



VILNIAUS GEDIMINO TECHNINIS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Ieva Kunigėlytė

**VIŠTOS KIAUŠINIO BALTAMO LIZOCIMO AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ
SUSIDARYMO TYRIMAS**

Hen Egg White Lysozyme Amyloid-Like Fibrils Formations Studies

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijų studijų kryptis

Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

Ieva Kunigėlytė

**VIŠTOS KIAUŠINIO BALTAMO LIZOCIMO AMILOIDINIŲ FIBRILIŲ
SUSIDARYMO TYRIMAS**

Hen Egg White Lysozyme Amyloid-Like Fibrils Formations Studies

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 612J76001

Biotechnologijų studijų kryptis

Vadovas dr. Vytautas Smirnovas

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO (PROJEKTO)
UŽDUOTIS**

.....Nr.
Vilnius

Studentei: **Ieva Kunigėlytė**

Baigiamojo darbo (projekto) tema: **Vištos kiaušinio baltymo lizocimo amiloidinių fibrilių susidarymo tyrimas**

patvirtinta 2014 m. lapkričio mėn. 3 d. dekanų potvarkiu Nr. 321fm

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2015 m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

Ištirti spontaniinę vištos kiaušinio baltymo lizocimo agregaciją, esant skirtingoms sąlygoms.

Baigiamojo bakalauro darbo (projekto) vadovas:

Vadovas

(Parašas)

dr. Vytautas Smirnovas

Užduotį gavau

Ieva Kunigėlytė

.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN

Egz. sk.

Data-....-....

Pirmosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas 3

Pavadinimas **Vištos kiaušinio baltymo lizocimo amiloidinių fibrilių susidarymo tyrimas**

Autorius **Ieva Kunigėlytė**

Vadovas **dr. Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Neurodegeneracinės ligos, kaip Alzheimerio ar Parkinsono, bei prioninės ligos yra siejamos su amiloidinių fibrilių formavimusi. Fibrilių susidarymo metu baltymo molekulės sąveikauja tarpusavyje ir sudaro linijinius, biologiškai neaktyvius agregatus. Nepaisant ligų skirtumų, visi amiloidiniai agregatai pasižymi panašia morfologija – sudaryti iš pasikartojančių β -klosčių, išsidėsčiusių statmenai fibrilės ašiai.

Šiame darbe buvo bandoma išsiaiškinti kaip skirtingos aplinkos sąlygos (tokios kaip pH, denatūrantai, joninė jėga) veikia vištos kiaušinio baltymo lizocimo (HEWL) spontaninį amiloidinių fibrilių susidarymą. Jo agregacijos kinetika buvo stebima fluorescencinės spektroskopijos metodu, kaip žymenį naudojant amiloidinėms struktūroms specifiską dažą tioflaviną T (ThT).

Spontaninės agregacijos tyrimai buvo atliekami skirtingose temperatūrose tam, kad būtų galima sužinoti fibrilizacijos proceso aktyvacijos energiją. Siekiant nustatyti baltymo būseną skirtingose denatūrantų koncentracijose, atlikti diferencinės skenavimo kalorimetrijos tyrimai.

Darbo metu nustatyta, kad lizocimas gali agreguoti į amiloidines struktūras plačiame pH ir denatūrantų koncentracijų ruože. Agregacijos laikas trumpesnis aukštesnėje temperatūroje ir mažesniame pH. Trumpiausiai agregacija trunka vidutinėse guanidino hidroklorido (GuHCl) koncentracijose. Apskaičiavus lizocimo spontaninės agregacijos aktyvacijos energijas nustatyta, kad jos smarkiai priklauso nuo GuHCl koncentracijos. Iškelta hipotezė, kad ši priklausomybė atsiranda dėl lizocimo denatūracijos. Ji buvo patvirtinta atlikus kalorimetrinius tyrimus.

Siekiant išsiaiškinti joninės jėgos įtaką agregacijai atlikti bandymai su skirtingomis NaCl koncentracijomis, kaip denatūrantą naudojant karbamidą. Rezultatai parodė, kad joninė jėga pagreitina agregaciją.

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

Darbo apimtis 48 p. teksto be priedų, 34 paveikslų, 2 lentelės, 40 bibliografinis šaltiniai

Prasminiai žodžiai: Agregacija, aktyvacijos energija, amiloidas, lizocimas, kinetika, 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 program Final Thesis 3

Title **Hen Egg White Lysozyme Amyloid-Like Fibrils Formations Studies**
Author **Ieva Kunigėlytė**
Academic supervisor **dr. Vytautas Smirnovas**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Amyloid fibril formation is associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's as well as prion disease. Fibrils are formed of protein monomers which join into linear biologically inactive aggregates. Aggregates of amyloids share the same morphology. It consists of beta sheets that are perpendicular to the fibril axis.

Effect of environment (pH, denaturants, ionic strength) on spontaneous amyloid-like fibril formation of hen egg white lysozyme (HEWL) was investigated in this work. The kinetics of aggregation was studied using Thioflavin T (ThT) fluorescence assay

In order to measure activation energies of fibril formation, experiments were carried out at different temperatures. Furthermore, differential scanning calorimetry experiments were carried out to investigate the fold of the protein in diverse denaturant concentrations.

It was found that lysozyme is able to form amyloid-like aggregates in various pH conditions and denaturant concentrations. The time of aggregation are shorter at higher temperature and/or pH less. The fastest aggregation is at moderate guanidine hydrochloride (GndHCl) concentrations. Activation energy of lysozyme spontaneous aggregation is strongly dependent on GndHCl concentration. It was hypothesized that this dependency arises due to unfolding of lysozyme. The hypothesis was confirmed by calorimetric studies.

The effect of ionic strength was checked at different sodium chloride concentrations using urea as denaturant. It was shown that ionic strength increases the rate of aggregation.

The thesis consists of six parts: introduction, literature overview, materials and methods, results and discussion, conclusions and glossary

48 pages of text without attachments, 34 images, 2 tables, 40 bibliographic sources.

Keywords: Activation energy, aggregation, amyloid, lysozyme, kinetic, thioflavin T.

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Ieva Kunigėlytė, 20112471

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIf-11

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2015 m. gegužės 17 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Vištos kiaušinio baltymo lizocimo amiloidinių fibrilių susidarymo tyrimai.“ patvirtintas 2014 m. lapkričio 3 d. dekanų potvarkiu Nr. 321 fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Mano darbo vadovas Vytautas Smirnovas.

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

_____ Ieva Kunigėlytė

(Vardas ir pavardė)

Turinys

ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Amiloidai	10
1.1.1. Ligos, susijusios su netaisyklingu baltymų susivyniojimu.....	10
1.1.2. Fibrilių susidarymo mechanizmas	13
1.2. Vištos kiaušinio baltymo lizocimo agregacija	15
1.3. Amiloidinių fibrilių nustatymas Tioflavinu T	16
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	19
2.1. Naudoti reagentai ir medžiagos	19
2.2. Naudota laboratorinė įranga.....	19
2.3. Metodai	19
2.3.1. Fluorescencijos matavimas.....	19
2.3.2. Tirpalų ruošimas spontaniškos HEWL agregacijos tyrimams	19
2.3.3. Tirpalų ruošimas diferencinio skenavimo kalorimetrijos tyrimams.....	21
2.3.4. Elektroninės mikroskopijos mėginiai	21
2.3.5. Duomenų analizė	22
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	24
3.1. Spontaniškos agregacijos su GndHCl tyrimas.....	24
3.1.1. Spontaniškos agregacijos laiko priklausomybė nuo pH ir GndHCl koncentracijos	24
3.1.2. Aktyvacijos energijos priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos.....	32
3.1.3. Diferencinė skenavimo kalorimetrija	33
3.1.4. Elektroninės mikroskopijos rezultatai	34
3.2. Spontaniškos agregacijos su karbamidu tyrimas	35
3.2.1. Spontaniškos agregacijos laiko priklausomybė nuo karbamido koncentracijos ir joninės jėgos	35
3.2.2. Aktyvacijos energijos priklausomybė nuo karbamido koncentracijos	42
3.2.3. Diferencinė skenavimo kalorimetrija	43
IŠVADOS.....	45
LITERATŪRA	46

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

DSC – diferencinė skenavimo kalorimetrija

GndHCl – guanidino hidrochloridas

HEWL – vištos kiaušinio baltymo lizocimas

Ig - imunoglobulinas

PB – fosfatinis buferis

PrP^C - natyvus priono baltymas (angl. *cellular*)

PrP^{SC} - infektyvi priono baltymo forma (angl. *scrapie*)

ThT – tioflavinas T

ĮVADAS

Neurodegeneracinės ligos, kaip Alzheimerio ar Parkinsono, bei prioninės ligos yra siejamos su amiloidinių fibrilių formavimusi. Nepaisant ligų skirtumų, visi amiloidiniai agregatai pasižymi panašia morfologija – sudaryti iš pasikartojančių β -klosčių, išsidėsčiusių statmenai fibrilės ašiai. Šie agregatai yra ne šakotos struktūros, maždaug 10 nm pločio ir 0,1 – 10 μ m ilgio (Zhang et al. 2009). Manoma, kad *in vitro* beveik visi baltymai ir peptidai gali agreguoti į fibrilinius agregatus, nuo netvarkingų amorfinių agregatų iki labai tvarkingų β -klostytų struktūrų (Chiti et al. 2006).

Žmogaus lizocimas siejamas su patologine agregacija *in vivo* (Chiti et al. 2006). Vištos kiaušinio baltymo lizocimo (HEWL) tretinė struktūra ir baltymo funkcija yra beveik identiška žmogaus lizocimui. Dėl šio panašumo, nedidelio paties baltymo dydžio (14kDa) ir puikaus tirpumo vandeniniuose tirpaluose, vištos kiaušinio baltymo lizocimas naudojamas kaip modelinis baltymas lizocimo amiloidogenezės tyrimuose (Swaminathan et al. 2011). Lizocimo fibrilių formavimasis yra fizinis procesas. Jo metu nenatūralios formos lizocimo molekulės sąveikauja tarpusavyje ir sudaro linijinius, biologiškai neaktyvius agregatus (Nielsen et al. 2001).

Kaip ir kiekvieną reakciją, amiloidinių fibrilių susidarymą charakterizuoja kinetiniai ir termodinaminiai parametrai. Tačiau iki šiol nėra tiksliai žinoma, kodėl susidaro amiloidinės fibrilės, kokios sąlygos tai lemia. Todėl šiame darbe bus aiškinamasi skirtingų sąlygų įtaka savaiminei lizocimo agregacijai.

