



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Artūras Blažaitis

**INSULINO AMILOIDINĖS AGREGACIJOS KINETIKOS MECHANIZMŲ
MODELIAVIMAS**

**MODELING OF MECHANISMS FOR INSULIN AMYLOID-LIKE
AGGREGATION KINETICS**

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

(Data)

Artūras Blažaitis

**INSULINO AMILOIDINĖS AGREGACIJOS KINETIKOS MECHANIZMŲ
MODELIAVIMAS**

**MODELING OF MECHANISMS FOR INSULIN AMYLOID-LIKE
AGGREGATION KINETICS**

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas _____ dr. Vytautas Smirnovas

(Parašas)

(Data)

Konsultantas _____ lekt. Audrius Laurynėnas

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2016

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO (PROJEKTO)

UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentui: **Artūriui Blažaičiui**

Baigiamojo darbo tema: **Insulino amiloidinės agregacijos kinetikos mechanizmų modeliavimas**

patvirtina 2015 m. lapkričio mėn. 09 d. dekanų potvarkiu Nr. 392fm

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2016 m. gegužės mėn. 30 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

Išsiaiškinti, koks iš siūlomų mechanizmų geriausiai atitinka insulino amiloidinės agregacijos kinetiką.

Baigiamojo bakalauro darbo (projekto) konsultantas: lekt. Audrius Laurynėnas

Vadovas dr. Vytautas Smirnovas
(Parašas)

Užduotį gavau

.....
(Parašas)

Artūras Blažaitis

.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data

Pirmosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos bakalauro baigiamasis darbas 3
Pavadinimas **Insulino amiloidinės agregacijos kinetikos mechanizmų modeliavimas**
Autorius **Artūras Blažaitis**
Vadovas **dr. Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Amiloidinių fibrilių sankaupos siejamos su daugeliu amiloidogeninių ligų. Fibrilių susidarymo metu baltymo molekulės sąveikauja tarpusavyje ir sudaro linijinius, biologiškai neaktyvius agregatus. Siekiant išgydyti amiloidozes reikia gerai suprasti agregacijos mechanizmą.

Šiame darbe buvo tiriami amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmai ir kombinuojami įvairūs modeliai, kurie atitiktų insulino agregacijos kinetiką. Nors insulinas be pašalinio poveikio nesudaro patologinių agregatų *in vivo*, tačiau yra gerai ištirtas baltymas agregacijai *in vitro*. Baltymo agregacija buvo stebima fluorescencinės spektroskopijos metodu, naudojant dažą tioflaviną T (ThT), kuris specifiskai jungiasi prie amiloidinių struktūrų.

Buvo parodyta, kad gautiems insulino fibrilių susidarymo eksperimentiniams duomenims aprašyti gali būti taikomas vienas modelis, kurį sudaro nukleacijos, elongacijos, fragmentacijos ir antrinės nukleacijos procesai. Elongacija aprašoma dvejais etapais, naudojant Michaelis-Menten kinetiką.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis 37 p. teksto be priedų, 21 paveikslas, 2 lentelės, 25 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: Agregacija, amiloidas, insulinas, kinetika, mechanizmas, modelis, tioflavinas T.

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

ISBN ISSN
Copies No.
Date

Bachelor Degree Studies **Bioengineering** study programme Bachelor Graduation Thesis 3
Title: **Modeling of Mechanisms for Insulin Amyloid-like Aggregation Kinetics**
Author **Artūras Blažaitis**
Academic supervisor **dr. Vytautas Smirnovas**

Thesis language: lithuanian

Annotation

Amyloid fibril deposition is associated with various amyloidogenic diseases. Protein monomers join into linear biologically inactive aggregates – amyloid fibrils. In order to treat amyloidosis it is necessary to understand aggregation mechanism.

Mechanisms of amyloid-like fibril formation were investigated in this work. Several different models were used to fit insulin amyloid-like aggregation kinetics. Insulin does not form pathologic aggregates *in vivo*, however formation of insulin amyloid-like fibrils is well-studied *in vitro*. Aggregation of insulin was observed using thioflavin T (ThT) fluorescence assay.

It was demonstrated that the best model obtained experimental data of insulin fibril formation should include nucleation, elongation, fragmentation and secondary nucleation processes. Elongation was defined as multi-step reaction using Michael-Menten kinetics.

Structure: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusion and references.

Thesis consist of: 37 p. of text without appendixes, 21 pictures, 2 tables, and 25 bibliographical entries.

Keywords: Aggregation, amyloid, insulin, kinetic, mechanism, model, thioflavin T.

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Artūras Blažaitis, 20124078

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, Bif-12

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2016 m. gegužės mėn. 26 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Insulino amiloidinės agregacijos kinetikos mechanizmų modeliavimas“ patvirtintas 2015 m. lapkričio 9 d. dekanu potvarkiu Nr. 392fm yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: Audrius Laurynėnas. Mano darbo vadovas Vytautas Smirnovas.

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

(Parašas)

ARTŪRAS BLAŽAITIS

(Vardas ir pavardė)

Turinys

Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Amiloidai	10
1.1.1. Ligos, susijusios su baltymų agregacija	10
1.2. Amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmas	12
1.3. Insulinas – modelinis baltymas	15
1.4. Tioflavino T fluorescencija	17
2. Medžiagos ir metodai	19
2.1. Naudoti reagentai.....	19
2.2. Naudota laboratorinė įranga	19
2.3. Metodai.....	19
2.3.1. Fluorescencijos matavimas	19
2.3.2. Mėgininių paruošimas	20
2.4. Duomenų apdorojimas.....	20
2.4.1. Programinė įranga rModeler	20
2.4.2. Fibrilizacijos procesai	20
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	22
3.1. Agregacija vyksta negižtamais procesais.	22
3.1.1. 1 modelis	22
3.1.2. 2 modelis	23
3.1.3. 3 modelis	24
3.1.4. 4 modelis	25
3.2. Agregacija vyksta grįžtamais procesais.....	26
3.2.1. 5 modelis	26
3.2.2. 6 modelis	27
3.2.3. 7 modelis	28
3.2.4. 8 modelis	29

3.3. Michaelis-Menten kinetikos ģterpimas	30
3.3.1. 9 modelis	30
3.3.2. 10 modelis	31
3.3.3. 11 modelis	32
3.3.4. 12 modelis	33
Išvados	35
Literatūros sarakšas	36

Ivadas

Už neurodegeneracines ligas, sisteminės amiloidozės ir lokalizuotas amiloidozės atsakingi baltymai yra labai skirtingi. Skiriasi jų dydis, struktūra, hidrofobiškumas, tačiau jie turi bendrą požymį – amiloidinių fibrilių formavimąsi (Chiti *and* Dobson, 2006; Lee *et al.*, 2007). Nors atitinkamos ligos turi skirtingus simptomus, tačiau visi amiloidiniai agregatai turi panašią antrinę β -klosčių struktūrą, kuri sudaryta iš pasikartojančių β -lakštų išsidėsčiusių statmenai fibrilių ašiai (Sunde *et al.*, 1997). Manoma, jog tam tikromis sąlygomis dauguma baltymų ir peptidų gali agreguoti į fibrilinius agregatus (Chiti *and* Dobson, 2006).

Kiekviena reakcija yra charakterizuojama kinetiniais ir termodinaminiais parametrais, ne išimtis ir amiloidinių fibrilių susidarymas. Mokslinėje literatūroje yra pateikti vos keli susidarymo mechanizmai, nes iki šiol nėra tiksliai žinoma kodėl susidaro šie specifiniai agregatai ir kokios sąlygos tai lemia. Vieni mokslininkai bando suformuluoti amiloidinių fibrilių susidarymą kaip labai paprastą mechanizmą, kiti – išskiria tarpinius procesus. Kadangi šie baltyminiai agregatai yra atsakingi už įvairias ligas, tikimasi, jog išanalizavus jų susidarymo mechanizmą, bus įmanoma užkirsti kelią ligoms pradinėse jų vystymosi stadijose.

Darbo metu naudojamas rekombinantinis žmogaus insulinas. Nors šis baltymas be pašalinio poveikio nesudaro amiloidinių agregatų *in vivo*, tačiau jis puikiai tinka kaip modelinė medžiaga tyrimams. Insulinas yra gerai ištirinėtas baltymas, kuris nesudėtingai formuoja fibrilinius agregatus *in vitro* (Lee *et al.*, 2007), taip pat plačiai naudojamas mūsų laboratorijoje.

Darbo tikslas – išsiaiškinti, koks iš siūlomų mechanizmų geriausiai atitinka insulino amiloidinės agregacijos kinetiką.

Darbui keliami uždaviniai:

1. Atlikti seriją insulino amiloidinės agregacijos eksperimentų.
2. Išnagrinėjus literatūrą pasirinkti keletą siūlomų baltymų amiloidinės agregacijos mechanizmų variantų.
3. Naudojant rModeler programą patikrinti, kuris iš mechanizmų geriausiai aprašo insulino amiloidinės agregacijos kinetiką.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Amiloidai

Pirmą kartą terminą „amiloidai“ 1838 metais panaudojo vokiečių botanikas M. J. Schleidenas apibūdindamas augalų sudėtį. Ne ilgai trukus, 1854 metais tą patį terminą medicininėje literatūroje pavartojo R. Virchowas, kuris norėjo aprašyti iš smegenų išskirtų darinių cheminę sąveiką su jodo tirpalu ir sieros rūgštimi. Abi reakcijos parodė ryškius spalvinius pokyčius, atitinkamai reagentams buvo gautos mėlyna ir violetinė spalvos. Remdamasis gautais rezultatais mokslininkas manė, kad šiam reiškiniui įtaką daro angliavandeniai, todėl davė amiloidų pavadinimą [*lot.* amyllum, *gr.* amyilon – krakmolos]. Vis dėlto, terminas buvo naudojamas klaidingai, nes 1859 metais S. Fridrichas su A. Kekule įrodė, jog tuose pačiuose dariniuose yra didelė azoto koncentracija, todėl amiloidus priskyrė baltymų klasei (Sipe *and* Cohen, 2000). Bėgant laikui ir tobulėjant technologijoms buvo atlikti tyrimai, kurie parodė, kad amiloidai specifiškai sąveikauja su Kongo raudonuoju [*angl.* Congo Red] dažu. Apšvietus poliarizuota šviesa ir mikroskopo pagalba buvo matomi žalios spalvos dariniai. Remiantis eksperimentais iškelta hipotezė, jog amiloidai yra fibrilinės struktūros, o vėliau atlikus elektroninę mikroskopiją – šią prielaidą patvirtino. (Rambaran *and* Serpell, 2008).

Amiloidai yra netirpūs baltymų agregatai, kurie susidaro iš organizme esančių natyvių baltymų, tačiau imuninė sistema jų neatpažįsta ir sunkiai pašalina, o to priežastys dar nėra gerai žinomos (William *et al.*, 2013). Pagal rentgeno spindulių difrakcijos analizę – amiloidinėms fibrilėms būdinga tai, kad polipeptidinė grandinė sudaryta iš pasikartojančių β -lakštų išsidėsčiusių statmenai fibrilių ašiai. O atlikus aukštos raiškos elektroninę mikroskopiją nustatyta, kad amiloidinės fibrilės sudarytos iš 20-35 Å pločio subvienetų ir yra 70-120 Å diametro (Sunde *et al.*, 1997; Sipe *and* Cohen, 2000).

Daugeliu atveju, amiloidai yra patogeniniai baltymai, atsitiktinai susiformavę esant molekulių, ląstelių ar organizmo patiriamam stresui, temperatūros ar pH pokyčiams, baltymų sintezės sutrikimams, kuomet iš natyvių, funkcionuojančių baltymų išsivysto pakitusios struktūros ir funkcijos baltymai. (William *et al.*, 2013). Fibrilių formavimasis yra bendras simptomas daugiau nei 20 amiloidogeninių ligų, tokių kaip Alzheimerio liga, Parkinsono liga ir su prionais susijusios encefalopatijos (Lee *et al.*, 2007).

1.1.1. Ligos, susijusios su baltymų agregacija

Yra manoma, kad esant tam tikromis sąlygomis, visi baltymai gali agreguotis į skirtingas struktūras. Tai gali būti visiškai netvarkingi amorfiniai agregatai, ar net labai taisyklingos formos fibrilės (Chiti *and* Dobson, 2006). Ligos, kurias siejamos su tvarkingomis baltymų sancaupomis

ląstelės viduje ar už jos ribų vadinamos amiloidozėmis. Amiloidozes galima suskirstyti į tris grupes:

- sisteminės amiloidozės – baltymų agregacija pasireiškia daugelyje audinių;
- lokalizuotos amiloidozės – baltymų agregatų sankaupos randamos tam tikro tipo audiniuose, bet ne smegenyse;
- neurodegeneracinės ligos – baltymų agregacija pasireiškia tik smegenyse.

1.1 lentelėje pateikiamos amiloidozės, nurodyti baltymai ar peptidai, kurie ligos atveju randami sankaupose bei šių baltymų aminorūgščių skaičius.

1.1 lentelė. Žmonių ligos, susijusios su baltymų amiloidine agregacija (pritaikyta iš Chiti *and* Dobson, 2006).

