* 2009; 96: 5020–5029. doi: [10.1016/j.bpj.2009.03.026](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.03.026)
7. Adler-Abramovich L, Vaks L, Carny O, Trudler D, Magno A, Caffisch A, et al. Phenylalanine assembly into toxic fibrils suggests amyloid etiology in phenylketonuria. *Nat Chem Biol. Nature Publishing Group.* 2012; 8: 701–706. doi: [10.1038/nchembio.1002](https://doi.org/10.1038/nchembio.1002) PMID: [22706200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22706200/)
8. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 13363–13383. doi: [10.1073/pnas.95.13.13363](https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.13363) PMID: [9811807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9811807/)

9. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, et al. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*. 1998; 4: 1157–1165. doi: [10.1038/2654](https://doi.org/10.1038/2654) PMID: [9771749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9771749/)
10. Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*. 2007; 318: 930–936. doi: [10.1126/science.1138718](https://doi.org/10.1126/science.1138718) PMID: [17991853](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17991853/)
11. Dzwolak W, Smirnovas V, Jansen R, Winter R. Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner: an FT-IR spectroscopic study. *Protein Sci*. 2004; 13: 1927–1932. doi: [10.1110/ps.03607204](https://doi.org/10.1110/ps.03607204) PMID: [15169954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15169954/)
12. Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau W-M, Mattson MP, Tycko R. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science*. 2005; 307: 262–265. doi: [10.1126/science.1105850](https://doi.org/10.1126/science.1105850) PMID: [15653506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653506/)
13. Heise H, Hoyer W, Becker S, Andronesi OC, Riedel D, Baldus M. Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length alpha-synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 15871–15876. doi: [10.1073/pnas.0506109102](https://doi.org/10.1073/pnas.0506109102) PMID: [16247008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16247008/)
14. Dzwolak W, Grudzielanek S, Smirnovas V, Ravindra R, Nicolini C, Jansen R, et al. Ethanol-perturbed amyloidogenic self-assembly of insulin: Looking for origins of amyloid strains. *Biochemistry*. 2005; 44: 8948–8958. doi: [10.1021/bi050281t](https://doi.org/10.1021/bi050281t) PMID: [15966720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15966720/)
15. Dzwolak W, Jansen R, Smirnovas V, Lokszejn A, Porowski S, Winter R. Template-controlled conformational patterns of insulin fibrillar self-assembly reflect history of solvation of the amyloid nuclei. *Phys Chem Chem Phys*. 2005; 7: 1349–1351. doi: [10.1039/b502255j](https://doi.org/10.1039/b502255j) PMID: [19787953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19787953/)
16. Paravastu AK, Leapman RD, Yau W-M, Tycko R. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 18349–18354. doi: [10.1073/pnas.0806270105](https://doi.org/10.1073/pnas.0806270105) PMID: [19015532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19015532/)
17. Debelouchina GT, Platt GW, Bayro MJ, Radford SE, Griffin RG. Magic angle spinning NMR analysis of beta 2-microglobulin amyloid fibrils in two distinct morphologies. *J Am Chem Soc*. 2010; 132: 10414–10423. doi: [10.1021/ja102775u](https://doi.org/10.1021/ja102775u) PMID: [20662519](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20662519/)
18. Dinkel PD, Siddiqua A, Huynh H, Shah M, Margittai M. Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. *Biochemistry*. 2011; 50: 4330–4336. doi: [10.1021/bi2004685](https://doi.org/10.1021/bi2004685) PMID: [21510682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21510682/)
19. Surmacz-Chwedoruk W, Nieznańska H, Wójcik S, Dzwolak W. Cross-seeding of fibrils from two types of insulin induces new amyloid strains. *Biochemistry*. 2012; 51: 9460–9469. doi: [10.1021/bi301144d](https://doi.org/10.1021/bi301144d) PMID: [23127165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23127165/)
20. Chatani E, Yagi H, Naiki H, Goto Y. Polymorphism of beta 2-microglobulin amyloid fibrils manifested by ultrasonication-enhanced fibril formation in trifluoroethanol. *J Biol Chem*. 2012; 287: 22827–22837. doi: [10.1074/jbc.M111.333310](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333310) PMID: [22566695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22566695/)
21. Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun*. 2013; 4: 2575. doi: [10.1038/ncomms3575](https://doi.org/10.1038/ncomms3575) PMID: [24108358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24108358/)