Darbo tikslas – atlikti vištos kiaušinio baltymo lizocimo agregacijos tyrimus.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti lizocimo spontaninės agregacijos bandymus skirtingomis sąlygomis.
2. Ištirti pH ir denatūranto (GndHCl) įtaką fibrilių susidarymui.
3. Ištirti joninės jėgos ir denatūranto (karbamido) įtaką fibrilių susidarymui.
4. Apskaičiuoti fibrilių susidarymo aktyvacijos energiją.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Amiloidai

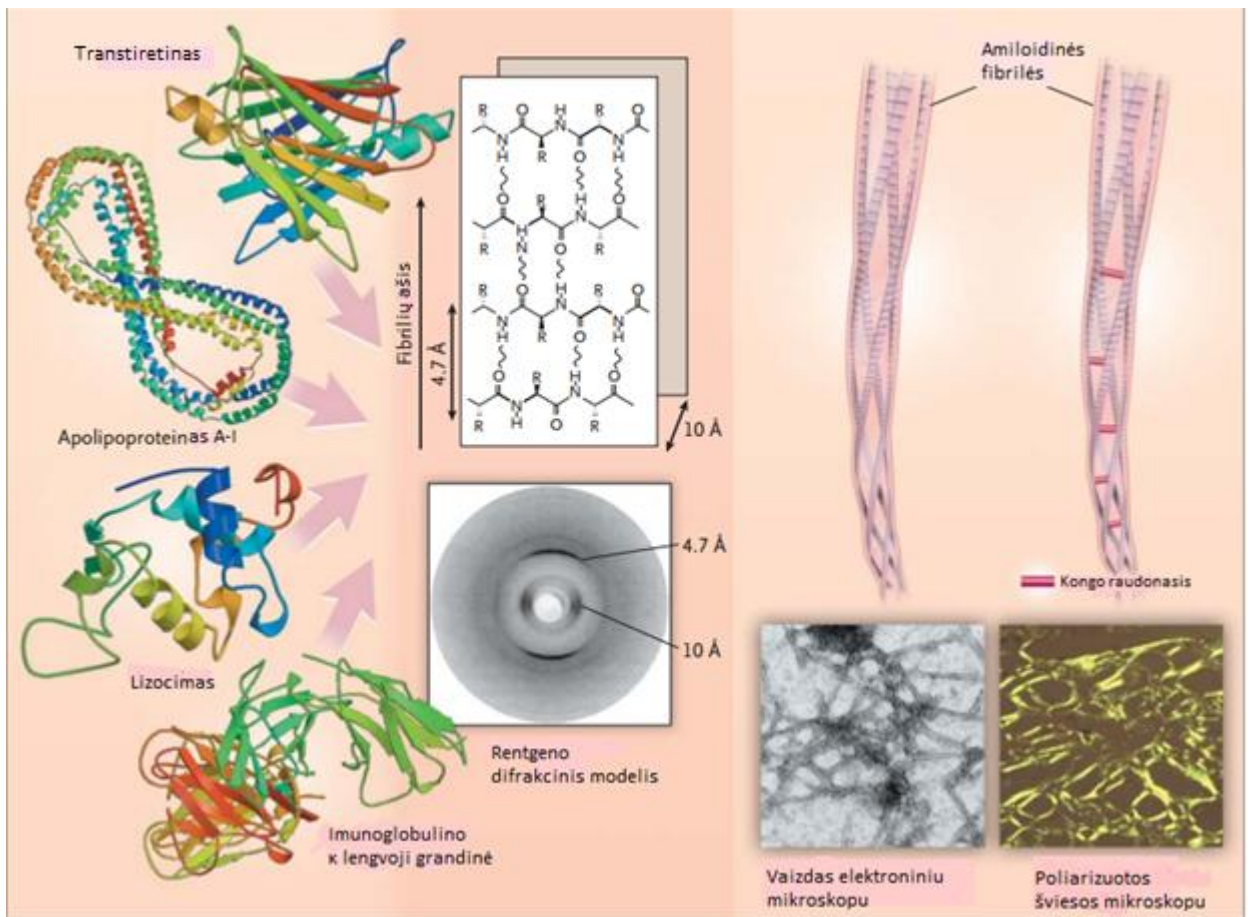
Terminą „amiloidas“ 1838 metais sugalvojo vokiečių botanikas Matthias Jakobas Schleidenas, norėdamas apibūdinti įprastą augalų sudėtį (Swaminathan *et al.*, 2011). Rudolfas Virchowas 1854 metais šį terminą pavartojo medicininėje literatūroje aprašydamas iš smegenų išskirtų darinių reakciją su jodo tirpalu ir sieros rūgštimi. Abiem atvejais mėginiai nusidažydavo mėlynai – violetine spalva. Šios į celiuliozę panašios struktūros buvo pavadintos amiloidais [gr. amylo-, lot. amylo- – krakmolas] (Maji *et al.*, 2009; Sipe and Cohen, 2000). 1859 metais Fridrichas ir Kekulė remdamiesi didele azoto koncentracija amiloiduose, padarė išvadą, jog ši masė yra baltymai, o ne angliavandeniai, kaip galvota iki tol (Sipe and Cohen, 2000).

Nuo XXa. amžiaus amiloidai apibūdinami trimis požymiais (Makin and Serpell, 2005): specifine sąveika su Kongo raudonuojančiu dažu (poliarizuotoje šviesoje matomos žalios spalvos fibrilės (Puchtler and Sweat, 1965)); būdinga struktūra (aukštos raiškos elektronine mikroskopija vizualizuojamos amiloidinės fibrilės yra tiesios, nesišakojančios, 70-120 Å diametro, sudarytos iš 20-35 Å pločio protofilamentų (Sipe and Cohen, 2000)); β-klostyta polipeptidinės grandinės struktūra (β-klosčių išsidėstymas statmenas fibrilės ašiai nustatomas rentgeno spindulių difrakcijos analize (Marshall and Serpell, 2009)).

Amiloidais yra vadinami netaisyklingos konformacijos baltymų suformuoti fibriliniai agregatai (Sipe and Cohen, 2000). Daugelis polipeptidų, kurie skiriasi savo dydžiu, aminorūgščių seka ar antrine struktūra, esant tam tikroms sąlygoms gali formuoti panašios morfologijos amiloidines fibriles. Šis procesas susijęs su konkrečiomis mutacijomis gene, baltymų sintezės sutrikimais, temperatūros ar pH pasikeitimais, neįprasta sąveika su metalų jonais ar cheminėmis modifikacijomis (Stefani and Dobson, 2003).

1.1.1. Ligos, susijusios su netaisyklingu baltymų susivyniojimu

Buvo nustatyta, kad mažiausiai 23 skirtingi baltymai gali agreguoti *in vivo*. Jų amiloidogenezė, kliniškai skirtingomis sąlygomis, siejama su daugeliu ligų. Šie baltymai gali sudaryti fibriles su panašia struktūra ir vienodomis dažymosi savybėmis (1.1 pav.). Su tvarkingomis netaisyklingai susisukusių baltymų sancaupomis ląstelės viduje ar už jos ribų, siejamos ligos vadinamos amiloidozėmis. Visi su amiloidozėmis susiję baltymai pasižymi struktūriniu kintamumu ir gebėjimu pakeisti konformaciją į bendrą β – klostytą fibrilių struktūrą (1.1 pav.) (Merlini and Bellotti, 2003).



1.1 pav. Struktūrinės amiloidų savybės. Kairėje pavaizduotos lizocimo, transtiretino, apolipoproteino A-I ir imunoglobulino κ lengvosios grandinės trimatės struktūros. Viduryje vaizduojamas amiloidinių fibrilių rentgeno difrakcijos vaizdas, būdingas β -klostytam struktūriniam motyvui. Gretimos β – klostės jungiasi sudarydamos profibrilės. Dešinėje parodyta, kaip kelios (4–6) profibrilės susivynioja ir sudaro amiloidines fibriles. Elektroniniu mikroskopu ($\times 100,000$) nustatytas, jų skersmuo, 7,5–10 nm. Į fibrilių struktūrą gali įsiterpti dažas – Kongo raudonasis ir taip įgalinamas fibrilių stebėjimas poliarizuotos šviesos mikroskopu (pritaikyta iš Merlini and Bellotti, 2003)

Amiloidozes galima suskirstyti į tris grupes:

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

1 lentelėje pateikiamos kelios amiloidozės ir jas sukeltantys baltymai ar peptidai.

1 lentelė. Dažniausios amiloidozės ir jas sukiantys baltymai ar peptidai (pritaikyta iš Stefani and Dobson, 2003).

Liga	Agreguojantis komponentas
Alzheimerio liga	A β peptidas, tau baltymas
Kempinligė	Prionas
Parkinsono liga	α -sinukleinas
Pirminė sisteminė amiloidozė	Ig lengvosios grandinės arba jų fragmentai
Antrinė sisteminė amiloidozė	Serumo amiloidas A
II tipo diabetas	Amilino fragmentas
Hantingtono liga	Hantingtinas
Paveldima sisteminė amiloidozė	Lizocimas
Injekcinė amiloidozė	Insulinas

Dažniausiai susirgimai atsiranda savaime, nors užregistruotos ir jų paveldimos formos. Kitos ligos yra tik paveldimos (atsiranda dėl mutacijų).

1.1.1.1. Prioninės ligos

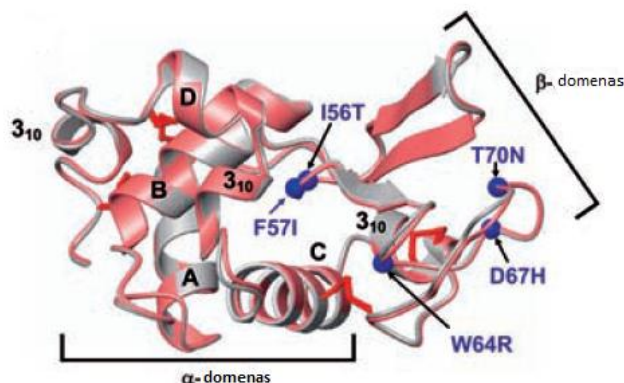
Prioninės ligos – tai didelė grupė gyvūnų ir žmonių neurodegeneracinių sutrikimų. Tokių sutrikimų pavyzdžiai yra Creutzfeldt-Jakob liga (CJD), galvijų spongiforminė encefalopatija (BSE). Sergant šiomis ligomis ląstelinis priono baltymas (PrP^C) yra paverčiamas į ligai specifinę infekcinę izoformą (PrP^{SC}). Prioninis baltymas (PrP^C) tai ekstraląstelinis monomerinis baltymas, kovalentiškai susijungęs su glikozilfosfatidilinozitolium (Ohnishi and Takano, 2004). Manoma, kad šie prioniniai baltymai atsakingi už signalo perdavimą (Mouillet – Richard *et al.*, 2000) ir/arba kontroliuoja vario jonų koncentraciją organizme (Burns *et al.*, 2002). PrP^C erdvinė struktūra sudaryta daugiausia iš α -spiralių ir nedidelio kiekio β -klosčių, o PrP^{SC} priešingai, turi daug β -klosčių ir mažai α -spiralių (Ohnishi and Takano, 2004) arba jų visai neturi (Smirnovas *et al.*, 2011). Dėl didelio β -klostytų priono struktūrų stabilumo, fibriliniai agregatai yra atsparūs detergentams, proteazėms, terminei denatūracijai, gali būti aptinkami organizmo skysčiuose ar kraujyje bei išgyvena virškinamajame trakte (Cushman *et al.* 2010).