Liga	Agreguojantis baltymas arba peptidas	Aminorūgščių skaičius
Sisteminės amiloidozės		
AL amiloidozė ^a	Imunoglobulino lengvosios grandinės arba jų fragmentai	~90 ^d
AA amiloidozė ^a	Serumo amiloido A baltymo fragmentai	76-104 ^d
Paveldimoji Viduržemio jūros liga ^a	Serumo amiloido A baltymo fragmentai	76-104 ^d
Senatvinė sisteminė amiloidozė ^a	Laukinio tipo transtiretinas	127
Paveldimoji amiloidotinė polineuropatija ^b	Transtiretino mutantai	127
Su hemodialize susijusi amiloidozė ^a	β2-mikroglobulinas	99
ApoAI amiloidozė ^b	Apolipoproteino AI N-galo fragmentas	80-93 ^d
ApoAII amiloidozė ^b	Apolipoproteino AII N-galo fragmentas	98 ^e
ApoAIV amiloidozė ^b	Apolipoproteino AIV N-galo fragmentas	~70
Lizocimo amiloidozė ^b	Lizocimo mutantai	130
Fibrinogeno amiloidozė ^b	Fibrinogeno α grandinės variantai	27-81 ^d
Lokalizuotos amiloidozės		
II tipo diabetas ^a	Amilinas – kasos amiloido polipeptidas	37
Medulinė skydliaukės karcinoma ^a	Kalcitoninas	32
Prieširdžių amiloidozė ^a	Prieširdžio natriuretinis faktorius	28
Paveldima cerebralinė hemoragija su amiloidoze ^b	Amiloido β peptido mutantai	40 arba 42 ^d
Hipofizės prolaktinoma	Prolaktinas	199
Katarakta ^a	γ-kristalinai	Kintamas

Neurodegeneracinės ligos		
Alzheimerio liga ^a	Amiloido β peptidas	40 arba 42 ^d
Spongiforminės encefalopatijos ^{a,c}	Priono baltymas arba jo fragmentas	253
Parkinsono liga ^a	α-sinukleinas	140
Demencija su Lewy kūneliais ^a	α-sinukleinas	140
Frontotemporalinė demencija su Parkinsoniniu sindromu ^a	Tau	352-441 ^d
Amiotropinė laterinė sklerozė ^a	Superoksido dismutazė 1	153
Hantingtono liga ^b	Hantinginas su poliglutamino seka	3144 ^f
Spinocerebralinė ataksija ^b	Ataksinas su poliglutamino seka	816 ^f
Spinocerebralinė ataksija 17	Prie TATA dėžės prisijungiantis baltymas su poliglutamino seka	339 ^f
Bulbo-spiralinė raumenų atrofija ^b	Androgenų receptoriaus su poliglutamino seka	919 ^f

^a Daugiausia savaiminės, tačiau užregistruoti keli paveldimos ligos atvejai kai susirgimas siejamas su specifinėmis mutacijomis.

^b Daugiausia paveldimos, bet užregistruoti keli atvejai kai liga atsirado savaime.

^c Perduodamos (užkrečiamos) ligos atvejai.

^d Aptinkami įvairaus dydžio fragmentai, kurie dalyvauja *ex vivo* fibrilių susidaryme.

^e Patogeninė mutacija pakeičia stop kodoną į Gly kodoną, kuri prailgina seką 21-a aminorūgštimi

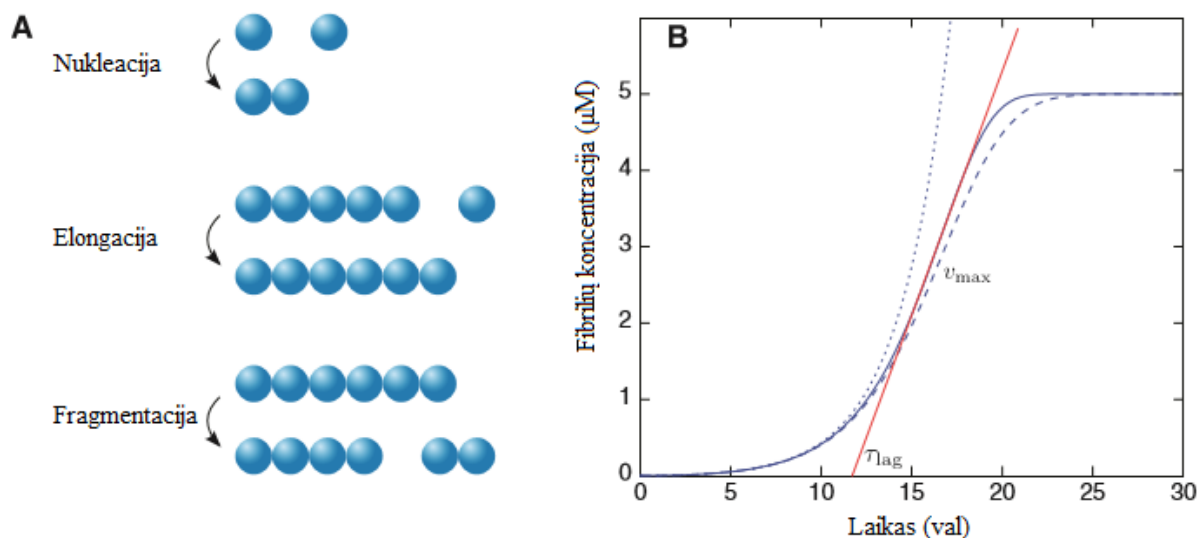
^f Nuordytas aminorūgščių ilgis yra be prijungtos poliglutamino sekos.

Visi išvardyti ligas sukeltys baltymai yra labai skirtingi, skiriasi baltymų ar peptidų ilgis, hidrofobiškumas ir antrinė struktūra. Nepaisant to, juos vienija suformuoti tvarkingi, labai stabilūs baltyminiai dariniai, kurių pagrindiniai požymiai – panaši struktūra ir vienodos dažymosi savybės (Merlini *and* Belloti, 2003).

1.2. Amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmas

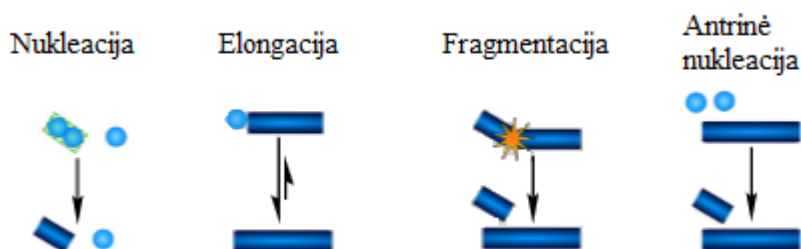
Fibrilių formavimasis yra kompleksinis procesas, kurio agregacija ir sudėtinga struktūra paprastai priklauso nuo serijos individualių žingsnių, kurie yra iš prigimties paprasti, lengvai atliekami remiantis fizikiniais principais. Tipinis fibrilių susidarymo procesas prasideda „lag“ faze, kurioje monomerai sąveikauja tarpusavyje, formuoja branduolius ir trumpas fibriles, tačiau amiloidinių baltymų kiekis tapęs fibrilėmis yra nepakankamas, kad būtų aptiktas. „Lag“ fazės metu vyksta nukleacijos procesas, kuris apibrėžiamas kaip *de novo* amiloidinių dalelių susidarymas. Po kurio laiko, monomerams jungiantis prie branduolių prasideda elongacijos fazė, kurioje labai greitai didėja fibrilių koncentracija (Lee *et al.*, 2007). Elongacija – spontaniškas amiloidinių fibrilių augimas, kuri laikoma kaip pagrindinė šių agregatų dauginimosi varomoji jėga. Ilgainiui, elongacija pasiekia pusiausvyrą tada kai dauguma ištirpusių baltymų paverčiamos

fibrilėmis. Procesas trunka tol, kol tirpale nebelieka baltymo monomerų, o visas baltymas pavirsta į fibrilinius agregatus. Spontaninio augimo metu įsijungia dar vienas vyksmas, vadinamas fragmentacija. Tai pilnai susiformavusios fibrilės skilimas į trumpesnes fibriles arba branduolius (Milton *et al.*, 2014).



1.1 pav. Spontaninės agregacijos modelio kinetika. (A) - Augimas per nukleacijos (1), elongacijos (2) ir fragmentacijos (3) procesus, kurie veda į sigmoidines kinetines kreives - (B), kuriose fibrilių masių koncentracija kinta laike (pritaikyta iš Knowles *et al.*, 2009).

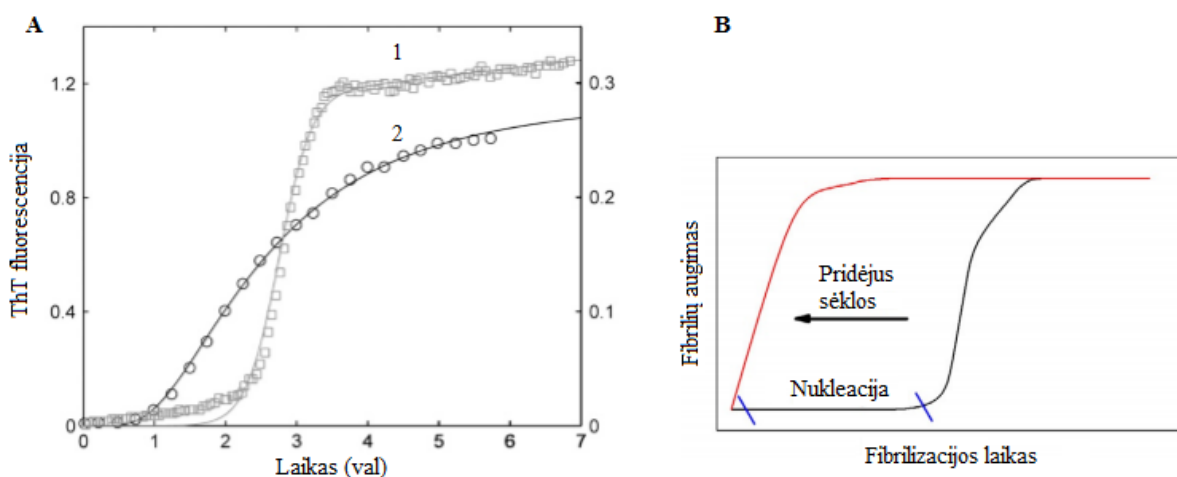
Po agregatų lūžinėjimo proceso susidaro fibrilių aktyvūs galai, todėl stengiantis gauti kuo tikslesnius rezultatus buvo įvestas papildomas procesas – antrinė nukleacija. Šio proceso metu aktyvios fibrilės katalizuoja naujų branduolių susidarymą iš monomerų (1.2 pav.) (Knowles *et al.*, 2009).



1.2 pav. Amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmo procesai. Nukleacijos proceso metu monomerai sąveikauja tarpusavyje, sudaro branduolius, o vėliau mažas fibriles. Vykstant elongacijai prie fibrilių vis jungiasi laisvi monomerai. Fragmentacija – ilgų fibrilių skilinėjimas. Antrinės nukleacijos metu fibrilės skatina laisvus monomerus sąveikauti ir sudaryti branduolius (pritaikyta iš Meisl *et al.*, 2016).

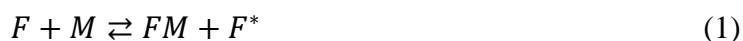
„Lag“ fazės laiko trukmė ir fibrilių augimo greitis priklauso nuo pradinės koncentracijos ir pH, kurie abu daro įtaką tirpalo įsotinimo laipsniui. Papildomi faktoriai, kurie įtakoja kinetinius matavimus yra tirpalo joninė jėga ir agitacijos intensyvumas (Lee *et al.*, 2009).

Fibrilių ilgėjimas yra vienintelis vyksmas, kuris gali būti atskirtas nuo kitų. Procesas inicijuojamas pridėdant paruoštą agregatų (sėklos) į baltymo monomerų tirpalą (Dzwolak *et al.*, 2004). Baltymo koncentraciją ir reakcijos sąlygas galima parinkti taip, kad pirminės nukleacijos laikas būtų minimizuotas arba šis procesas apskritai nevyktų. Vengiant maišymo galima sumenkinti ir antrinės nukleacijos įtaką (Cohen *et al.*, 2012). Buvo pastebėta, jog fibrilių ilgėjimo procesas panašus į fermentinę reakciją, kurios metu fibrilių galai gali būti laikomi kaip fermentų aktyvieji centrai, o prie jų prisijungiantys oligomerai ar monomerai – substratai (Chatani *et al.*, 2010).



1.3 pav. A - Amiloidinių fibrilių susidarymo procesas naudojant Aβ peptidą. 1 – oji kreivė be sėklos, 2 – oji pridėjus sėklos, kurios metu žymiai sutrumpinamas nukleacijos vyksmas (pritaikyta iš Lee *et al.*, 2009). B – Naudojant kitus amiloidinius baltymus, pridėjus sėklos galima visiškai išvengti nukleacijos proceso (pritaikyta iš Berhanu *and* Hansmann, 2014).