22. Tycko R. Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils. *Protein Sci*. 2014; 23: 1528–39. doi: [10.1002/pro.2544](https://doi.org/10.1002/pro.2544) PMID: [25179159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25179159/)
23. Aguzzi A. Neurodegeneration: Alzheimer's disease under strain. *Nature*. 2014; 512: 32–4. doi: [10.1038/512032a](https://doi.org/10.1038/512032a) PMID: [25100477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25100477/)
24. Stöhr J, Condello C, Watts JC, Bloch L, Oehler A, Nick M, et al. Distinct synthetic Aβ prion strains producing different amyloid deposits in bigenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: 2–7. doi: [10.1073/pnas.1408968111](https://doi.org/10.1073/pnas.1408968111)
25. Watts JC, Condello C, Stöhr J, Oehler A, Lee J, DeArmond SJ, et al. Serial propagation of distinct strains of Aβ prions from Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci*. 2014; 111: 10323–10328. doi: [10.1073/pnas.1408900111](https://doi.org/10.1073/pnas.1408900111) PMID: [24982139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24982139/)
26. Westermarck GT, Westermarck P. Prion-like aggregates: Infectious agents in human disease. *Trends Mol Med*. Elsevier Ltd; 2010; 16: 501–507. doi: [10.1016/j.molmed.2010.08.004](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.08.004) PMID: [20870462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20870462/)
27. Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2010; 11: 301–307. doi: [10.1038/nrm2873](https://doi.org/10.1038/nrm2873) PMID: [20308987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20308987/)
28. Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. Nature Publishing Group; 2010; 11: 155–159. doi: [10.1038/nrn2786](https://doi.org/10.1038/nrn2786) PMID: [20029438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20029438/)
29. Angot E, Steiner J a., Hansen C, Li JY, Brundin P. Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol*. Elsevier Ltd; 2010; 9: 1128–1138. doi: [10.1016/S1474-4422\(10\)70213-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70213-1) PMID: [20846907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20846907/)
30. Prusiner SB. A Unifying Role for Prions in Neurodegenerative Diseases. *Science* (80: -). 2012; 336: 1511–1513. doi: [10.1126/science.1222951](https://doi.org/10.1126/science.1222951)

31. Eisele YS. From soluble Abeta to progressive Abeta aggregation: Could prion-like templated misfolding play a role? *Brain Pathol.* 2013; 23: 333–341. doi: [10.1111/bpa.12049](https://doi.org/10.1111/bpa.12049) PMID: [23587139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23587139/)
32. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, et al. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain.* 2013; 136: 1128–1138. doi: [10.1093/brain/awt037](https://doi.org/10.1093/brain/awt037) PMID: [23466394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23466394/)
33. Goedert M, Falcon B, Clavaguera F, Tolnay M. Prion-like Mechanisms in the Pathogenesis of Tauopathies and Synucleinopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014; 14: 495. doi: [10.1007/s11910-014-0495-z](https://doi.org/10.1007/s11910-014-0495-z) PMID: [25218483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25218483/)
34. Hill a F, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature.* 1997; 389: 448–450, 526. doi: [10.1016/S0887-7963\(98\)80051-5](https://doi.org/10.1016/S0887-7963(98)80051-5) PMID: [9333232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9333232/)
35. Surmacz-Chwedoruk W, Babenko V, Dzwolak W. Master and Slave Relationship Between Two Types of Self-Propagating Insulin Amyloid Fibrils. *J Phys Chem B.* 2014; 118: 13582–13589. doi: [10.1021/jp510980b](https://doi.org/10.1021/jp510980b) PMID: [25373010](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25373010/)
36. Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS. Conformational variations in an infectious prion determine prion strain differences. *Nature.* 2004; 428: 323–328. doi: [10.1038/nature02392](https://doi.org/10.1038/nature02392) PMID: [15029196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15029196/)
37. Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature.* 2006; 442: 585–589. doi: [10.1038/nature04922](https://doi.org/10.1038/nature04922) PMID: [16810177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16810177/)
38. Colby DW, Giles K, Legname G, Wille H, Baskakov I V., DeArmond SJ, et al. Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 20417–20422. doi: [10.1073/pnas.0910350106](https://doi.org/10.1073/pnas.0910350106) PMID: [19915150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19915150/)