1.1.1.2. Lizocimo amiloidozė

Daugelis eksperimentinių duomenų rodo, kad aminorūgščių seka arba joje įvykę pasikeitimai yra atsakingi už lizocimo agregacijos pradžia. Mutagenezės tyrimai atskleidė, kad yra aminorūgščių liekanų, kurios daro įtaką agregacijai. Atrastos specifinės baltymų arba peptidų sritys, kurios linkusios agreguoti (1.2 pav.). Mokslininkai šiuos regionus apibūdina kaip agregacijai jautrius arba linkusius agreguotis (angl. *aggregation-prone*, *aggregation-*

susceptible). Šie atradimai leidžia nuspėti amiloidogeninius baltymus remiantis jų pirmine struktūra (Harrison *et al.*, 2007).

XXa. pabaigoje buvo nustatytos dvi žmogaus lizocimo taškinės mutacijos (I56T ir D67H) siejamos su paveldima lizocimo amiloidoze (Pepys *et al.*, 1993; Booth *et al.*, 1997). Visai atvejais pastebėta, kad liga paveldima per dominantinį ligą lemiantį alelinį geną. Neseniai buvo pranešta apie kitas taškines mutacijas (F57I ir W64R) ir dvi dvigubas mutacijas (F57I/T70N ir T70N/W112R) taip pat susijusias su šia amiloidozės forma (Swaminathan *et al.* 2011).

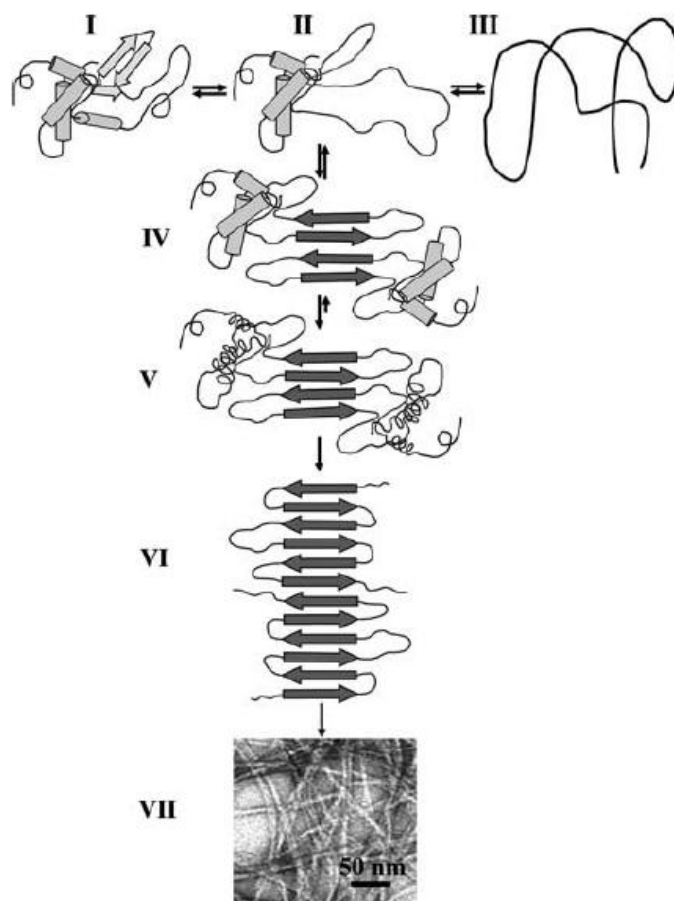


1.2 pav. Laukinio tipo lizocimo tretinės struktūros modelis. (Pilka spalva) ir I56T variantas (rožinė spalva). I56T struktūra beveik nesiskiria nuo laukinio tipo baltymo struktūros. α -spiralės yra pažymėtos raidėmis A – D, dar trys α -spiralės pažymėtos 3₁₀. Keturi disulfidiniai tilteliai pažymėti raudona spalva, o taškinės mutacijos mėlyna (pritaikyta iš Dumoulin *et al.*, 2003).

Žmogaus lizocimo geno mutacijos yra susijusios su paveldima sisteminė amiloidoze. Žmonių, sergančių šia liga, inkstuose, virškinamajame trakte, limfmazgiuose, kraujagyslėse ir kepenyse yra aptinkami dideli kiekiai (kartais net kilogramais) lizocimo agregatų. (Swaminathan *et al.* 2011).

1.1.2. Fibrilių susidarymo mechanizmas

Norint gydyti ligas siejamas su amiloidinėmis fibrilėmis, reikia suprasti jų susidarymo mechanizmą. Amiloidinių fibrilių susidarymas yra fizinis procesas, kurio metu pakitusios konformacijos baltymo molekulės sąveikauja tarpusavyje ir sudaro linijinius, biologiškai neaktyvius agregatus (Nielsen *et al.* 2001). Baltymo fibrilizacija prasideda, kai lizocimo natyvi struktūra dalinai išsivynioja, tada susidaro labiau linkusi agreguoti baltymo formai. Tokios dalinai išsivyniojusios baltymo konformacijos pirmtakai dėl hidrofobinių ir elektrostatiinių sąveikų pradeda formuoti naujus vandenilinius ryšius. Taip susidaro β -klosčių struktūros iš kurių formuojasi fibrilės (1.3 pav.) (Dumoulin *et al.*, 2003).



1.3 pav. Siūlomas lizocimo amiloidinių fibrilių formavimosi mechanizmas. (I) – natyvus baltymas. (II) – dalinai išsivyniojęs baltymas, kuriame α domenas ir C – spiralė atsiskyrusios. (III) – denatūruotas baltymas. (IV) – tarpinės konformacijos pirmtakai. (V ir VI) – β -klostes pradeda sudaryti ir kiti baltymo regionai. (VII) – fibrilių nuotrauka. Paveiksle nėra pavaizduoti disulfidiniai tilteliai nors jie yra visose nurodytose stadijose. (Pritaikyta iš Booth *et al.*, 1997).

Fibrilių susidarymo procesas siejamas su baltymų oligomerų, branduolių susidarymu, linijinių agregatų ilgėjimu ir linijinių agregatų sulipimu į didesnes sankaupas. Skiriami trys pagrindiniai agregacijos žingsniai: branduolių formavimas, fibrilių ilgėjimas (elongacija), stambesnių agregatų susidarymas (Mauro *et al.* 2006, Nielsen *et al.* 2001).

Tipinis amiloidogenezės procesas prasideda *lag* faze, kurios metu formuojasi branduoliai, o baltymo virtimas fibrilėmis nėra pakankamai žymus, kad būtų aptinkamas (Lee *et al.* 2007). Šioje fazėje branduolių susidarymu yra laikomas kelių dalinai išsivyniojusių monomerų susijungimas į organizuotą struktūrą – fibrilių pirmtaką. Po to monomerams jungiantis prie branduolių procesas perauga į elongaciją, kurioje greitai didėja fibrilių koncentracija (Lee *et al.* 2007, Nielsen *et al.* 2001). Elongacijos fazėje bet kokie agregatai, didesni už branduolį virsta fibrile. Jai besiformuojant galai atlieka branduolių vaidmenį ir reakcija vyksta tol, kol tirpale nebelieka baltymo monomerų, o visas baltymas pavirsta į fibrilinius agregatus. *Lag* fazės ilgis ir fibrilių augimo greitis priklauso nuo tokių veiksnių kaip pradinė koncentracija ar pH (Lee *et al.* 2007).

Vieną agregacijos žingsnį, galima atskirti nuo kitų. Jis gali būti inicijuojamas pridendant į reakcijos mišinį sėklos (amiloidinių agregatų), tai yra fibrilių ilgėjimas (Milto et al., 2013). Pastebėta, kad fibrilių ilgėjimas yra panašus į fermentinę reakciją (Chatani et al., 2010), kur fibrilių galai gali būti laikomi fermentų aktyviaisiais centrais, o prie jų prisijungiantys monomerai ar oligomerai – substratais. Tada fibrilių ilgėjimas gali būti aprašomas lygtimi:



kur F – fibrilė, M – monomeras, F^* – ilgesnė fibrilė, o FM – trumpą laiką egzistuojantis kompleksas, kuris gali būti aptinkamas nuo prisijungimo prie fibrilės momento iki pilno įsitraukimo į fibrilę (Milto et al. 2013).

Fibrilių ilgėjimo greitį apibūdina Michaelio-Menten lygtis:

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

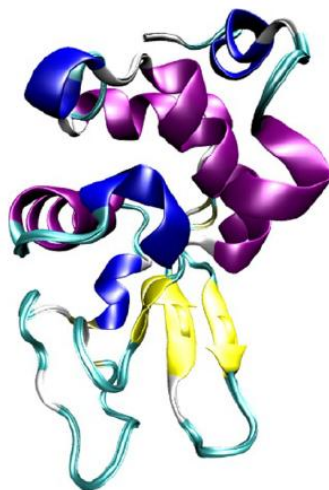
kur M – monomero koncentracija, v_{max} – maksimalus greitis ($v_{max} = k_2 F_g$, k_2 – FM komplekso susidarymo į ilgesnę fibrilę greitis, F_g – fibrilės galų koncentracija), K_M – Michaelio konstanta ($K_M = (k_2 + k_{-1})/k_1$, k_1 – monomero jungimosi prie fibrilės greičio konstanta, k_{-1} – FM komplekso disociacijos konstanta).

1.2. Vištos kiaušinio baltymo lizocimo agregacija

1922 metais Aleksandras Flemingas (*Alexander Fleming*) paciento sergančio sloga gleivėse atrado medžiagą, kuri gali nužudyti tam tikras bakterijas (*Micrococcus lysodeikticus*) (Fleming, 1992). Jis pavadino šią medžiagą „lizocimu“. Buvo nustatyta, kad lizocimo yra ir kituose kūno skysčiuose, seilėse, ašarose, kraujo serume. Taip pat buvo pastebėta, kad ir vištos kiaušinio baltyme yra daug lizocimo (Swaminathan et al. 2011).

Lizocimas sulaukė didelio mokslininkų susidomėjimo, kol paaiškėjo, kad jo negalima pritaikyti kaip antibakterinio preparato, o atradus peniciliną susidomėjimas visiškai išblėso iki tol, kol buvo išskirtas ir išgrynintas vištos kiaušinio baltymo lizocimas (Swaminathan et al. 2011).