Tokiu atveju fibrilių ilgėjimą galima aprašyti lygtimi:



kur F – fibrilė, M – monomeras, F^* - ilgesnė fibrilė, o FM – trumpą laiką egzistuojantis kompleksas (nuo monomero prisijungimo prie fibrilės iki jo virtimo fibrilės dalimi). Tada fibrilių ilgėjimo greitis galėtų būti aprašomas Michaelio-Menten lygtimi:

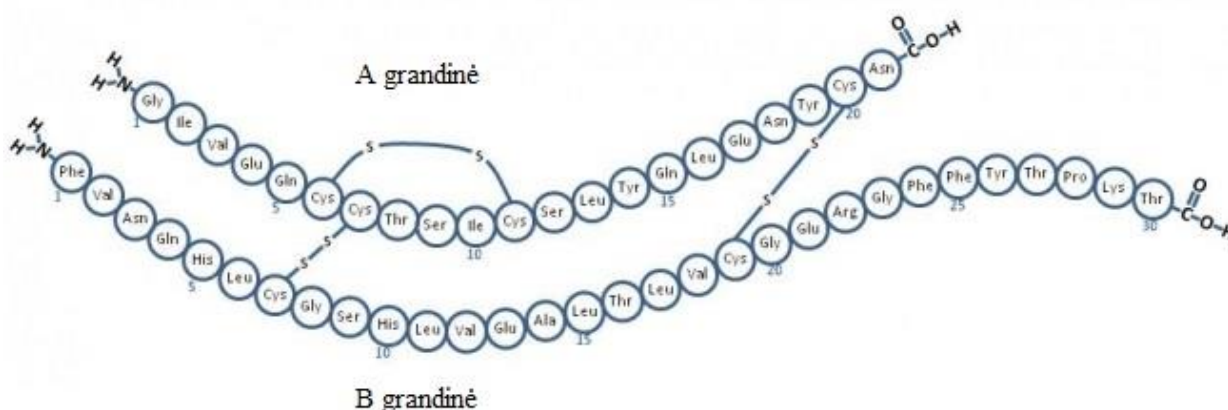
$$v = \frac{v_{max} * M}{K_M + M} \quad (2)$$

kur M – monomero koncentracija, v_{max} – didžiausias reakcijos greitis ($v_{max} = k_2 * F_g$, k_2 – FM komplekso susidarymo greitis į ilgesnę fibrilę, F_g – fibrilių galų koncentracija, K_M – Michaelio

konstanta ($K_M = (k_2+k_{-1})/k_1$, k_1 – monomero jungimosi prie fibrilės greičio konstanta, k_{-1} – FM kompleksio disociacijos konstanta) (Milton *et al.*, 2013).

1.3. Insulinas – modelinis baltymas

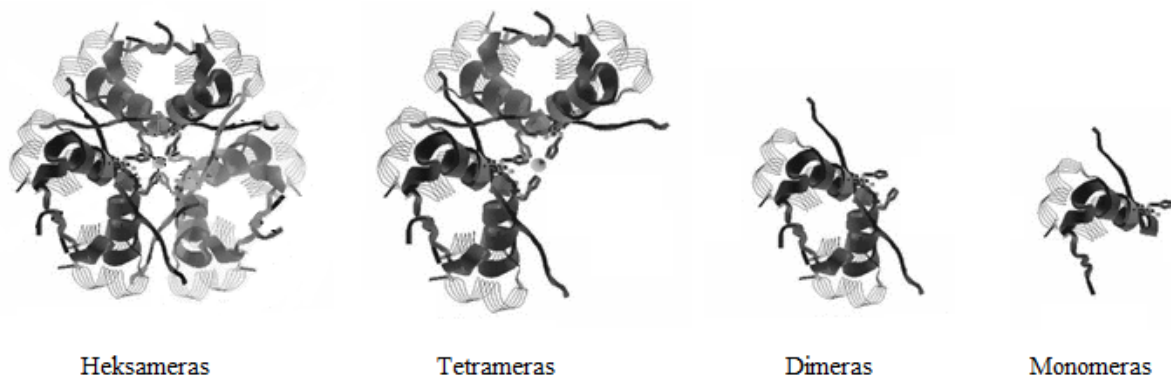
Insulinas – hormoninis baltymas (5,8 kDa), kurį gamina kasos β ląstelės. Ši medžiaga yra atsakinga už gliukozės metabolizmą organizme. Insulino monomeras sudarytas iš 2 polipeptidinių grandinių: viena (A) susideda iš 21 aminorūgšties, kita (B) iš 30 aminorūgščių. Šias dvi grandines jungia du tarpgrandininiai ir vienas vidugradininis disulfidinis ryšys (1.4 pav.) (Lee *et al.*, 2007).



1.4 pav. Insulino polipeptidinių grandinių schema (pritaikyta iš Diapedia, 2016-03-20).

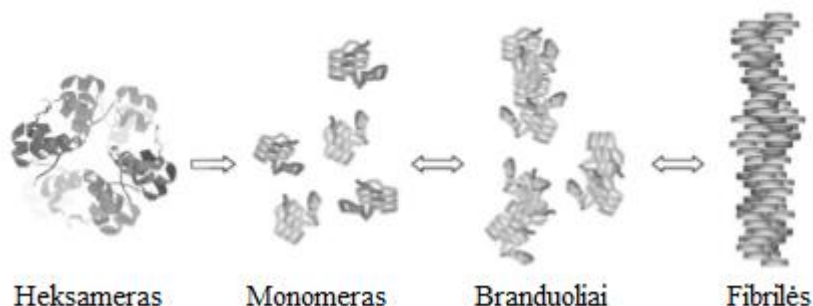
Insulinas yra genetiškai tolimas baltymas, lyginant su kitais baltymais, kurie dažniausiai asocijuojami su patologine agregacija *in vivo*, tačiau jis lengvai formuoja amiloidus *in vitro* (Dzwolak *et al.*, 2004). Biocheminė gausa ir gerai išnagrinėta jo struktūra paverčia šį baltymą puikiu modeliu amiloidų tyrimams (Nielsen *et al.*, 2001). Insulino agregacija yra energetiškai savarankiškas procesas, kuris leidžia atlikti amiloidų auginimo eksperimentus kambario temperatūroje. Sėjimas nedenantūruojančiomis sąlygomis efektyviai apsaugo nuo spontaninio formavimosi (Dzwolak *et al.*, 2004).

Fiziologiškai insulinas vyrauja heksamero formoje, kurį stabilizuoja 2-5 Zn^{2+} jonai. Priklausomai nuo tirpalo pH, metalų jonų, baltymo koncentracijos ir tirpiklio, insulinas gali būti įvairių formų: heksamerai, tetramerai, dimerai ir monomerai (1.5 pav.). Tyrinėjant šį baltymą buvo nustatyta, jog ties pH 2-8 ir esant jo koncentracijai mažesnei negu 1,5 mg/mL – insulinas yra dimerinėje formoje. Tetramerai vyrauja kai koncentracija viršija 1,5 mg/mL, o 20 % acto rūgštyje arba etanolyje – monomerus. (Dzwolak *et al.*, 2005).



1.5 pav. Vyraujančios insulino formos (pritaikyta iš Dunn, 2005).

Manoma, kad insulino molekulė, esanti heksamerinėje formoje, disocijuoja į monomerus. Kuo daugiau tirpale yra monomerų, tuo jie labiau linkę oligomerizuotis ir sudaryti branduolius, kurie formuoja fibriles. Teoriškai (1.6 pav.), tarp monomerų, branduolių ir fibrilių yra pusiausvyriniai procesai, todėl norint greičiau suformuoti fibriles, reikia paskatinti insulino heksamerinės formos disociaciją (Lee *et al.*, 2007). Skatinimas vyksta esant žemam pH, aukštai temperatūrai, hidrofobinei aplinkai ir druskų sukeltai elektrostatinei sąveikai (Foderà *et al.*, 2008).



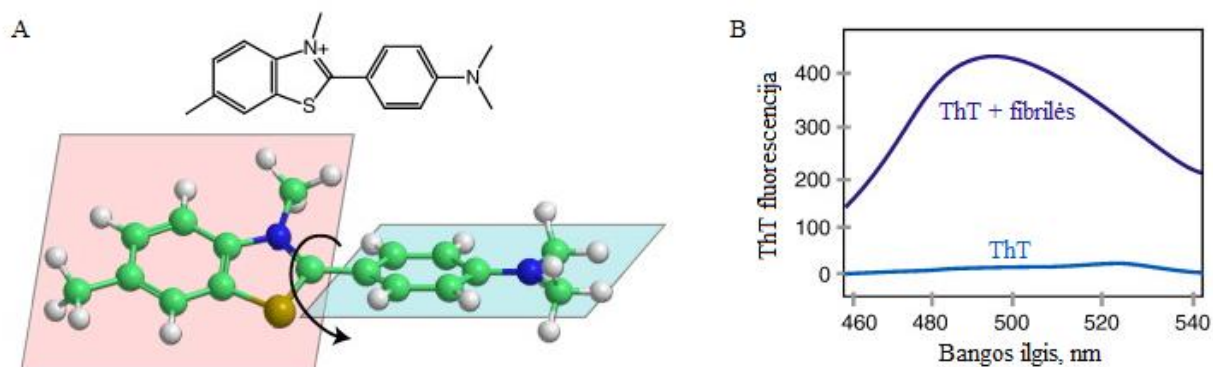
1.6 pav. Insulino fibrilių susidarymo schema (pritaikyta iš Lee *et al.*, 2007).

Pagal (Lee *et al.*, 2007) insulinas naudojamas kaip amiloidinių fibrilių tyrimų modelis dėl šių priežasčių:

1. Gerai ištirtas baltymas fibrilių susidarymo mechanizme;
2. Išgryninamas aukšta raiška natyvioje būsenoje;
3. Formuoja struktūriškai panašius β -klosčių darinius kaip ir patys amiloidiniai baltymai;
4. Pigiai gaunamas dideliais kiekiais.

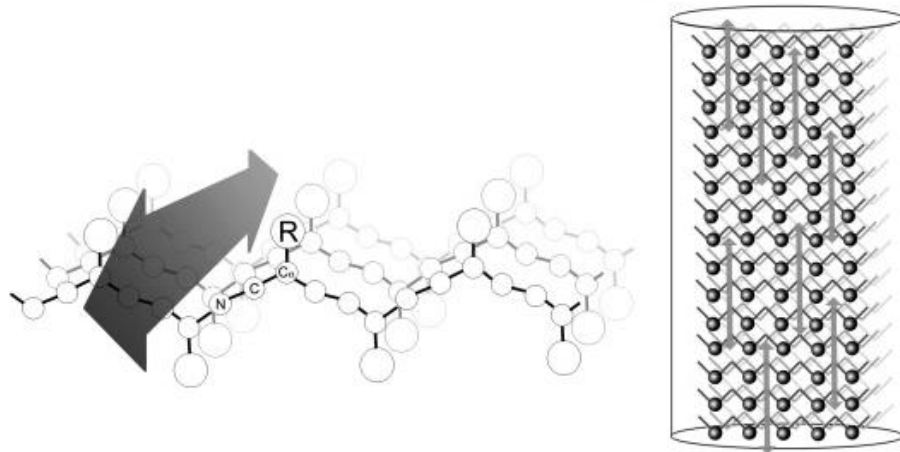
1.4. Tioflavino T fluorescencija

1959 metais mokslininkai P. S. Vassar ir C. F. A. Culling nustatė, jog jungiantis dažui Tioflavinui T (ThT) prie audiniuose esančių amiloidinių darinių, labai stipriai padidėja jo fluorescencijos intensyvumas. Dažo sužadimas vyksta prie ~ 450 nm, o emisija ties ~ 480 nm bangos ilgiu (Khurana *et al.*, 2005). Vidutinis dažo giminingumas ir geras tirpumas suteikia galimybę jį pritaikyti kinetiniuose amiloidinių fibrilių susidarymo tyrimuose (Biancalana *and* Koide, 2010).



1.7 pav. A - ThT cheminė ir konformacinė struktūros, kuris vaizduoja laisvą sukimašį tarp C-C atomų. B – ThT fluorescencijos padidėjimas prisijungus fibriles (pritaikyta iš Biancalana *and* Koide, 2010).

ThT molekulė sudaryta iš benzotiazolo ir benzeno žiedų, kurie gali laisvai sukis aplink bendrą C-C ryšį. Manoma, kad būtent dėl šios savybės pavienis ThT neflorescuoja (Krebs *et al.*, 2005). Nors šis metodas plačiai naudojamas, tačiau tikslus dažo jungimosi prie amiloidinių fibrilių mechanizmas nėra žinomas. Yra keliami hipotezė, kad fibriliniuose agregatuose, nepriklausomai nuo aminorūgščių sekos, lygiagrečiai fibrilės ašiai β -klostės suformuoja savitą grandinių išsidėstymą. Ši struktūra pavadinta β -klosčių kopečiomis, kurios savo paviršiuje turi susiformavusius kanalus (Biancalana *and* Koide, 2010; Groenning *et al.*, 2007). Paprastai tariant, ThT molekulė „įstringa“ kanaluose, tokiu būdu sustoja laisvas sukimasis tarp C-C atomų ir aptinkama aukšta fluorescencijos kvantinė išeiga.



1.8 pav. ThT jungimosi prie amiloidinių fibrilių kanalo modelis. ThT jungiasi prie šoninių grandinių paviršiuose esančių suformuotų kanalų. ThT žymima kaip dvikryptė rodyklė, β -klostės yra „zig-zag“ formos linijos, o tamsūs apskritimai – aminorūgščių šoninės grupės (pritaikyta iš Krebs *et al.*, 2005).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Naudoti reagentai

- *Acros Organics*: acto rūgštis (99,5 %);
- *Carl Roth*: natrio chloridas;
- *Sigma-Aldrich*: rekombinantinis žmogaus insulinas, Tioflavinas T.