39. Cobb NJ, Apostol MI, Chen S, Smirnovas V, Surewicz WK. Conformational stability of mammalian prion protein amyloid fibrils is dictated by a packing polymorphism within the core region. *J Biol Chem.* 2014; 289: 2643–2650. doi: [10.1074/jbc.M113.520718](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.520718) PMID: [24338015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24338015/)
40. Ostapchenko VG, Sawaya MR, Makarava N, Savtchenko R, Nilsson KPR, Eisenberg D, et al. Two amyloid states of the prion protein display significantly different folding patterns. *J Mol Biol. Elsevier Ltd.* 2010; 400: 908–921. doi: [10.1016/j.jmb.2010.05.051](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.051) PMID: [20553730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20553730/)
41. Caughey B, Raymond GJ, Bessen R a. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem.* 1999; 273: 32230–32235. doi: [10.1074/jbc.273.48.32230](https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32230)
42. Malisauskas R, Botyriute A, Cannon JG, Smirnovas V. Flavone Derivatives as Inhibitors of Insulin Amyloid-Like Fibril Formation. *PLoS One.* 2015; 10: e0121231. doi: [10.1371/journal.pone.0121231](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121231) PMID: [25799281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25799281/)
43. Waugh DF, Wilhelmson DF, Commerford SL, Sackler ML. Studies of the nucleation and growth reactions of selected types of insulin fibrils. *J Am Chem Soc.* 1952; 75: 2592–2600. doi: [10.1021/ja01107a013](https://doi.org/10.1021/ja01107a013)
44. Kourouski D, Lombardi R a, Dukor RK, Lednev IK, Nafie L a. Direct observation and pH control of reversed supramolecular chirality in insulin fibrils by vibrational circular dichroism. *Chem Commun (Camb).* 2010; 46: 7154–7156. doi: [10.1039/c0cc02423f](https://doi.org/10.1039/c0cc02423f)
45. Kourouski D, Dukor RK, Lu X, Nafie L a., Lednev IK. Normal and reversed supramolecular chirality of insulin fibrils probed by vibrational circular dichroism at the protofilament level of fibril structure. *Biophys J. Elsevier.* 2012; 103: 522–531. doi: [10.1016/j.bpj.2012.04.042](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.042) PMID: [22947868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22947868/)
46. Kourouski D, Dukor RK, Lu X, Nafie L a., Lednev IK. Spontaneous inter-conversion of insulin fibril chirality. *Chem Commun.* 2012; 48: 2837. doi: [10.1039/c2cc16895b](https://doi.org/10.1039/c2cc16895b)
47. Bryant C, Spencer DB, Miller a, Bakaysa DL, McCune KS, Maple SR, et al. Acid stabilization of insulin. *Biochemistry.* 1993; 32: 8075–8082. doi: [10.1021/Bi00083a004](https://doi.org/10.1021/Bi00083a004) PMID: [8394123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8394123/)
48. Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky VN, Fink a. L. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry.* 2001; 40: 8397–8409. doi: [10.1021/bi0105983](https://doi.org/10.1021/bi0105983) PMID: [11444987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11444987/)
49. Nettleton EJ, Tito P, Sunde M, Bouchard M, Dobson CM, Robinson C V. Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry. *Biophys J. Elsevier.* 2000; 79: 1053–1065. doi: [10.1016/S0006-3495\(00\)76359-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76359-4) PMID: [10920035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10920035/)
50. Kim SK, Ha T, Schermann J-P. Biomolecular structures: from isolated molecules to the cell crowded medium. *Phys Chem Chem Phys.* 2010; 12: 3334–3335. doi: [10.1039/c004156b](https://doi.org/10.1039/c004156b) PMID: [20336242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20336242/)
51. Grudzielanek S, Jansen R, Winter R. Solvational tuning of the unfolding, aggregation and amyloidogenesis of insulin. *J Mol Biol.* 2005; 351: 879–894. doi: [10.1016/j.jmb.2005.06.046](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.046) PMID: [16051271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16051271/)
52. Milto K, Botyriute A, Smirnovas V. Amyloid-Like Fibril Elongation Follows Michaelis-Menten Kinetics. Baskakov I V., editor. *PLoS One.* 2013; 8: e68684. doi: [10.1371/journal.pone.0068684](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068684) PMID: [23874721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23874721/)

53. Glasoe PK, Long FA. Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J Phys Chem.* 1960; 64: 188–190. doi: [10.1021/j100830a521](https://doi.org/10.1021/j100830a521)
54. Bundi A, Wüthrich K. ¹H-nmr parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers.* 1979; 18: 285–297. doi: [10.1002/bip.1979.360180206](https://doi.org/10.1002/bip.1979.360180206)