Dabar pasaulyje HEWL yra vienas plačiausiai naudojamų baltymų (Jolles, 1960, 1964). HEWL turi vieną polipeptidinę grandinę (14,3 kD), kurią sudaro 129 aminorūgštys sujungtos 4 vidumolekuliniiais disulfidiniiais ryšiais (1.4 pav.). Baltymo izoelektrinis taškas $pI \approx 11,3$, todėl jis lengvai tirpsta vandeniniuose tirpaluose (Wetter and Deutsch, 1951). HEWL katalizuoja bakterijų ląstelės sienelės peptidoglikano β -1,4 glikozidinių ryšių hidrolizę tarp N-acetilmuramo rūgšties ir N-acetilgliukozamino. Skirtingai nei kitus baltymus, HEWL gan lengva iškristalinti ir vėliau tuos kristalus tirti. (Swaminathan et al. 2011).



1.4 pav. Vištos kiaušinio baltymo lizocimo struktūra iš PDB (failas 1HEW).

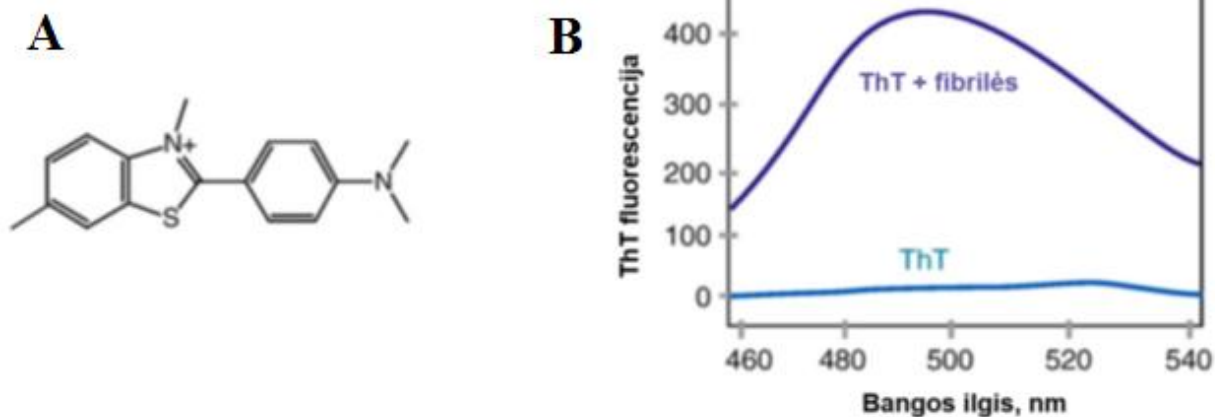
HEWL agregacijos tyrimai tapo labai svarbūs, kai paaiškėjo, kad žmogaus lizocimo geno mutacijos yra susijusios su paveldima sisteminė amiloidoze (Pepys *et al.*, 1993). Dabar šio baltymo struktūriniai pakitimai yra tiriami plačiau (Dobson *et al.*, 1994). Kadangi HEWL struktūra yra 60% identiška žmogaus lizocimui, kuris sudaro amiloidinius agregatus *in vivo*, jis dažnai pasirenkamas ir tiriant molekulinis agregacijos mechanizmus *in vitro*.

Bandymams, kaip modelinis baltymas, naudojamas HEWL, nes jis yra nedidelis, gerai išstudijuotas, fibriles formuojantis baltymas, kurio tretinė struktūra ir baltymo funkcija beveik identiška žmogaus lizocimui, siejamam su patologine agregacija *in vivo*. Taip pat galima išgauti labai gryną natyvų baltymą, kuris yra santykinai pigus ir puikiai tirpsta vandeniniuose tirpaluose. Modeliniai baltymai labai svarbūs moksliniuose tyrimuose, nes leidžia palyginti skirtingų laboratorijų duomenis ir pritaikyti daugelį eksperimentinių, bei analizės metodų (Krishnamurthy *et al.*, 2009).

1.3. Amiloidinių fibrilių nustatymas Tioflavinu T

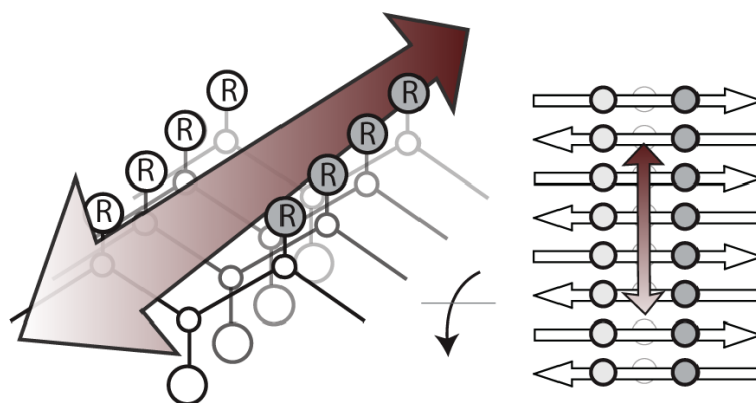
Šiuo metu amiloidines fibriles įmanoma tirti keliais skirtingais metodais, tokiais kaip tyrimas rentgeno spindulių difrakcija (pasikartojančiam β -klostytam motyvui analizuoti), žiedinis dichrozmas (CD) ir Furjė transformacijos infraraudonoji spektroskopija (naudojami amiloidų β -klosčių kiekiui nustatyti), transmisinė elektroninė mikroskopija, atominės jėgos mikroskopija (fibrilių morfologijai nustatyti) bei tyrimas panaudojant fibrilių savybę prisijungti specifinius dažus: Kongo raudonąjį ir Tioflaviną T (ThT) (Chiti and Dobson, 2006; Maji *et al.*, 2009). Pastarasis tyrimo metodas apžvelgiamas detaliau.

1959 metais Vassar and Culling parodė, kad dažui Tioflavinui T (ThT) jungiantis prie amiloidinių sancaupų audiniuose, labai sustiprėja jo fluorescencijos intensyvumas (1.5 pav.) (Vassar and Culling, 1959) (emisija esant ~ 482 nm, o sužadimas ~ 450 nm bangos ilgiui) (LeVine, 1993; Naiki *et al.*, 1989).



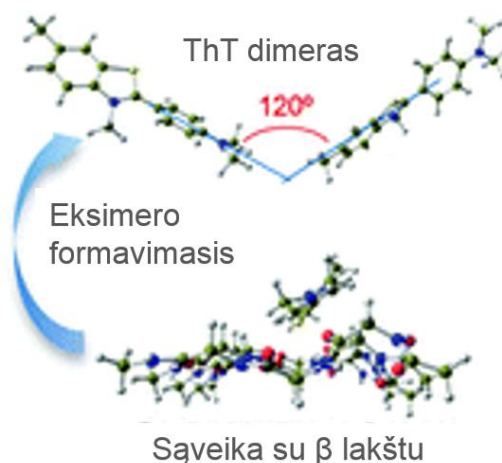
1.5 pav. ThT cheminė struktūra ir fluorescencijos padidėjimas dažui susijungus su amiloidinėmis fibrilėmis. A – pateikta ThT cheminė struktūra. Molekulę sudaro hidrofobinė dalis su dimetilamino grupe, kuri prijungta prie fenilo grupės. Ši dalis sujungta su labiau poline benzotiazolo grupe su dviem poliniais atomais: N ir S (Khurana et al., 2005). B – parodytas ThT fluorescencijos padidėjimas, jam susijungus su amiloidinėmis fibrilėmis (pritaikyta iš Biancalana and Koide 2010).

Geras ThT tirpumas ir vidutinis giminingumas fibrilėms suteikia galimybę pritaikyti šį dažą daugelyje eksperimentų (Groenning M., 2010). Dažo fluorescencijos intensyvumo padidėjimas proporcingas susidariusių fibrilių kiekiui leidžia jį pritaikyti kinetiniuose fibrilizacijos tyrimuose (Biancalana and Koide, 2010). Nepaisant intensyvaus naudojimo amiloidų tyrimuose, tikslus ThT jungimosi mechanizmas kol kas nėra žinomas, bet manoma, kad dažas jungiasi prie visoms fibrilėms bendro struktūrinio motyvo (Sabaté *et al.*, 2008). Yra keletas mechanizmų aprašančių ThT sąveiką su amiloidinėmis fibrilėmis. Kanalo modelis aprašo, kad amiloidinėse fibrilėse nepriklausomai nuo amino rūgščių sekos, lygiagrečiai fibrilės ašiai, β – klostės suformuoja savitą grandinių išsidėstymą, pavadintą β – klosčių kopėčiomis (1.6pav.) (Biancalana *et al.*, 2008). Laisvoje ThT molekulėje benzotiazolo ir benzeno žiedai gali laisvai sukis apie bendrą C – C jungtį, šis sukimasis slopina generuojamą fotonų sužadimą, todėl stebima maža fluorescencijos emisija (Biancalana and Koide, 2010). Kai ThT prisijungia abipus β – klosčių kopėčių išsaugoma sužadimo būseną ir matoma aukšta fluorescencijos kvantinė išeiga.



1.6 pav. ThT jungimosi prie amiloidinių fibrilių kanalo modelis. ThT jungiasi prie šoninių grandinių paviršiuje susiformavusio kanalo. ThT žymi abipusė rodyklė, β klostės – vienpusės rodyklės, o amino rūgščių šoninės grupės – apskritimai (pritaikyta iš Biancalana and Koide, 2010).

Savaiminės asociacijos hipotezė teigia, kad dauguma eksperimentų vykdomų su ThT yra atliekami viršijant kritinę micelių susidarymo koncentraciją (CMC, $\sim 4 \mu\text{M}$ vandenyje) (Khurana *et. al.*, 2005). Manoma, kad amiloidinių fibrilių dažymas su ThT yra paremtas hidrofobine sąveika tarp amiloido ir ThT micelių. Vėlesni pranešimai prieštarauja šiai hipotezei, nes tyrimus atliekant $\sim 30 \mu\text{M}$ ThT koncentracijoje micelės jau nebeturėtų susidaryti (Sabaté *et al.*, 2008). Daugiau paaiškinimų pasiūlė Greonningas ir kt. Jie teigia, kad ThT gali prisirišti prie fibrilių sužadintus dimerus (eksimerus), išsidėstančius hidrofobinėse fibrilių suformuotose ertmėse (1.7 pav.) (Greonning *et. al.*, 2007).



1.7 pav. Manoma, kad ThT molekulės, formuojančios eksimerus, orientuotos tarpusavyje taip, kad sudaro 120° kampą (pritaikyta iš Sabate *et al.* 2013).