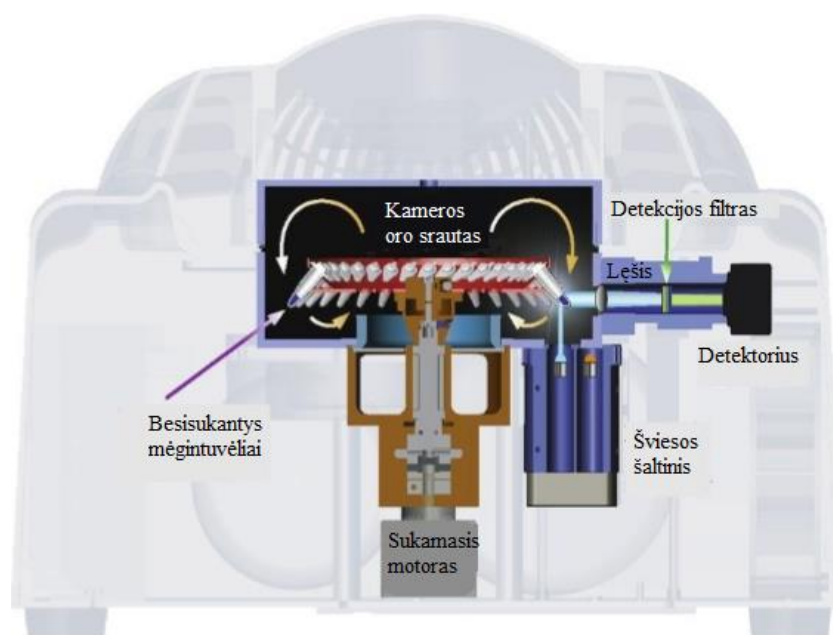
2.2. Naudota laboratorinė įranga

- Svarstyklės „Denver Instrument TP-214“;
- Realus laiko PGR aparatas „Qiagen Rotor-Gene Q“;
- Sūkurinė maišyklė „Biosan Microspin FV-2400“.

2.3. Metodai

2.3.1. Fluorescencijos matavimas

ThT fluorescencija stebima naudojantis realaus laiko PGR „Qiagen Rotor-Gene Q“ aparatą (2.1 pav.). Šio dažo fluorescencijos sužadinimas įvyksta prie 470 nm bangos ilgio, o emisija – prie 510 nm bangos ilgio. Prietaisas talpina 36 mėgintuvėlius (200 μ L tūrio), kurie statomi į rotorių. Rotorius sukasi 400 aps./min greičiu palaikydamas reakcijos mišinius apatinėse mėgintuvėlių dalyse. Šviesos diodas apšviečia mėginius 470 \pm 10 nm bangos ilgio šviesa, o detektorius matuoja 510 \pm 5 nm bangos ilgio šviesą. Dėl šių prietaiso savybių, jį galima naudoti ne pagal paskirtį, o būtent pritaikyti fibrilių formavimosi tyrimams.



2.1 pav. „Qiagen Rotor-Gene Q“ skersinis pjūvis (pritaikyta iš Qiagen, 2016-03-30).

Eksperimentų pabaigoje gaunamos fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo agregacijos laiko kreivės. Kameroje pastoviai vyksta oro cirkuliacija, dėl to palaikoma pastovi temperatūra ir dėka to, matavimo paklaidos yra mažos.

2.3.2. Mėgininių paruošimas

Visi insulino agregacijos eksperimentai buvo atliekami 60 °C temperatūroje 20 valandų. Insulinas tirpinamas 20 % acto rūgšties tirpale, turinčiame 100 mM NaCl druskos. Visuose reakcijų mišiniuose galutinė tioflavino T koncentracija buvo 50 μM. ThT fluorescencijos metodu buvo stebimas skirtingų insulino koncentracijų: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM ir 1 mM fibrilių susidarymas.

2.4. Duomenų apdorojimas

2.4.1. Programinė įranga rModeler

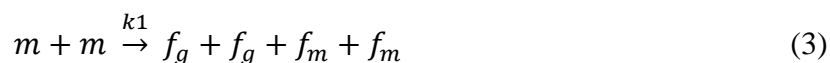
Kinetinių procesų modeliavimui naudojama programa rModeler. Ši programa skirta modeliuoti chemines, biochemines ir elektrochemines reakcijas, analizuoti eksperimentų duomenis bei juos gluodinti. Programos kūrėjai yra du jauni mokslininkai, dirbantys Vilniaus universitete. Vienas jų – Audrius Laurynėnas (mokslų sritis – biochemija) ir Justinas V. Daugmaudis (matematika ir informatika). Jų misija buvo sukurti išskirtinę programinę įrangą, kuri būtų labai paprastai valdoma, tačiau leistų mokslininkams planuoti eksperimentus, veiksmingai ir interaktyviai atlikti duomenų analizę bei suprojektuoti modeliavimo ir analizės sistemą (Ubicalc, 2016-04-13).

2.4.2. Fibrilizacijos procesai

Šioje skiltyje pateikti visi procesai, kurie dalyvauja amiloidinių fibrilių susidaryme. Svarbu yra tai, kad vykstant kiekvienam vyksmui būtina laikytis masės tvermės dėsnio, kuris teigia, jog reaguojančių medžiagų masė yra lygi produktų masei.

2.4.2.1. Nukleacija

Kaip ir minėta literatūros apžvalgoje – amiloidinių fibrilių susidarymas prasideda nukleacijos procesu. Nukleacijos metu iš monomerų susidaro branduoliai (trumpos fibrilės). Viena fibrilė turi du fibrilės galus.



kur m – baltymo monomerų koncentracija, f_g – susidariusios fibrilės galas, f_m – fibrilių masės koncentracija, k_1 – nukleacijos greičio konstanta.

2.4.2.2. Elongacija

Elongacijos proceso metu prie susidariusios fibrilės galo jungiasi monomerai ir tokiu būdu fibrilė ilgėja. Šis vyksmas aprašomas arba tiesiogine kryptimi su k_x greičio konstanta, arba grįžtamąja lygtimi, kur dalyvauja abi greičio konstantos:



kur k_x – elongacijos greičio konstanta, k_y – elongacijos disociacijos konstanta.

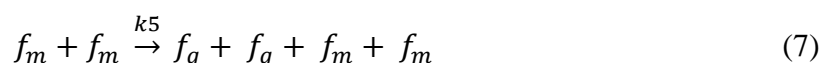
Taip pat, elongaciją galima aprašyti dviem žingsniais naudojantis Michaelis-Menten kinetika. Šio proceso metu prie fibrilės galo jungiasi monomeras, sudaro tarpinį fibrilės galo ir monomero kompleksą, o šis virsta ilgesne fibrile. Programinėje įrangoje šio proceso viena lygtimi aprašyti negalima, todėl reakcija įvedama per du etapus.



kur k_2 – monomero jungimosi prie fibrilės galo greičio konstanta; k_3 – $f_g m$ komplekso disociacijos konstanta; k_4 – $f_g m$ komplekso vartimas ilgesne fibrile greičio konstanta.

2.4.2.3. Fragmentacija

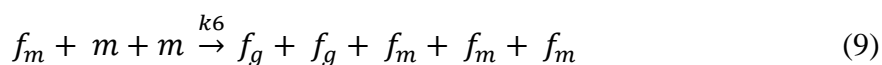
Šio proceso metu susidariusios ilgos fibrilės skyla į trumpesnes fibriles. Iš esmės, fragmentacija aprašoma (7) lygtimi, tačiau supaprastinus šį vyksmą gaunama (8) lygtis.



kur k_5 – fragmentacijos greičio konstanta.

2.4.2.4. Antrinė nukleacija

Antrinė nukleacija nuo nukleacijos skiriasi tuo, kad vykstant šiam procesui reikalinga susidariusi ilga fibrilė.



kur k_6 – antrinės nukleacijos greičio konstanta.

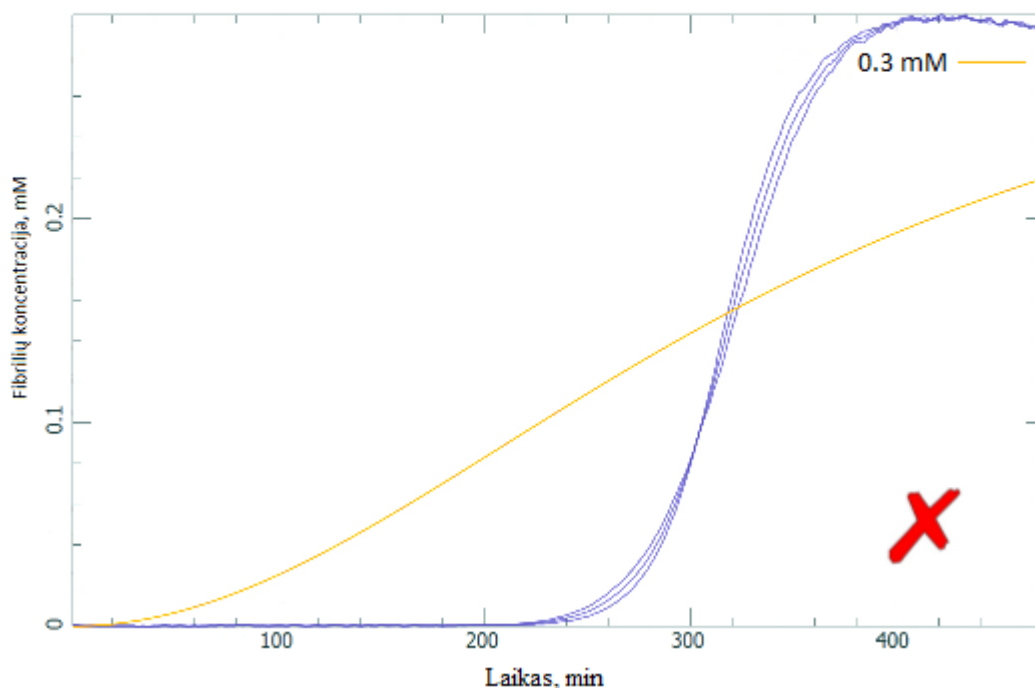
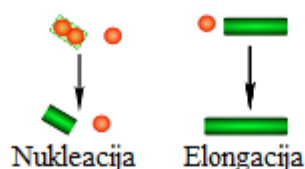
3. Rezultatai ir jų aptarimas

Iš serijos atliktų eksperimentų ir gautų duomenų bei remiantis mokslininkų (Meisl *et al.*, 2016) straipsniu kombinuojami įvairūs amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizmų modeliai. Visi modeliai kuriami naudojantis 2.4.2 punkte paminėtomis formulėmis. Agregacija stebėta naudojant 10 skirtingų insulino koncentracijų: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM ir 1 mM. Kiekvienos skirtingos koncentracijos buvo po 3 mėginius tam, kad gauti kuo tikslesnius rezultatus bei patikrinti eksperimentų atsikartojamumą. Visus modelius stengiamasi aprašyti kuo paprastesnius, su kuo mažiau greičio konstantų.

3.1. Agregacija vyksta negįžtamais procesais.

Šioje skiltyje nagrinėjami modeliai, kurių metu nevyksta pusiausvyriniai procesai.

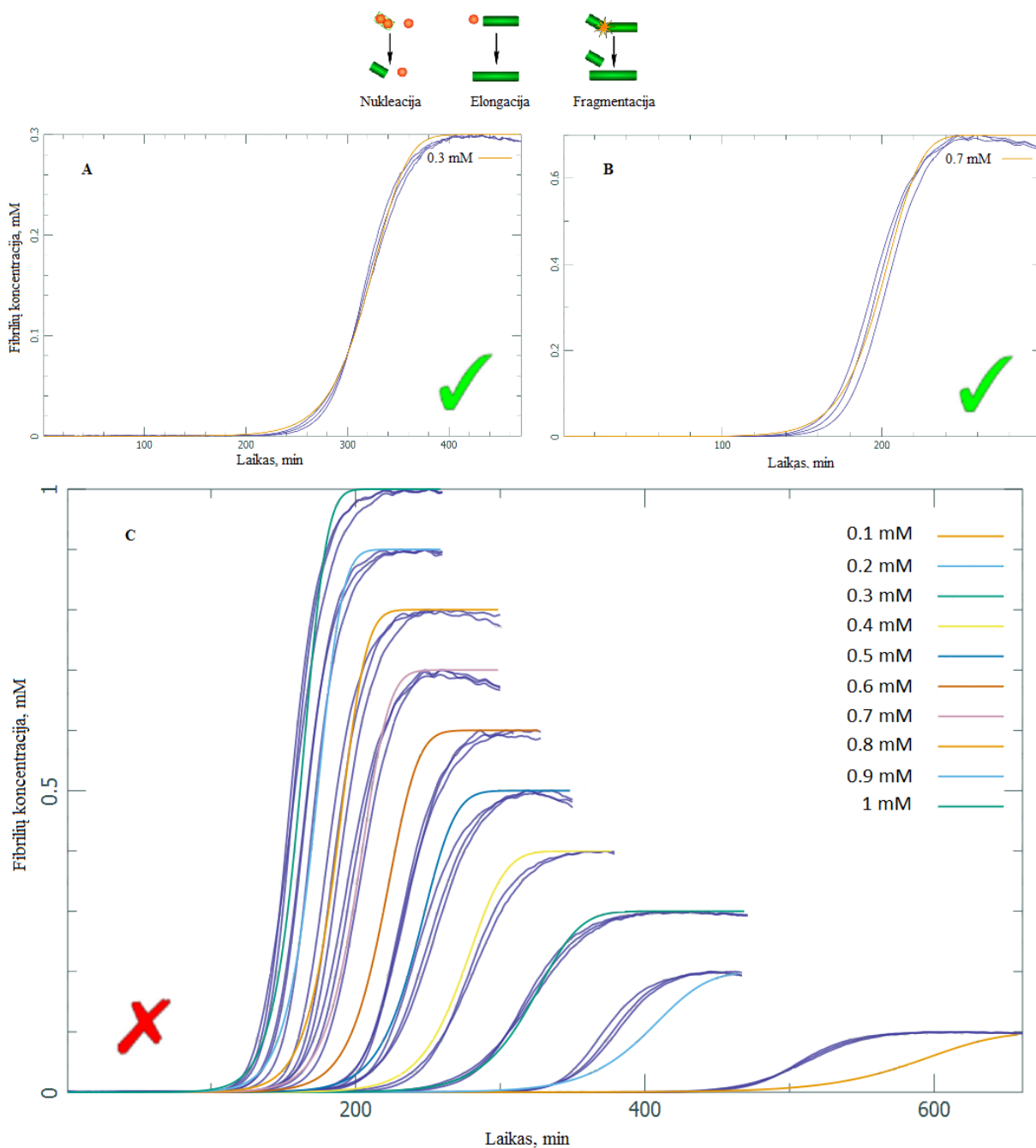
3.1.1. 1 modelis



3.1 pav. 1 modelis. Nukleacija ir elongacija. Mėlynos kreivės – eksperimentiniai rezultatai, geltona kreivė – sugluodinta kreivė.