ThT molekulių suformuotų dimerų giminingumas amiloidinėms fibrilėms yra 70 kartų didesnis. Dimerai taip pat skatina fluorescencijos intensyvumo padidėjimą. Remiantis sujungtų osciliatorių teorija, dviejų ar daugiau chromoforų artima sąveika sukuria naują molekulę (eksimerą), kuri įgauna naujų savybių: naują energiją ir intensyvumą (Sabate *et al.*, 2013).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudoti reagentai ir medžiagos

- *Agar Scientific*: anglimi dengti vario tinkleliai (Formvar/Carbon 300 Mesh Cu).
- *Carl Roth*: NaAc(99,5 %), GndHCl (99,7 %), stiklo rutuliukai.
- *Fisher Scientific*: NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, karbamidas, uranilacetatas.
- *Sigma Aldrich*: vištos kiaušinio baltymo lizocimas, tioflavinas T.

2.2. Naudota laboratorinė įranga

- Elektroninis mikroskopas „FEI Morgagni 268“
- pH metras „Orion DUAL STAR Meter“.
- Svarstyklės: „KERN PCB 400–2“, „Denver Instrument TP-214“.
- Šildomoji magnetinė maišyklė „VELP Scientifica ARE“.
- Termomikseris „DITABIS MHR 23“.
- Plokštelių skaitytuvas „Synergy H4 Hybrid Reader“.
- 96 šulinėlių plokštelės „Fisher Scientific“.
- Diferencinio skenavimo kalorimetras MCS „MicroCal Inc.“
- Vandens vonelė „HAAKE K“

2.3. Metodai

2.3.1. Fluorescencijos matavimas

Vištos kiaušinio baltymo lizocimo amiloidinių fibrilių formavimasis stebimas pridėjus specifiskai prie fibrilių besijungiančio dažo tioflavino T (ThT), kuris sužadinas 450 nm šviesos bangos ilgiu, o emisija matuojama 482 nm bangos ilgyje. Matavimai ir agregacija vykdoma plokštelių skaitytuvu „Synergy H4 Hybrid Reader“. Mėginių matavimai vykdomi 96 šulinėlių plokštelėje. Į kiekvieną šulinėlį, maišymui pagerinti, įdedamas stiklo rutuliukas, plokštelė iš viršaus yra užklijuojama sandarinimo plėvele. Plokštelių skaitytuve nustatoma, kad spindulys į mėginius eitų per plokštelės dugną. Plokštelė apšviečiama 450 ± 9 nm bangos ilgio šviesa ir detektorius matuoja 482 ± 9 nm bangos ilgio šviesą. Viso proceso metu palaikoma pastovi pasirinkta temperatūra.

2.3.2. Tirpalų ruošimas spontantinės HEWL agregacijos tyrimams

Spontantinė HEWL agregacija buvo vykdoma įvairiose temperatūrose. Eksperimentai skirtinguose pH ir GndHCl koncentracijose vykdomi 45°C, 50°C, 55°C, 60°C

temperatūrose. Savaiminė agregacija esant skirtingoms joninėms jėgoms ir karbamido koncentracijomis vykdoma 50°C, 55°C, 60°C, 65°C temperatūrose.

2.3.2.1. Buferinių tirpalų su skirtingomis GndHCl koncentracijomis paruošimas

Paruošiami 50 mM fosfatiniai buferiniai tirpalai (pH 2,5; pH 6,5; pH 7,5) ir 50 mM acetatiniai buferiniai tirpalai (pH 3,5; pH 4,5; pH 5,5). Kiekvienas buferinis tirpalas paruošiamas su skirtingomis GndHCl koncentracijomis, kad reakcijos mišinyje būtų nuo 0 M iki 5 M GndHCl. Pasiruošiami 0M GndHCl 50mM reikiamo pH buferiniai tirpalai ir tokie pat buferiniai tirpalai su 6M GndHCl jie supilstomi pagal 2 lentelėje pateiktus duomenis ir taip gaunamos reikalingos GndHCl koncentracijos sąlygos.

2 lentelė. Buferiniai tirpalai su skirtingomis GndHCl koncentracijomis (V=2 ml).

GndHCl koncentracija reakcijos mišinyje, M	Ruošiama GndHCl koncentracija, M	Buferinis tirpalas su 6 M GndHCl, ml	Buferinis tirpalas be GndHCl, ml
0	0	0	2
0,5	0,6	0,2	1,8
1	1,2	0,4	1,6
1,5	1,8	0,6	1,4
2	2,4	0,8	1,2
2,5	3	1	1
3	3,6	1,2	0,8
3,5	4,2	1,4	0,6
4	4,8	1,6	0,4
4,5	5,4	1,8	0,2
5	6	2	0

Tokiu būdu paruošti buferiniai tirpalai su skirtingomis GndHCl koncentracijomis toliau naudojami spontaninės agregacijos eksperimentuose.

2.3.2.2. Buferinių tirpalų su skirtingomis karbamido koncentracijomis ruošimas

Paruošiami 64 mM (pH 6,5) fosfatiniai buferiniai tirpalai su skirtingomis joninėmis jėgomis 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,5 M, 0,7M, 1M. Joninė jėga keičiama pridendant atitinkamą kiekį NaCl. Kiekvienas buferinis tirpalas paruošiamas su skirtingomis karbamido koncentracijomis, kad reakcijos mišinyje būtų 0 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M karbamido. Norint gauti visas sąlygas, paruošiami 3 buferiniai tirpalai. 1) C(NaCl)=5,45 M ; V=11 ml; 64 mM PB pH 6,5. 2) C(karbamido)=10 M; V=40 ml; 64 mM PB pH 6,5. 3) 64 mM PB pH 6,5 V=100 ml. Tirpalai supilstomi kaip pateikiama 1 priede.

2.3.2.3. Reakcijos mišinių su skirtingomis GndHCl koncentracijomis ruošimas

Reakcijos mišiniuose yra 5mg/ml HEWL, 0,1 mM ThT. Jie ruošiami 50 mM fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose (pH 2,5; pH 6,5; pH 7,5) ir 50 mM acetatiniuose buferiniuose tirpaluose (pH 3,5; pH 4,5; pH 5,5). Skirtingi buferiniai tirpalai išpilstomi į lėkštelės šulinėlius po 166,7 μ l. Pasiruošiamas 30,03 mg/ml HEWL vandeninis tirpalas su 0,5 mM ThT, kuris išpilstomas į kiekvieną šulinėlį po 33,3 μ l. Į kiekvieną šulinėlį įdedamas stiklinis rutuliukas maišymui pagerinti.

2.3.2.4. Reakcijos mišinių su skirtingomis karbamido koncentracijomis ruošimas

Reakcijos mišiniuose yra 5 mg/ml HEWL, 0,2 mM ThT. Tirpalai ruošiami 64 mM fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 6,5), esant skirtingai joninei jėgai ir skirtingoms karbamido koncentracijoms. Buferiniai tirpalai išpilstomi į šulinėlius po 177,8 μ l. Paruošiamas 45 mg/ml HEWL vandeninis tirpalas su 1,8 mM ThT, kuris išpilstomas po 22,2 μ l į šulinėlį. Į kiekvieną šulinėlį įdedamas stiklinis rutuliukas maišymui pagerinti.

2.3.3. Tirpalų ruošimas diferencinio skenavimo kalorimetrijos tyrimams

Norint ištirti kokioje temperatūroje, skirtingomis sąlygomis, baltymas praranda savo natyvią struktūrą, buvo vykdomi diferencinio skenavimo kalorimetrijos tyrimai. Paruošiami 5 mg/ml HEWL tirpalai su skirtingomis GndHCl koncentracijomis nuo 0 M iki 5 M. 64 mM fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose (pH 2,5; pH 7,5) ir 64mM acetatiniuose buferiniuose tirpaluose (pH 4,5; pH 5,5). Eksperimentų metu šie tirpalai lyginami su atitinkamais buferiniais tirpalais be HEWL. Paruošiami mėginiai su 5 mg/ml HEWL koncentracija, 64 mM (pH 6,5) fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose su skirtingomis karbamido koncentracijomis nuo 0 M iki 7M, kai joninė jėga tirpale 0,1 M ir 1M. Eksperimentų metu paruošti tirpalų mėginiai lyginami su atitinkamos joninės jėgos buferiniais tirpalais be HEWL.

Diferencinio skenavimo kalorimetrijos eksperimentuose taikytas 1°C/min temperatūros kėlimo greitis (temperatūrų intervalas 30-95 °C).

2.3.4. Elektroninės mikroskopijos mėginiai

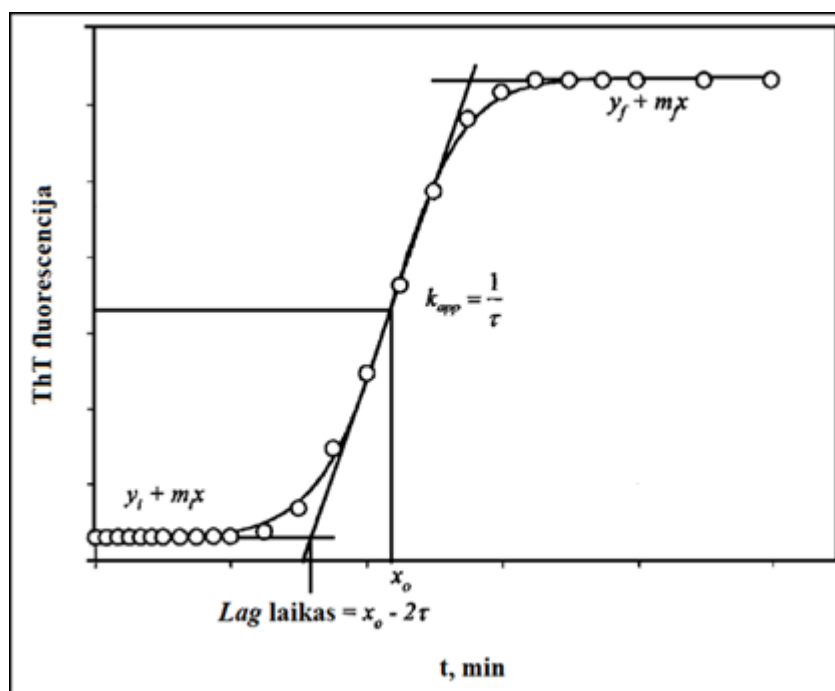
Norint įrodyti, jog tikrai susidaro amiloidiniai agregatai, fibrilės yra skiedžiamos 50 kartų. 4 μ L tirpalo užnešama ant anglimi dengtų vario tinklelių ir po minutės nusausinama. Mėginys 3 kartus plaunamas vandeniu užnešant po 4 μ L ir nusausinant. Po to užnešama 4 μ L dažo (2% uranilacetato) ir po 1 minutės nusausinama. Paruoštas mėginys analizuojamas elektroniniu mikroskopu.

2.3.5. Duomenų analizė

2.3.5.1. Spontaninė agregacija

Eksperimentų metu gautos ThT fluorescencijos kreivės buvo apdorojamos Microsoft Excel ir Origin 8.1 programomis.

Spontaninės agregacijos kinetika gali būti apibūdinama sigmoidine kreive, kur pradžioje (lag fazėje) ThT fluorescencijos beveik nėra. Didėjant susidariusių fibrilių kiekiui, matomas ThT fluorescencijos intensyvumo augimas, kuris galiausiai stabilizuojasi pasibaigus fibrilių formavimuisi (2.1 pav.) (Nielsen et al., 2001).



2.1 pav. Schematinė spontaninio fibrilių susidarymo kreivė (pritaikyta iš Nielsen et al., 2001).

Spontaninės HEWL agregacijos metu gautos ThT fluorescencijos priklausomybės nuo laiko kreivės Origin programa buvo gluodinamos kreive, kurią aprašo lygtis:

$$Y = y_i + m_i x + \frac{y_f + m_f x}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{\tau}}}, \quad (2)$$

Kur Y – fluorescencijos intensyvumas, x – laikas ir x_0 – laikas, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo (Nielsen et al., 2001). Skirtingų sąlygų įtaka spontaniniam HEWL amiloidinių fibrilių susidarymui buvo vertinama lyginant gautą dydį x_0 . Fibrilių augimo greičio konstanta apskaičiuojama kaip $1/\tau$ (Nielsen et al. 2001).

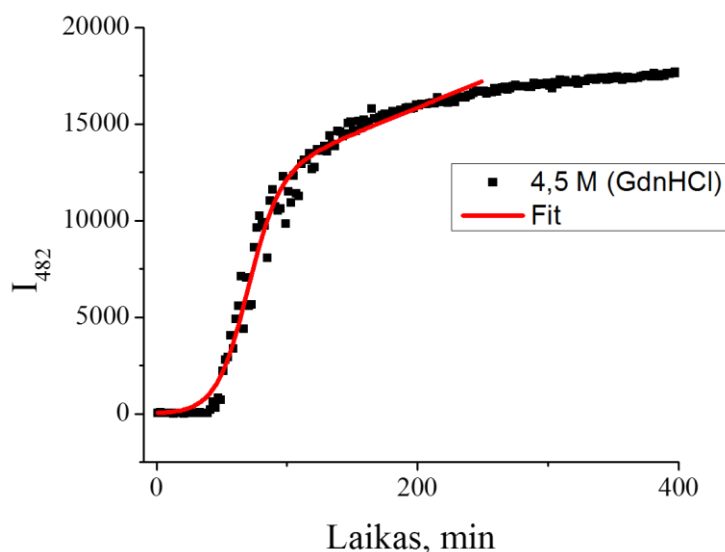
2.3.5.2. Diferencinė skenavimo kalorimetrija

Eksperimentų metu gautos termogramos buvo apdorojamos naudojant Origin 5.0 programaos DSC modulį. Duomenys buvo normalizuojami, remiantis baltymo koncentracija, taikant dviejų būvių modelį, nustatoma baltymo lydymosi temperatūra ir išsivyniojimo entalpija

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Spontaninės agregacijos su GdnHCl tyrimas

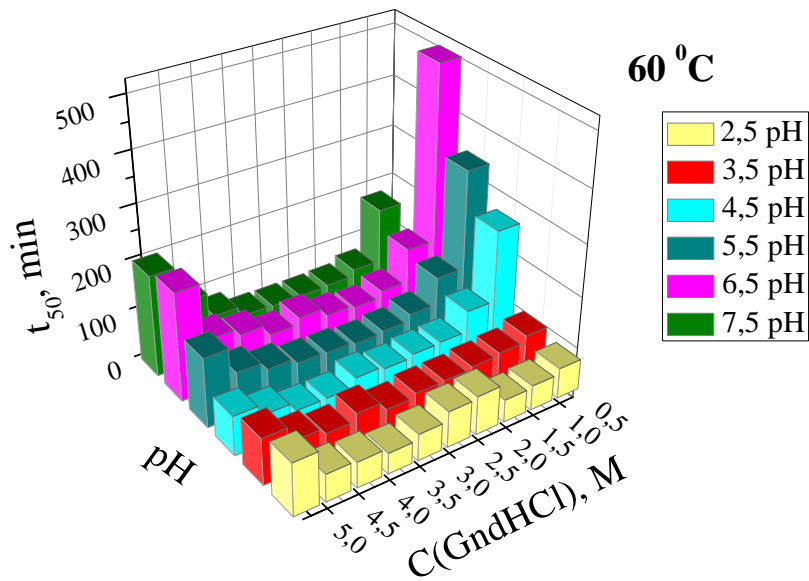
HEWL spontaninė agregacija buvo vykdoma skirtingose GdnHCl koncentracijose skirtingo pH buferiniuose tirpaluose 4 temperatūrose (45°C, 50 C, 55°C, 60 C). 3.1 paveiksle pateiktas pavyzdys, kaip naudojant sigmoidės kreivę gluodinami spontaninės agregacijos eksperimentiniai duomenys.



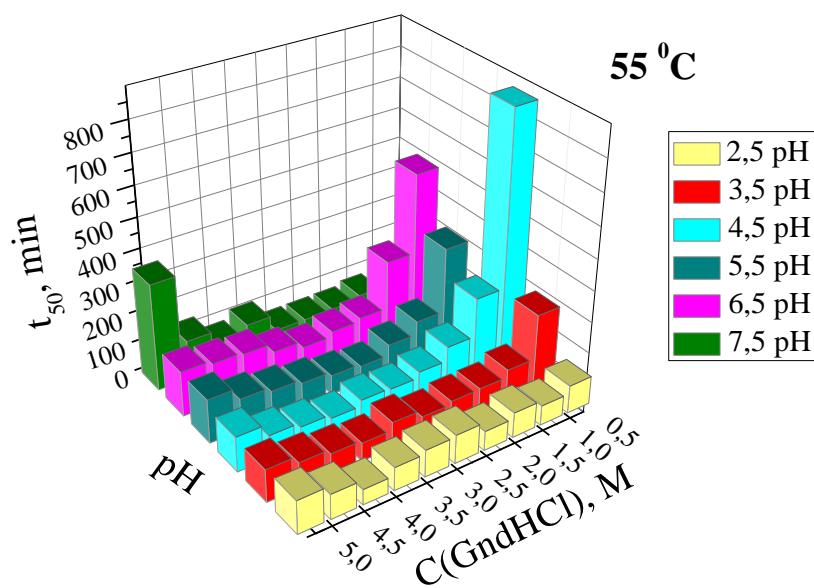
3.1 pav. Gluodinti spontaninės agregacijos eksperimentiniai rezultatai, esant 5 mg/ml HEWL, 50 mM pH 4,5 acetatiniame buferiniame tirpale, 4,5M GdnHCl. Inkubacija 55°C

3.1.1. Spontaninės agregacijos laiko priklausomybė nuo pH ir GdnHCl koncentracijos

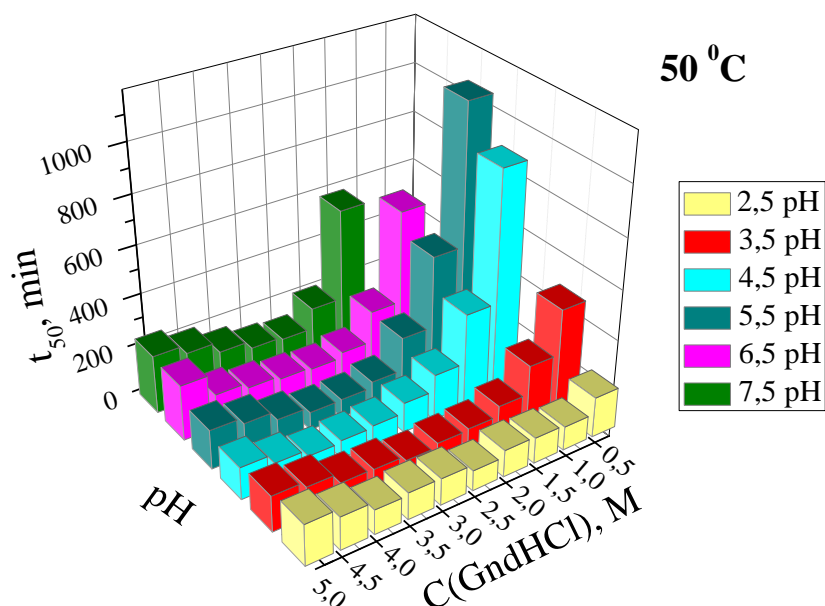
Gluodinant gautas laikas, per kurį suagregavo 50 % mėginyje esančio baltymo, pateikiamas 3D grafikuose (3.2 pav., 3.3 pav., 3.4 pav., 3.5 pav.), kuriose matome jo priklausomybę nuo pH ir GdnHCl koncentracijos. Iš grafikų matyti, kad greičiausiai spontaninė agregacija vyksta žemuose pH ruožuose (pH 2,5; pH 3,5). Aukštesniuose pH ruožuose spontaninė agregacija greičiausia vidutinėse GdnHCl koncentracijose (2 M – 4,5 M). Matyti, kad kylant temperatūrai laikas, per kurį suagregavo 50 % mėginyje esančio baltymo, trumpėja.



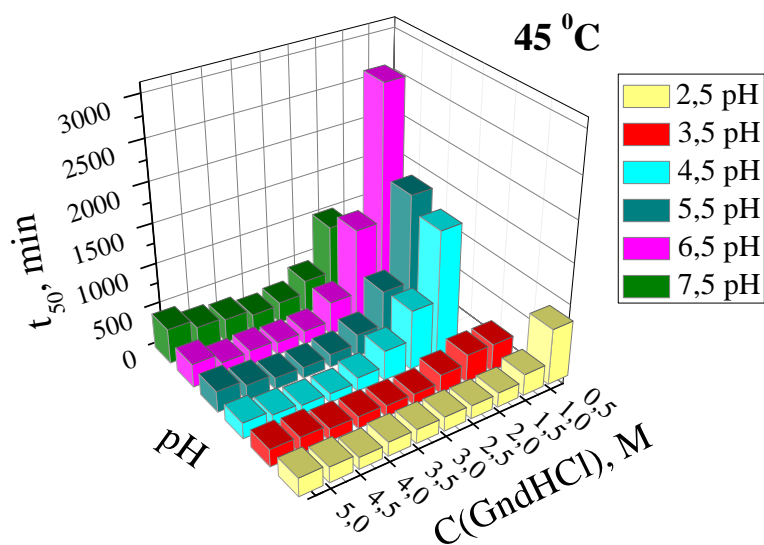
3.2 pav. Laiko, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo, priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos skirtinguose pH. Inkubacijos temperatūra 60 °C.



3.3 pav. Laiko, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo, priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos skirtinguose pH. Inkubacijos temperatūra 55 °C.