Šis modelis akivaizdžiai netinka, nes gauta kreivė visiškai neatitinka eksperimentinių duomenų.

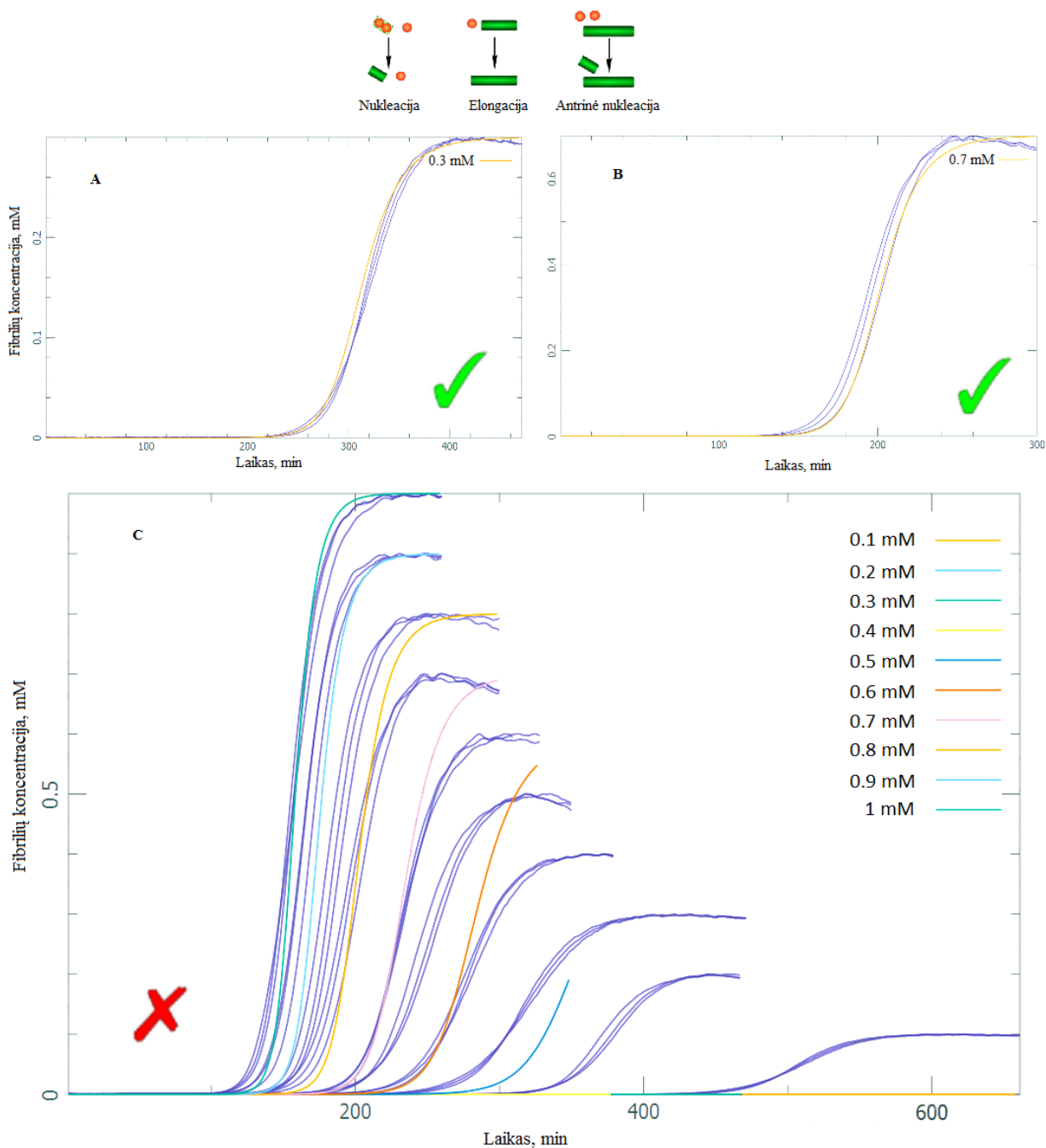
3.1.2. 2 modelis



3.2 pav. 2 modelis. Nukleacija, elongacija ir fragmentacija. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas. Tamsiai mėlynos spalvos kreivės yra eksperimentiškai gauti duomenys. Įvairių spalvų kreivės – sugluodintos kreivės.

Fragmentacijos proceso įvedimas padėjo labai tiksliai sugluodinti skirtingų koncentracijų kreives A ir B dalyse. C dalyje, kai kurios kreivės yra labai arba dalinai tikslios, tačiau prie 0,1 mM ir 0,2 mM fibrilizacija prasideda per vėlai, o prie 0,6 mM fibrilių koncentracijos – per anksti. Todėl šio modelio negalima naudoti kaip galutinio tinkamo rezultato.

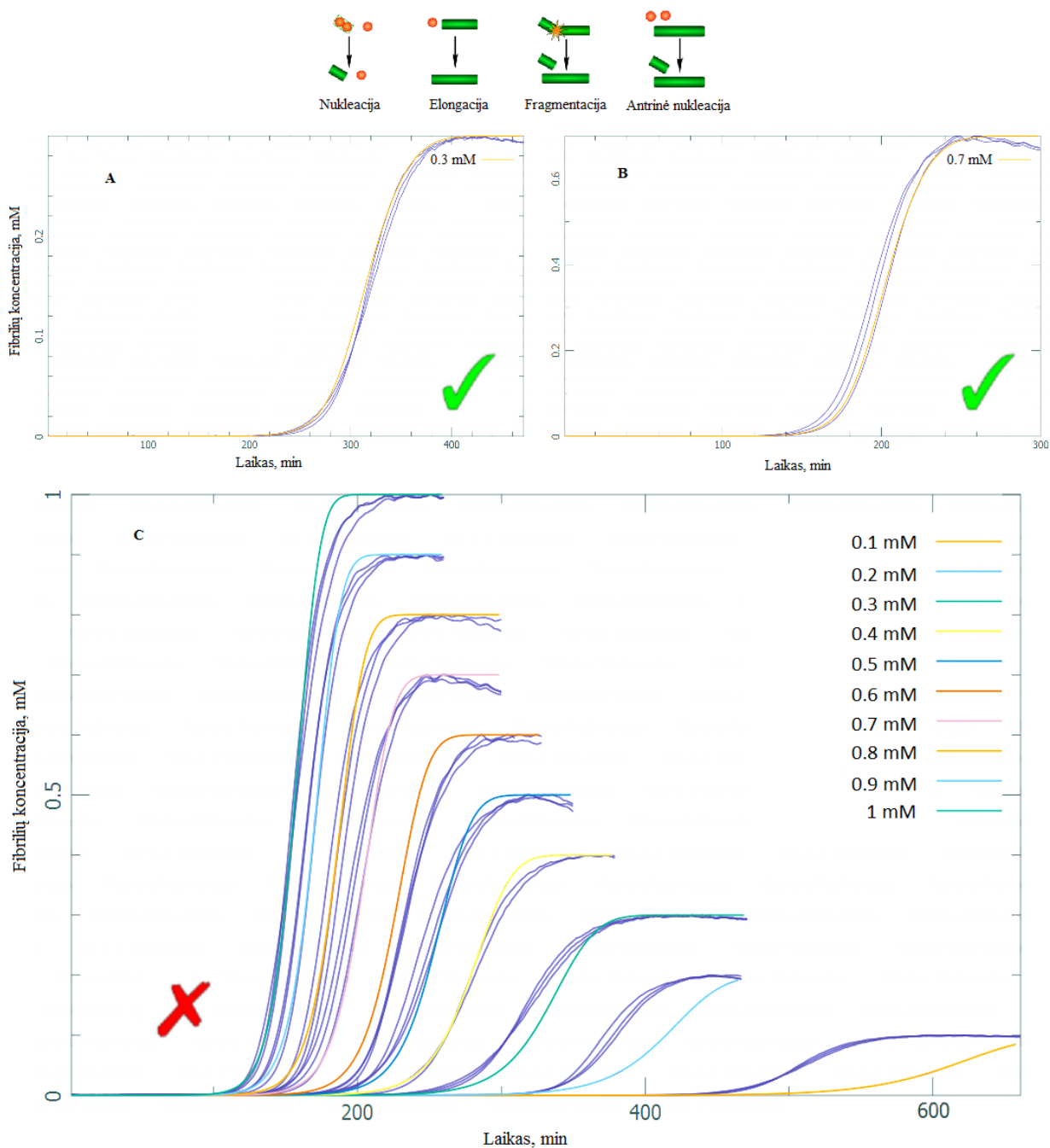
3.1.3. 3 modelis



3.3 pav. 3 modelis. Nukleacija, elongacija ir antrinė nukleacija. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas. Mėlynos spalvos kreivės yra eksperimentiniai rezultatai, įvairių spalvų kreivės – sugluodintos kreivės.

Šiuo atveju fragmentacijos procesas pakeičiamas į antrinę nukleaciją. Pasirinkus šį modelį ir naudojant bet kokios vienos koncentracijos eksperimentinius duomenis, gaunamos tiksliai sugluodintos kreivės, kurios matomos A ir B dalyse. Tačiau aprašant visų rezultatų kreives toks modelis visiškai netinkamas, nes fibrilių susidarymas prasideda per vėlai, todėl nei viena gauta kreivė neatitinka eksperimentiškai gautų kreivių.

3.1.4. 4 modelis



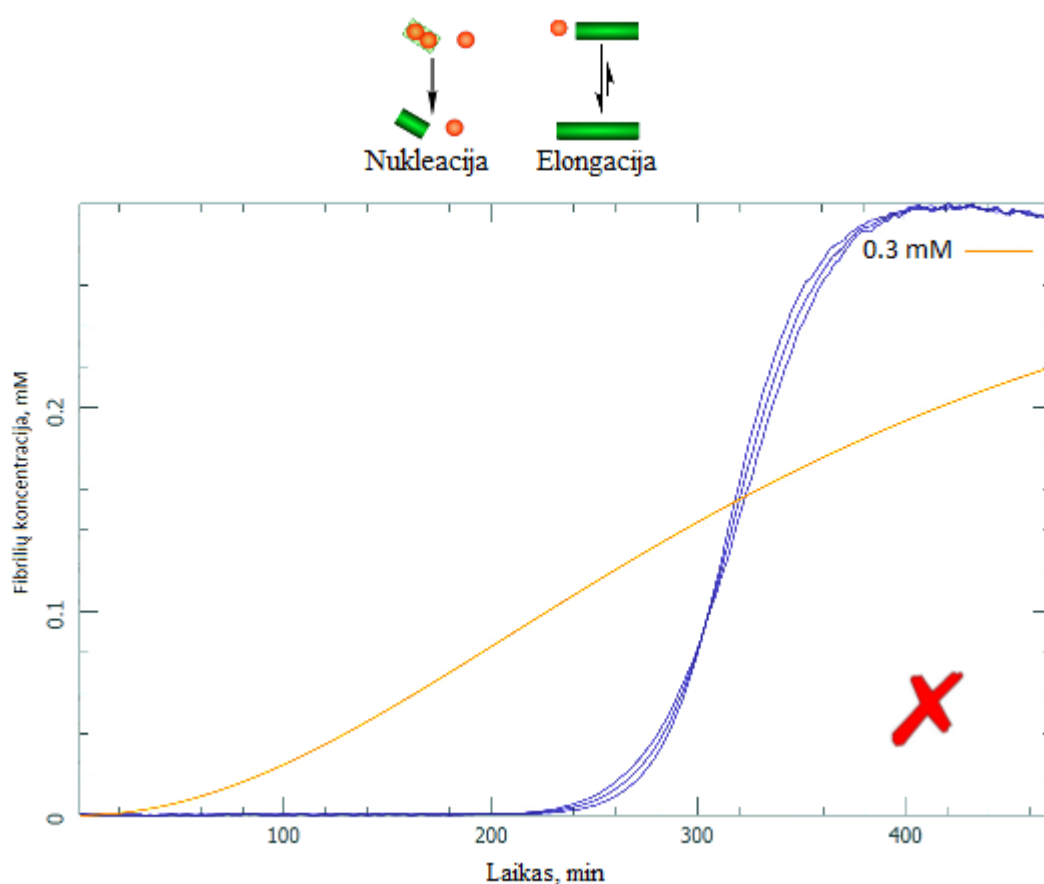
3.4 pav. 4 modelis. Nukleacijos, elongacijos, fragmentacijos ir antrinės nukleacijos procesų suvedimas į bendrą modelį. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas. Mėlynos spalvos kreivės yra eksperimentiniai duomenys, spalvotos kreivės – sugluodintos kreivės.

Sujungus visus procesus į vieną modelį, prie aukštų fibrilių koncentracijų, lyginant su antru modeliu, gaunamos tikslesnės kreivės. Tačiau prastai gluodina 0,3 mM koncentracijos rezultatus bei prie 0,1 mM ir 0,2 mM fibrilių susidarymas prasideda dar vėliau. Dėl šių priežasčių šis modelis taip pat nėra tinkamas.