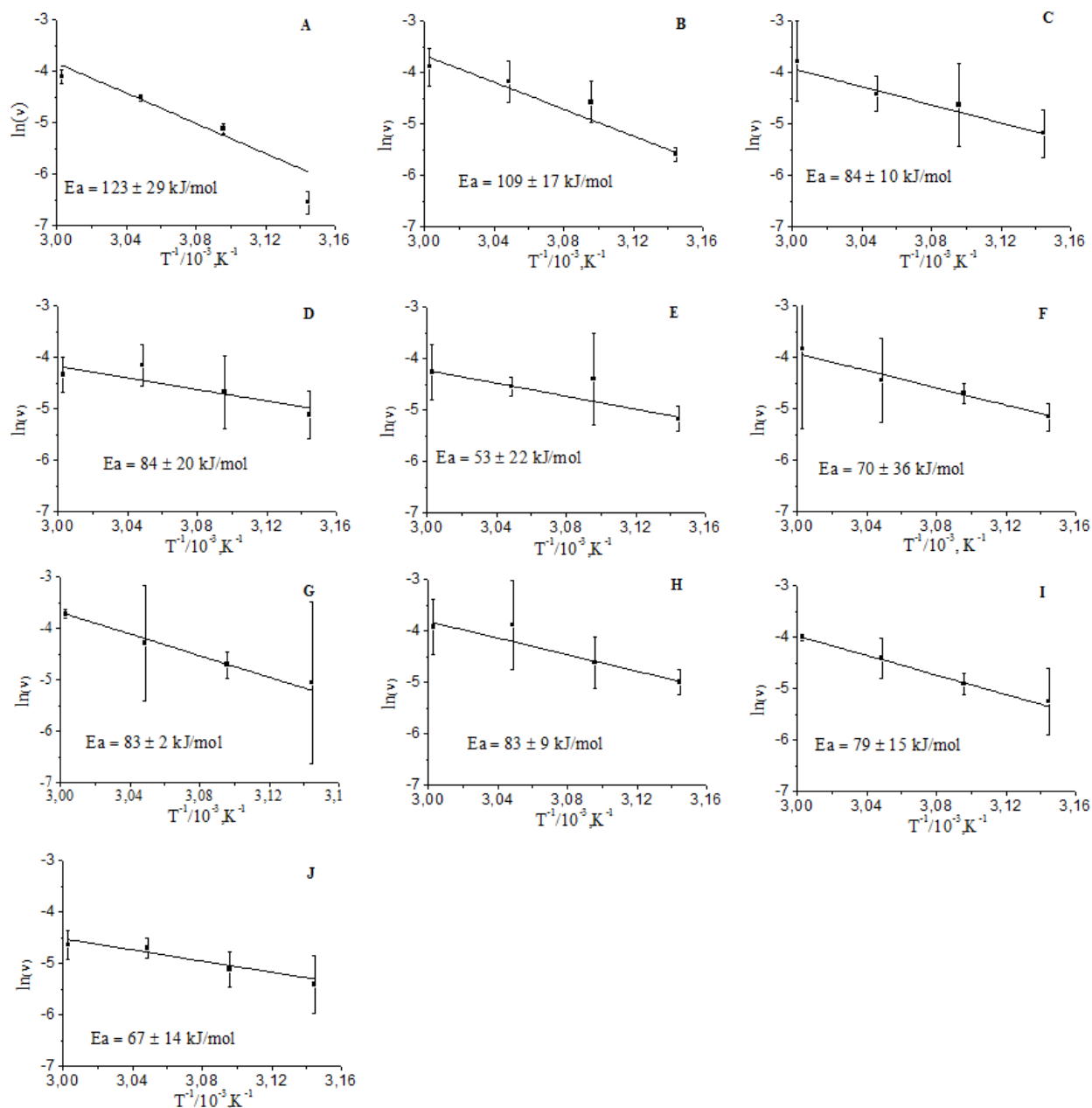


3.4 pav. Laiko, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo, priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos skirtinguose pH. Inkubacijos temperatūra 50 °C.



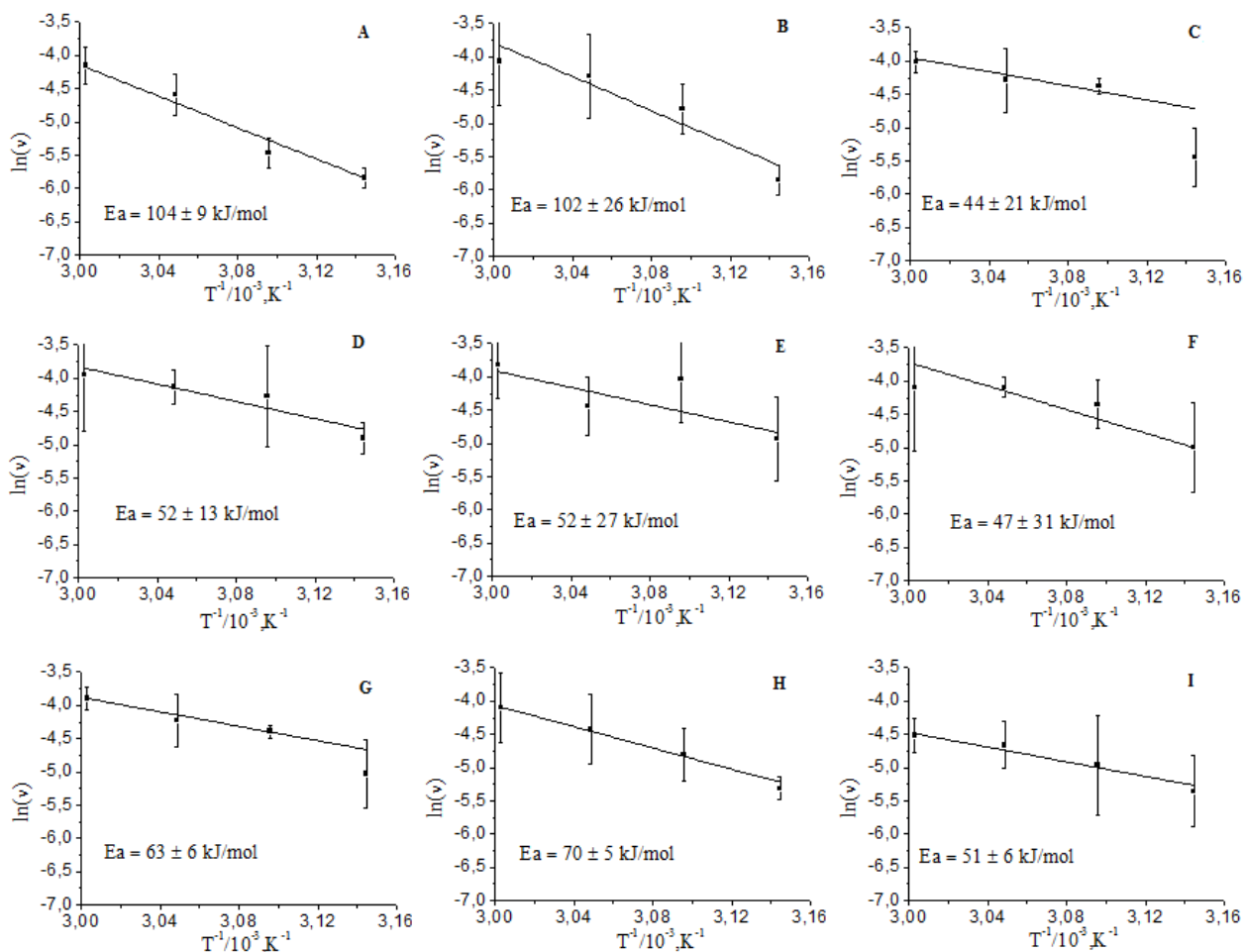
3.5 pav. Laiko, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo, priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos skirtinguose pH. Inkubacijos temperatūra 45 °C.

Naudojant apdorotus eksperimentinius duomenis, nubraižyta logaritminio greičio priklausomybė nuo atvirkštinės temperatūros (*Arrhenius* koordinatės) bei apskaičiuotos procesų aktyvacijos energijos esant skirtingoms pH reikšmėms ir GndHCl koncentracijoms (3.6 pav., 3.7 pav., 3.8 pav., 3.9 pav. 3.10 pav, 3.11 pav.). Gautos reikšmės nėra labai tikslios, nes eksperimentiniai duomenys išsibarstę, t. y. t turi santykinai nemažą paklaidą. Taip gali būti todėl, jog GndHCl yra denatūrantas turintis didelę joninę jėgą, tai gali daryti įtaką tolimesniems procesams.



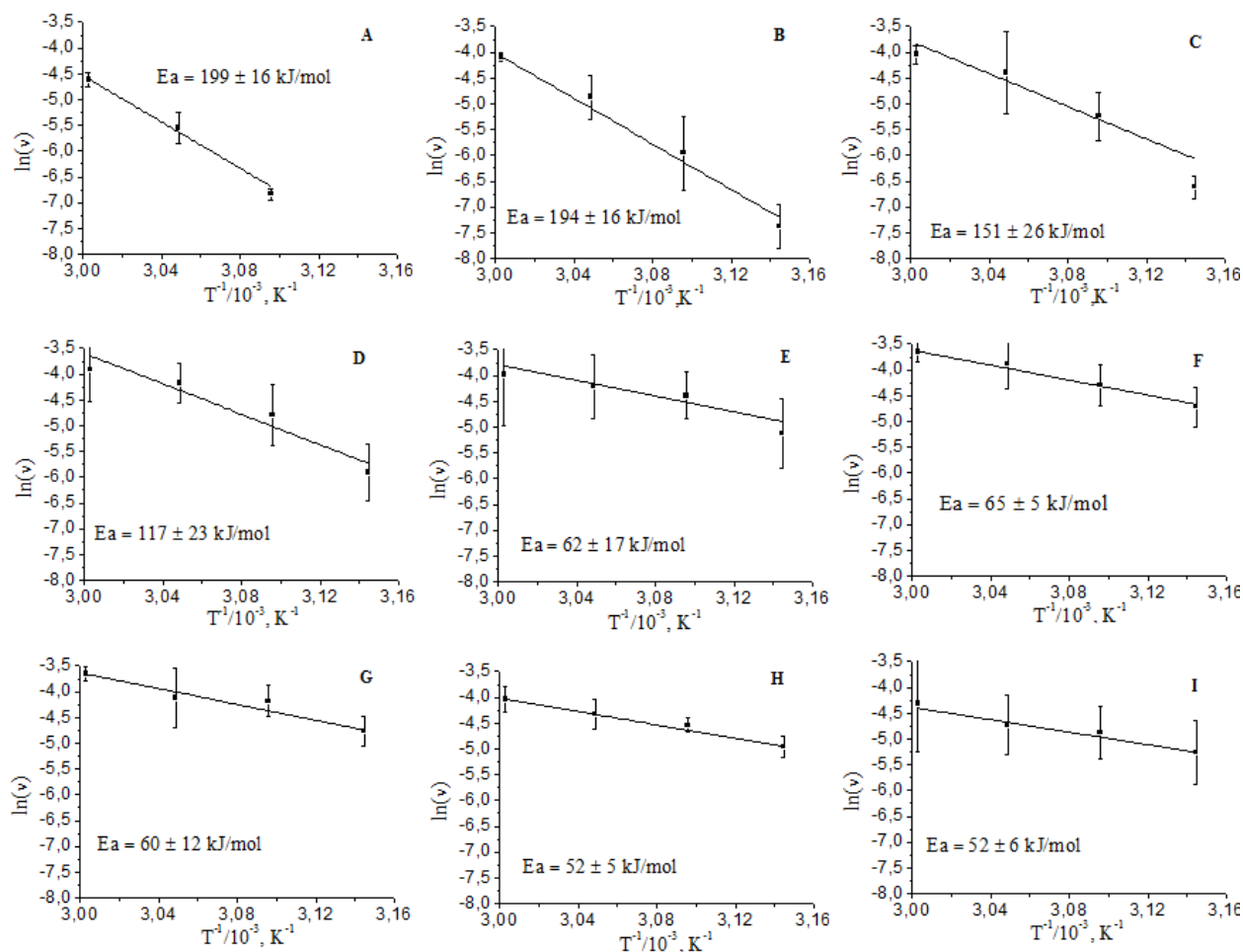
3.6 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuojama iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose pH 2,5. A) 0,5 M GndHCl, B) 1 M GndHCl, C) 1,5 M GndHCl, D) 2 M GndHCl, E) 2,5 M GndHCl, F) 3 M GndHCl, G) 3,5 M GndHCl, H) 4 M GndHCl, I) 4,5 M GndHCl, J) 5 M GndHCl.