3.2. Agregacija vyksta grįžtamais procesais

Šioje dalyje formuojamos tokios pačios modelių kombinacijos kaip ir 3.1 punkte, tačiau pakeičiamas elongacijos vyksmas. Manoma, jog monomeras jungdamasis prie branduolio ar fibrilės iš karto neprisitvirtina ir gali atkibti. Todėl naudojama (4) formulė kai elongacija aprašoma grįžtama lygtimi ir tokiu atveju įvedama dar viena greičio konstanta. Susidarę branduoliai neskyla į monomeras, todėl nukleacijos ir antrinės nukleacijos procesai nekeičiami. Fragmentacijos proceso atgalinė reakcija būtų lygi elongacijai, todėl šis vyksmas taip pat nėra keičiamas.

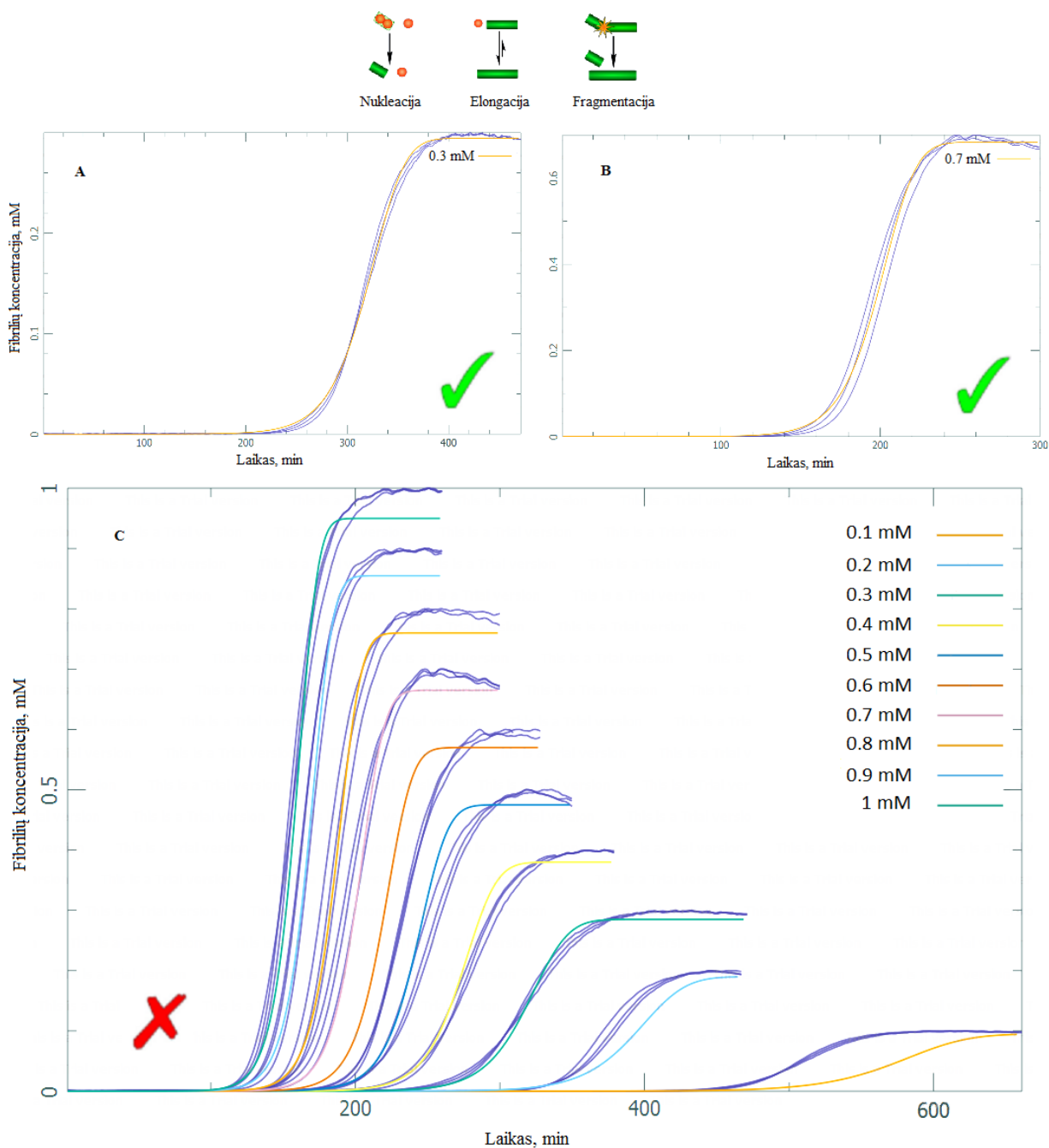
3.2.1. 5 modelis



3.5 pav. 5 modelis. Nukleacija ir elongacija. Mėlynos spalvos kreivės – eksperimentiniai duomenys, geltona spalva yra sugluoda kreivė.

Grįžtamoji elongacija nesuteikė jokio pokyčio šiame modelyje lyginant su pirmuoju modeliu. Kreivė atrodo identiška ir taip pat neatitinka eksperimentinių duomenų, todėl modelis nėra tinkamas.

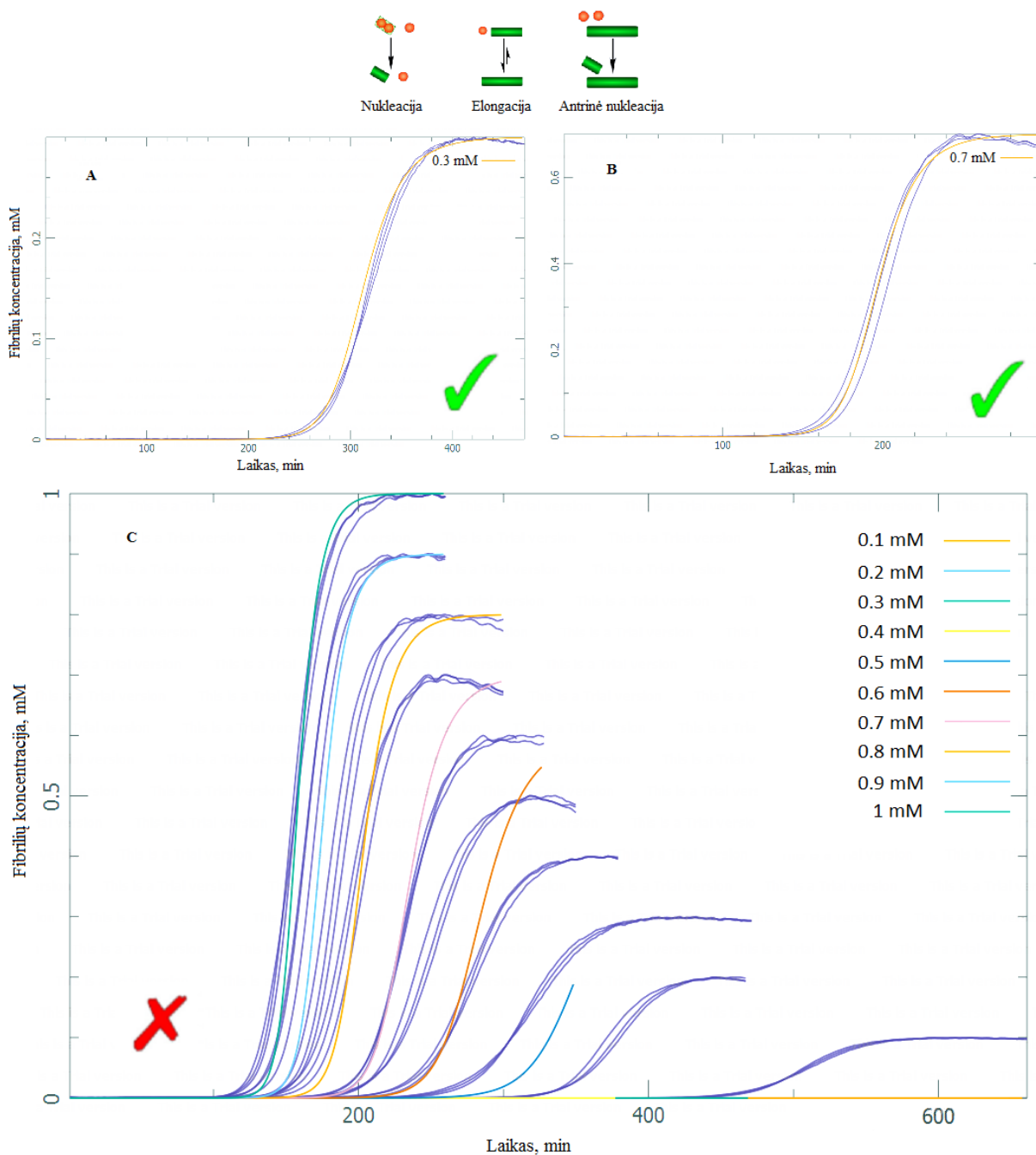
3.2.2. 6 modelis



3.6 pav. 6 modelis. Nukleacija, elongacija ir fragmentacija. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas. Tamsiai mėlynos spalvos kreivės yra eksperimentiškai gauti duomenys. Įvairių spalvų kreivės – sugluodintos kreivės.

A ir B dalyse pakankamai tiksliai sugluodintos skirtingų koncentracijų kreivės. C dalyje lyginant su antru modeliu, gautų sigmoidinių kreivių pradžia tiksliau atitinka eksperimentinius duomenis, tačiau kreivių maksimumo taškai nesiekia turimų koncentracijų. Taip pat, prie 0,1 mM ir 0,2 mM koncentracijų amiloidinės fibrilės susidaro per vėlai, o per anksti prie 0,6 mM fibrilių koncentracijos.

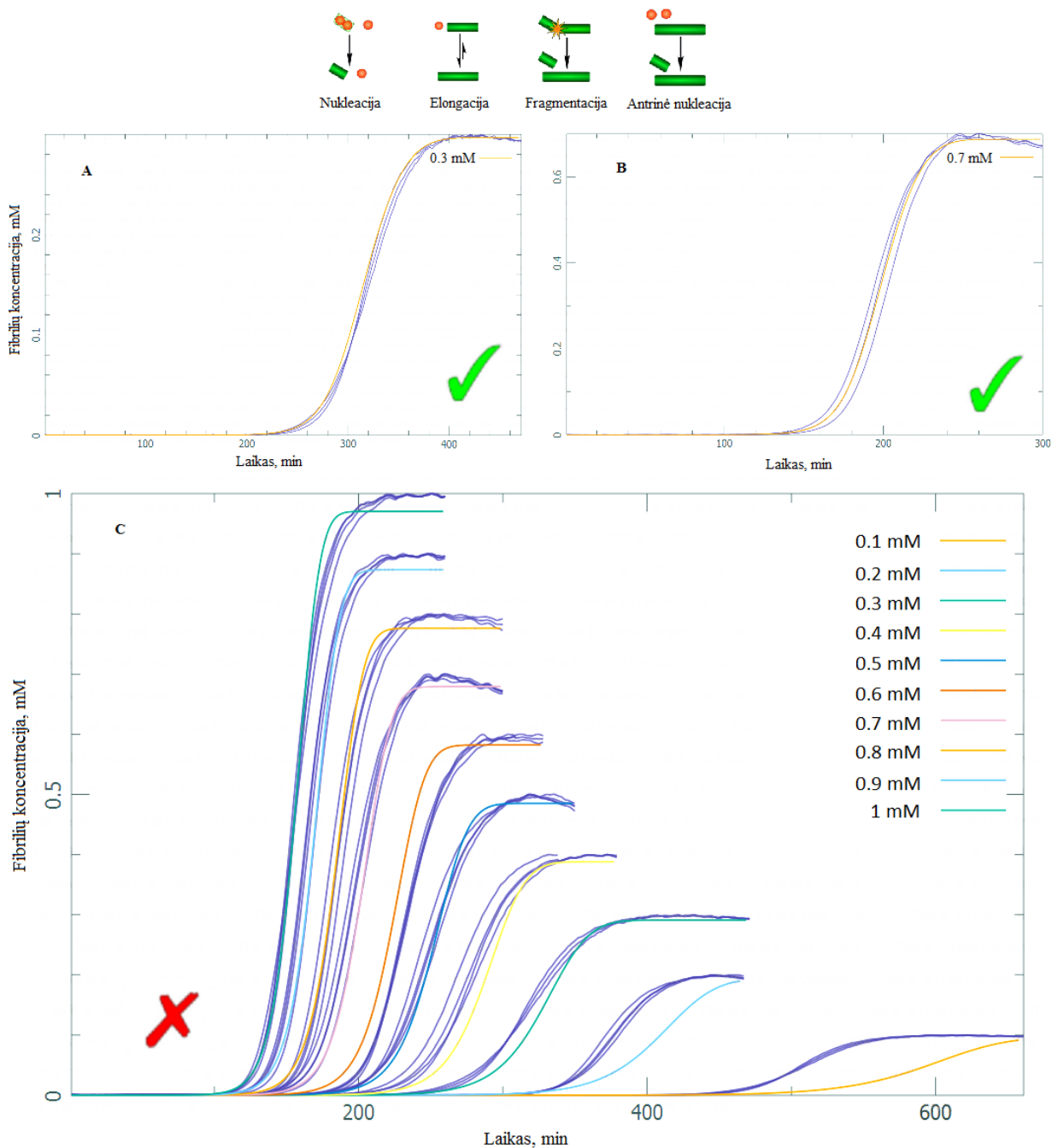
3.2.3. 7 modelis



3.7 pav. 7 modelis. Nukleacija, elongacija ir antrinė nukleacija. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas. Mėlynos spalvos kreivės yra eksperimentiniai rezultatai, įvairių spalvų kreivės – sugluodintos kreivės.

Šiame modelyje A ir B dalyse kreivės sugluodintos labai tiksliai, tačiau globalaus (visų turimų duomenų) gluodinimo grafike nei viena gauta kreivė neatitinka eksperimentinių duomenų, nes fibrilizacija prasideda per vėlai. Todėl šis modelis taip pat nėra tinkamas.

3.2.4. 8 modelis



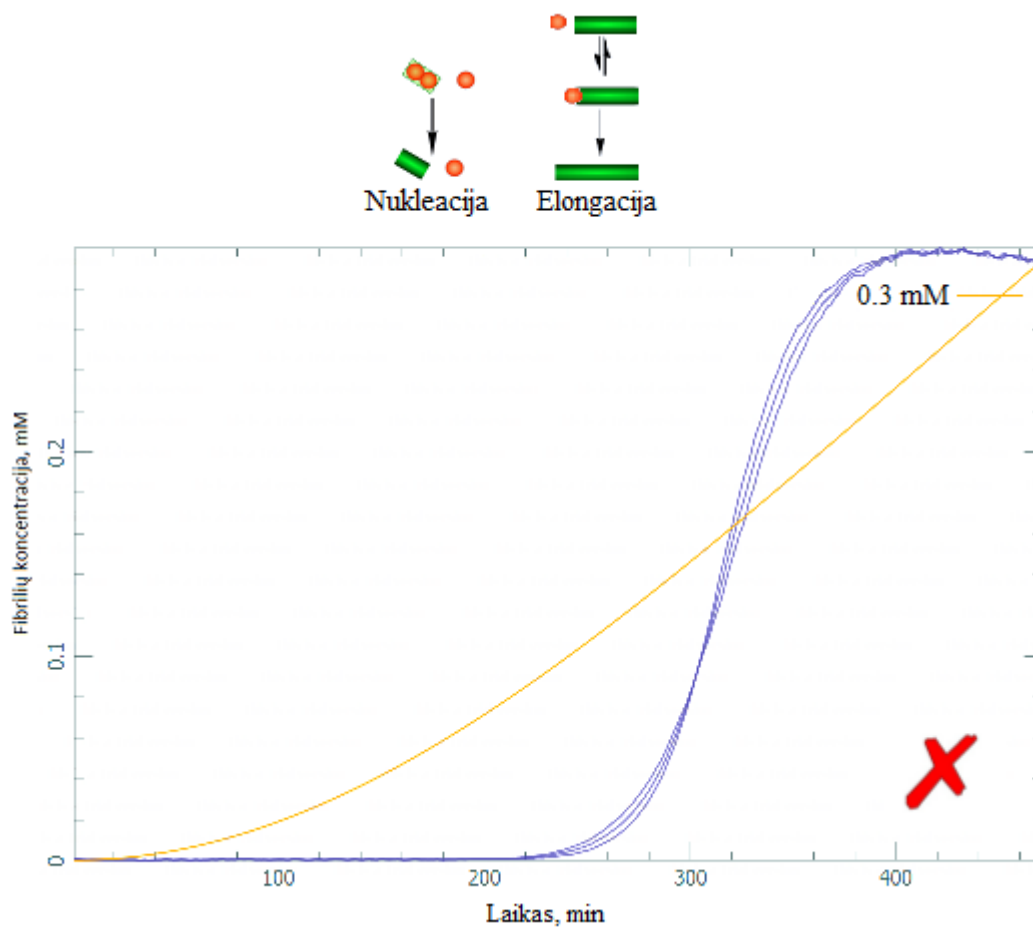
3.8 pav. 8 modelis. Nukleacijos, elongacijos, fragmentacijos ir antrinės nukleacijos procesų suvedimas į bendrą modelį. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas. Mėlynos spalvos kreivės yra eksperimentiniai duomenys, spalvotos kreivės – sugluodintos kreivės.

Pakankamai tiksliai yra sugluodintos kreivės A ir B dalyse, tačiau visų duomenų grafiko rezultatai labai panašūs į šeštąjį modelį, nes sugluodintų kreivių maksimumai neatitinka turimų koncentracijų. Šis modelis nėra tinkamas ir dėl to, kad fibrilizacija prasideda per vėlavai prie 0,1 mM, 0,2 mM ir 0,4 mM fibrilių koncentracijų, o prie 0,6 mM koncentracijos – per anksti.

3.3. Michaelis-Menten kinetikos įterpimas

Ši dalis skiriasi nuo kitų tik tuo, kad elongacija vykdoma dviem etapais naudojant Michaelis-Menten lygtį. Yra manoma, kad monomerui jungiantis prie fibrilės galo iš pradžių susidaro tarpinis fibrilės galo ir monomero kompleksas, kuris grįžtamosios reakcijos būdu gali skilti į pradinį komponentus, arba tiesioginės reakcijos kryptimi gali virsti ilgesne fibrile, todėl naudojamos (5) ir (6) formulės.

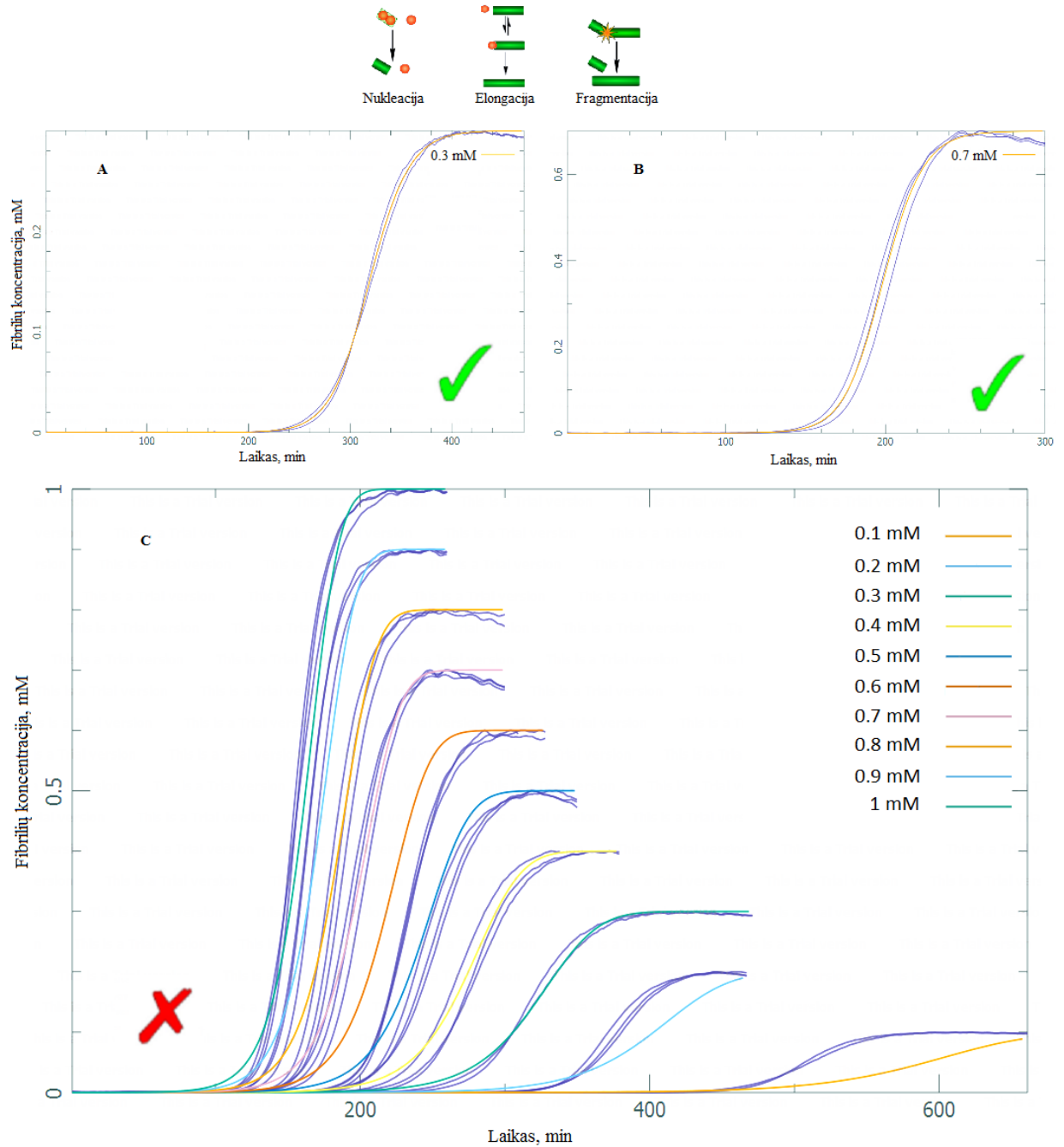
3.3.1. 9 modelis



3.9 pav. 9 modelis. Nukleacija ir elongacija. Mėlynos kreivės – eksperimentiniai rezultatai, geltona kreivė – sugluodinta kreivė.

Šiuo atveju gaunama kitokia kreivė negu pirmame ir penktame modeliuose, tačiau taip pat modelis netinkamas, nes kreivė visiškai neatitinka turimų eksperimentinių duomenų.

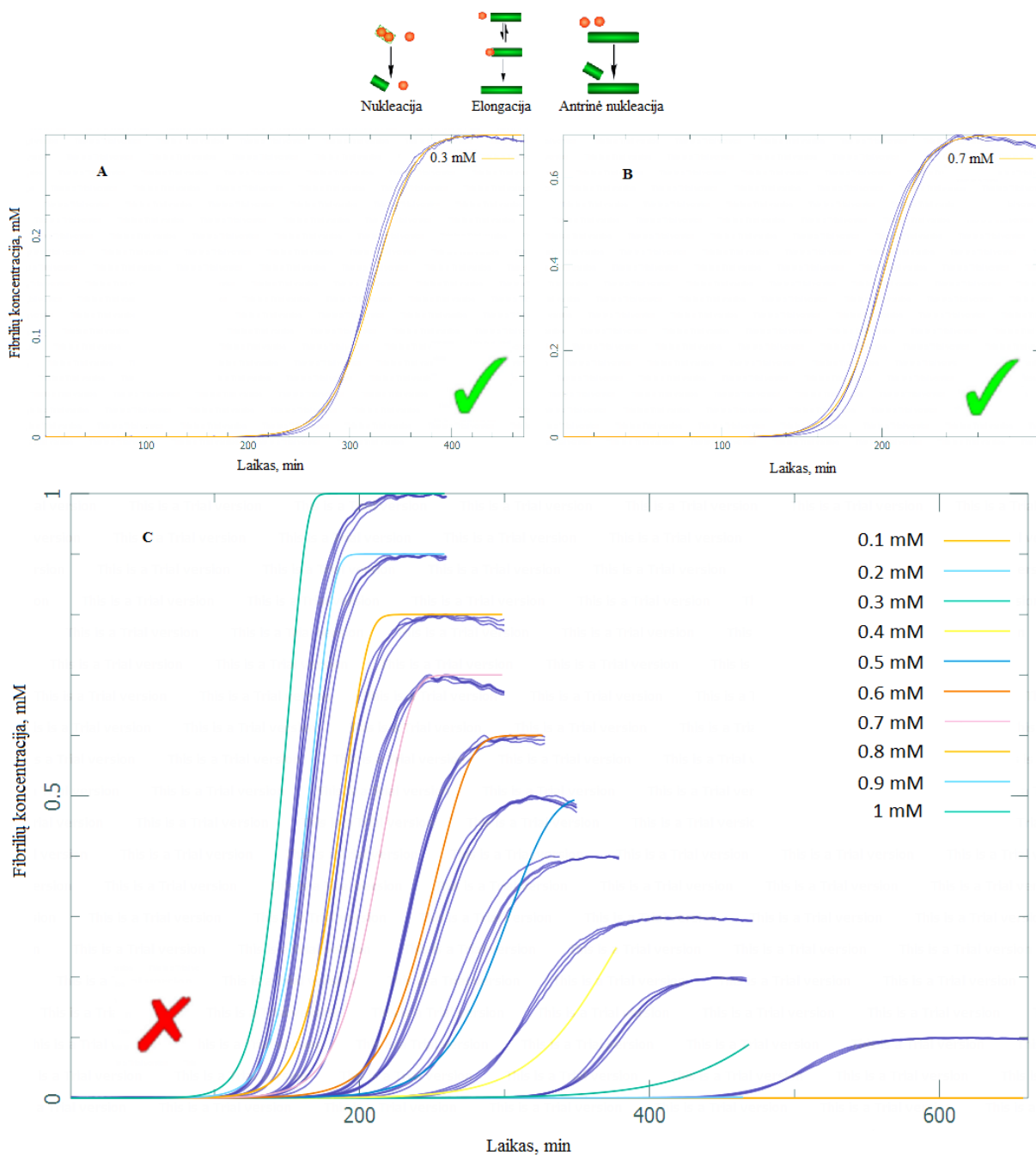
3.3.2. 10 modelis



3.10 pav. 10 modelis. Nukleacija, elongacija ir fragmentacija. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas. Tamsiai mėlynos spalvos kreivės – eksperimentiškai gauti duomenys. Įvairių spalvų kreivės – sugluodintos kreivės.

A ir B dalyse skirtingų koncentracijų kreivės sugluodintos labai tiksliai. Visų koncentracijų grafike gerai sugluodina tik 0,3 mM fibrilių koncentracijos kreivę, prie 0,1 mM koncentracijos fibrilių susidarymas prasideda per vėlai, o prie kitų koncentracijų fibrilizacijos procesai prasideda per anksti.

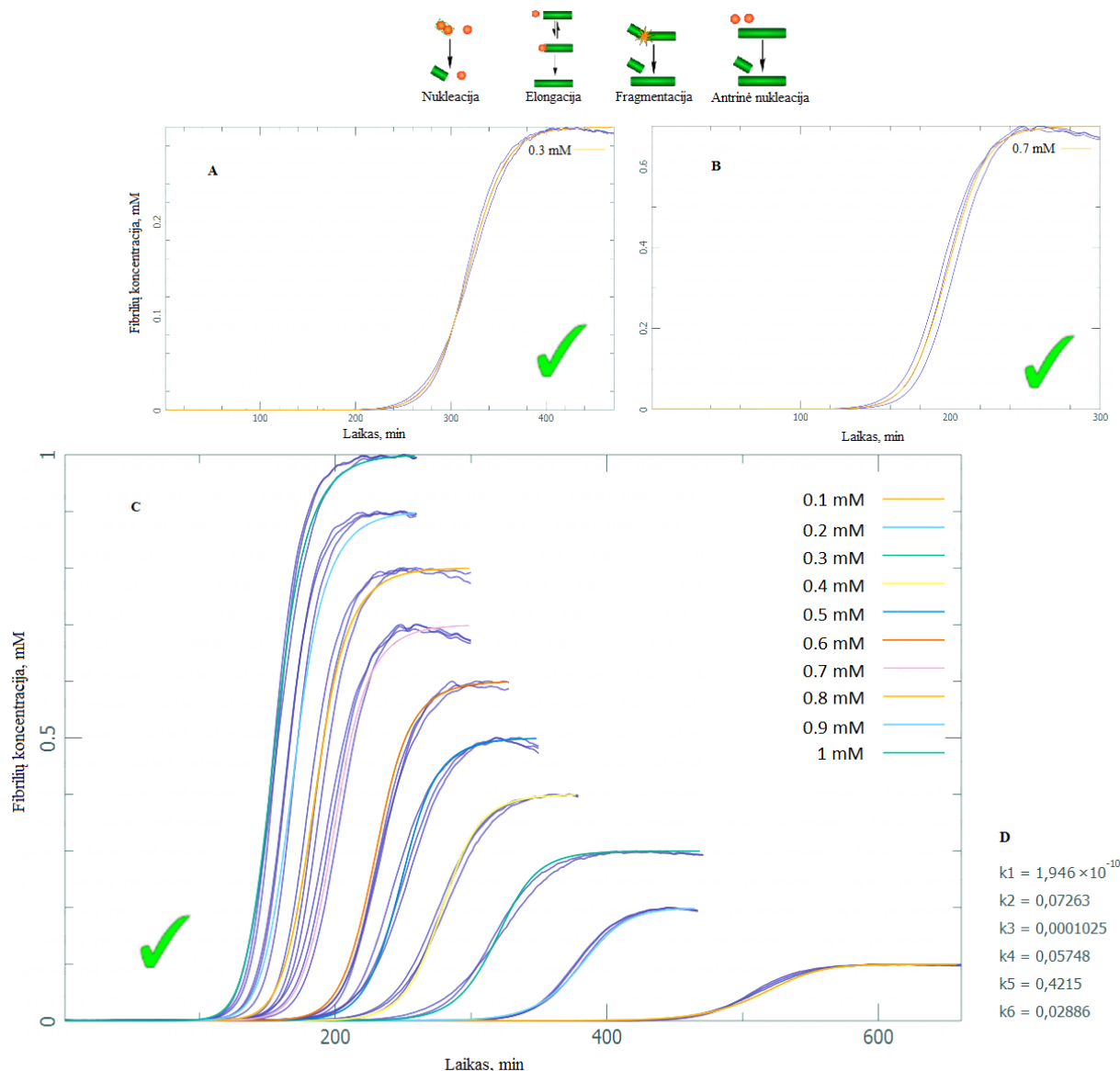
3.3.3. 11 modelis



3.11 pav. 11 modelis. Nukleacija, elongacija ir antrinė nukleacija. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas. Mėlynos spalvos kreivės yra eksperimentiniai rezultatai, įvairių spalvų kreivės – sugluodintos kreivės.

Šis modelis, kaip ir daugumoje modelių, A ir B dalyse skirtingas koncentracijas gluodina gerai. Visų koncentracijų grafike fibrilių susidarymas vyksta per greitai ir labai greitai užsibaigia spontaneo augimo kreivės kaip yra matoma prie 0,7 mM, 0,8 mM 0,9 mM ir 1 mM koncentracijų. Prie žemesnių koncentracijų kreivių fibrilizacija vyksta per lėtai.

3.3.4. 12 modelis



3.12 pav. 12 modelis. Nukleacijos, elongacijos, fragmentacijos ir antrinės nukleacijos procesų suvedimas į bendrą modelį. A – gluodinimui pasirinkta 0,3 mM fibrilių koncentracijos duomenys, B – gluodinimui pasirinkta 0,7 mM fibrilių koncentracijos duomenys, C – visų turimų duomenų gluodinimo grafikas, D – rModeler programoje esanti lentelė, kuri rodo sugluodintų procesų greičių konstantas.

Šis modelis kaip ir dauguma gali sugluodinti skirtingas fibrilių koncentracijas A ir B dalyse. C dalyje matoma, jog tik toks modelis sugeba gerai sugluodinti visas agregatų koncentracijas. Tai yra, kad gautos kreivės, atitinka eksperimentiškai gautų duomenų kreives. Todėl galima laikyti šį modelį tinkamu aprašyti amiloidinių fibrilių susidarymą įvairioms fibrilių koncentracijoms. D dalyje pateiktos kiekvieno proceso greičių konstantos. Kiekvieną kartą gluodinant kreives gaunamos šiek tiek skirtingos greičių konstantos, todėl naudojant šį modelį buvo gluodinama 10 kartų tam, kad apskaičiuoti reikšmių standartines paklaidas.

3.1 lentelė. Gautos greičių konstantų reikšmės.

Procesas	Greičio konstantos simbolis	Gauta reikšmė, mM ⁻¹ * min ⁻¹
Nukleacija	k ₁	1,946*10 ⁻¹⁰ ± 0,570*10 ⁻¹⁰
Monomero jungimasis prie fibrilės galo	k ₂	7,263*10 ⁻² ± 1,846*10 ⁻²
f _{gm} komplekso disociacija	k ₃	1,025*10 ⁻⁴ ± 0,332*10 ⁻⁴
f _{gm} komplekso virtimas ilgesne fibrile	k ₄	5,748*10 ⁻² ± 0,289*10 ⁻²
Fragmentacija	k ₅	4,215*10 ⁻¹ ± 0,798*10 ⁻¹
Antrinė nukleacija	k ₆	2,886*10 ⁻² ± 0,069*10 ⁻²

Nukleacijos greičio konstanta yra labai maža, bet tai yra geras rezultatas, nes procesas trunka ilgai. Maža greičio konstanta reiškia, kad procesas įsibegėja labai lėtai kaip yra matoma grafike (3.12 pav. C). F_{gm} komplekso disociacijos greičio konstanta nors ir mažesnė negu kitos greičio konstantos, tačiau ji taip pat turi įtakos fibrilių susidaryme, nes be jos sugluodinti grafikai atrodytų kaip 8-tame modelyje (3.8 pav. C). Kitų procesų greičių konstantos yra panašios ir palyginus su kitomis aukštos, todėl turi didžiausią įtaką amiloidinių fibrilių susidarymo mechanizme.

Išvados

1. Modeliai, kuriuose vyksta tik nukleacijos ir elongacijos procesai yra visiškai netinkami aprašyti amiloidinių fibrilių susidarymą.
2. Įterpiant fragmentacijos arba antrinės nukleacijos procesus įmanoma sugluodinti bet kokių fibrilių koncentracijų kreives, tačiau tie modeliai yra netinkami, nes vienu metu neapdoroja visų turimų duomenų.
3. Amiloidinių fibrilių susidarymui tinkamas tik vienas modelis, kurio metu vyksta visi 4 procesai bei elongacija aprašoma dviem žingsniais. Šis modelis yra tinkamas, nes puikiai aprašo 10 skirtingų koncentracijų kreivių vienu metu.

Literatūros sąrašas

1. BERHANU, W.M., HANSMANN, U.H.E. Stability of Amyloid Oligomers. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2014, vol. 96, p. 113-141.
2. BIANCALANA, M., KOIDE, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 2010, vol. 1804(7), p. 1405-1412.
3. CHATANI, E., OHNISHI, R., KONUMA, T., SAKURAI, K., NAIKI, H., GOTO, Y. Pre-Steady-State Kinetic Analysis of the Elongation of Amyloid Fibrils of β_2 -Microglobulin with Tryptophan Mutagenesis. *Journal of Molecular Biology*, 2010, vol. 400, p. 1057–1066.
4. CHITI, F., DOBSON, C.M. Protein Misfolding, Functional Amyloid and Human Disease. *Annual review of Biochemistry*, 2006, vol. 75, p. 333-366.
5. COHEN, S., VENDRUSCOLO, M., DOBSON, C.M., KNOWLES, T.P.J. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *Journal of Molecular Biology*, 2012; vol. 421(2-3), p. 160–171.
6. DIAPEDIA [internetinė svetainė], [cituota 2016-03-20]. Adresas: <http://www.diapedia.org/management/8104096136/insulin-glargine>
7. DUNN, M.F. Zink-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer – a review. *BioMetals*, 2005, vol. 18, p. 295-303.
8. DZWOLAK, W., GRUDZIELANEK, S., SMIRNOVAS, V., RAVINDRA, R., NICOLINI, C., JANSEN, R., LOKSZTEJN, A., POROWSKI, S., WINTER, R. Ethanol-Perturbed Amyloidogenic Self-Assembly on Insulin: Looking for Origins of Amyloid Strains. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, p. 8948-8958.
9. DZWOLAK, W., SMIRNOVAS, V., JANSEN, R., WINTER, R. Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner: An FT-IR spectroscopy study. *Protein Science*, 2004, vol. 13, p. 1927-1932.
10. FODERÀ, V., LIBRIZZI, F., GREONNING, M., VAN DE WEERT, M., LEONE, M. Secondary nucleation and accessible surface in insulin amyloid fibril formation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, vol. 112(12), p. 3853-3858.
11. GREONNING, M., NORRMAN, M., FLINK, J.M., VAN DE WEERT, M., BUKRINSKY, J.T., SCHLUCKEBIER, G., FROKJAER, S. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 2007, vol. 159(3), p. 483-497.
12. KHURANA, R., COLEMAN, C., IONESCU-ZANNETI, C., CARTER, S.A., KRISHNA, V., GROVER, R.K., ROY, R., SINGH, S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 2005, vol. 151(3), p. 229-238.

13. KNOWLES, T.P.J., WAUDBY, C.A., DEVLIN, G.L., COHEN, S.I.A., AGUZZI, A., VENDRUSCOLO, M., TERENTJEV, E.M., WELLAND, M.E., DOBSON, C.M. An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. *Science*, 2009, vol. 326, p. 1533-1537.
14. KREBS, M.R.H., BROMLEY, E.H.C., DONALD, A.M. The binding of thioflavint-T to amyloid fibrils: localization and implications. *Journal of Structural Biology*, 2005, vol. 149, p. 30-37.
15. LEE, C-C., NAYAK, A., SETHURAMAN, A., BELFORT, G., MCRAE, G.J. A Three-Stage Kinetic Model of Amyloid Fibrillation. *Biophysical Journal*, 2007, vol. 92, p. 3448-3458.
16. MEISL, G., KIRKEGAARD, J.B., AROSIO, P., MICHAELS, T.C.T., VENDRUSCOLO, M., DOBSON, C.M., LINSE, S., KNOWLES, T.P.J. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nature America*, 2016, vol. 11, p. 252-272.
17. MERLINI, G., BELLOTI, V. Molecular mechanisms of Amyloidosis. *The New England Journal of Medicine*, 2003, vol. 349, p. 583-596.
18. MILTO, K., MICHAILOVA, K., SMIRNOVAS, V. Elongation of Mouse Prion Protein Amyloid-Like Fibrils: Effect of Temperature and Denaturant Concentration. *Plos One*, 2014, vol. 9, p. 1-5.
19. NIELSEN, L., FROKJAER, S., CARPENTER, J.F., and BRANGE, J. Studies of the structure of insulin fibrils by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy. *Journal of pharmaceutical science*, 2001, vol. 90, p. 29–37.
20. QIAGEN [internetinè svetainè], cituota [2016-03-30]. Adresas: <https://www.qiagen.com>
21. RAMBARAN, R.N., SERPELL, L.C. Amyloid fibrils Abnormal protein assembly. *Landes Bioscience*, 2008, vol. 2:3, p. 112-117.
22. SIPE, J. D., COHEN, A. S. History of the Amyloid Fibril. *Journal of Structural Biology*, 2000, vol. 130, p. 88–98.
23. SUNDE, M., SERPELL, L.C., BARTLAM, M., FRASER, P.E., PEPYS, M.B., BLAKE, C.C.F. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Journal of Molecular Biology*, 1997, vol. 273, p. 729-739.
24. UBICALC [internetinè svetainè], cituota [2016-04-13]. Adresas: <http://www.ubicalc.eu>
25. WILLIAM, J., LENNARZ, M., LANE, D., WETZEL, R. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. University of Tennessee, Knoxville, TN, USA, 2013, p. 100-104.