Kai pH 2,5 didžiausias energijos kiekis reakcijai inicijuoti reikalingas lizocimo tirpaluose su 0,5 M ir 1 M GndHCl. Didinant GndHCl koncentraciją energetinis barjeras kinta paklaidų ribose.



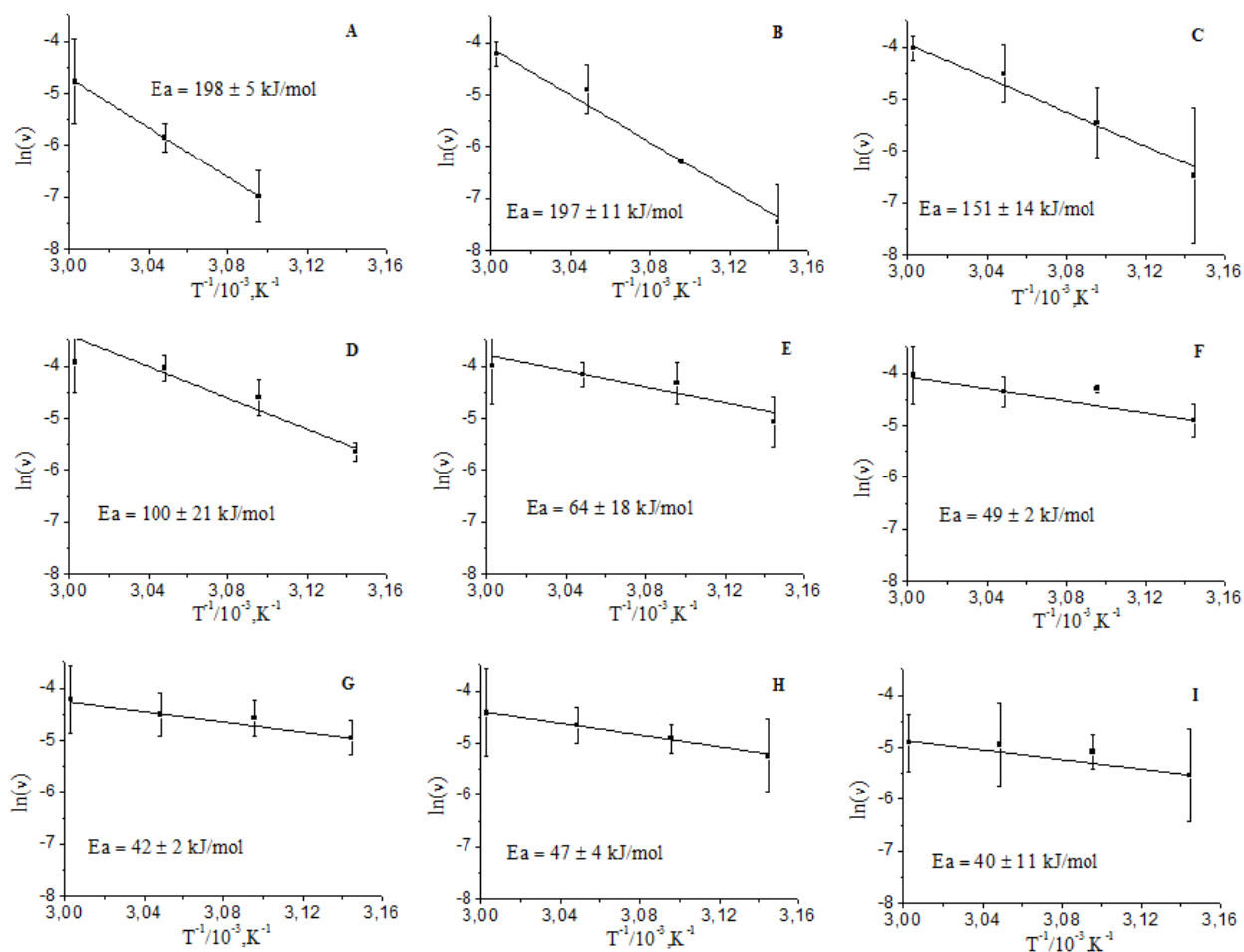
3.7 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose pH 3,5. A) 1 M GndHCl, B) 1,5 M GndHCl, C) 2 M GndHCl, D) 2,5 M GndHCl, E) 3 M GndHCl, F) 3,5 M GndHCl, G) 4 M GndHCl, H) 4,5 M GndHCl, I) 5 M GndHCl.

Kai pH 3,5 didžiausias energijos kiekis reakcijai inicijuoti reikalingas lizocimo tirpaluose su 0,5 M ir 1 M GndHCl. Didinant GndHCl koncentraciją energetinis barjeras kinta paklaidų ribose.



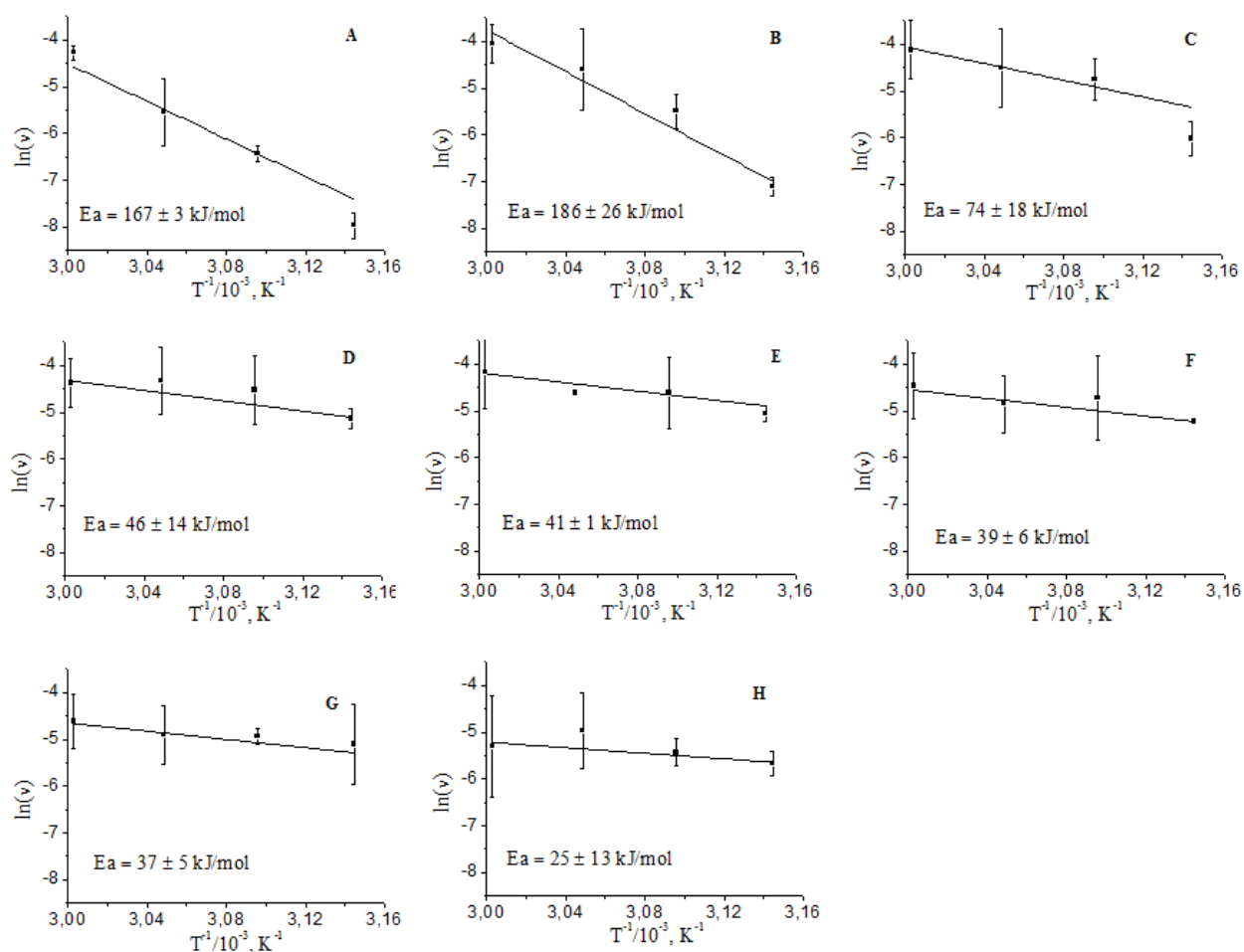
3.8 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinio. Mėginiuose pH 4,5. A) 1 M GndHCl, B) 1,5 M GndHCl, C) 2 M GndHCl, D) 2,5 M GndHCl, E) 3 M GndHCl, F) 3,5 M GndHCl, G) 4 M GndHCl, H) 4,5 M GndHCl, I) 5 M GndHCl.

Kai pH 4,5 didinant GndHCl koncentraciją energetinis barjeras mažėja kol pasiekama 3 M GndHCl koncentracija. Aukštesnėse GndHCl koncentracijose aktyvacijos energija kinta paklaidų ribose.



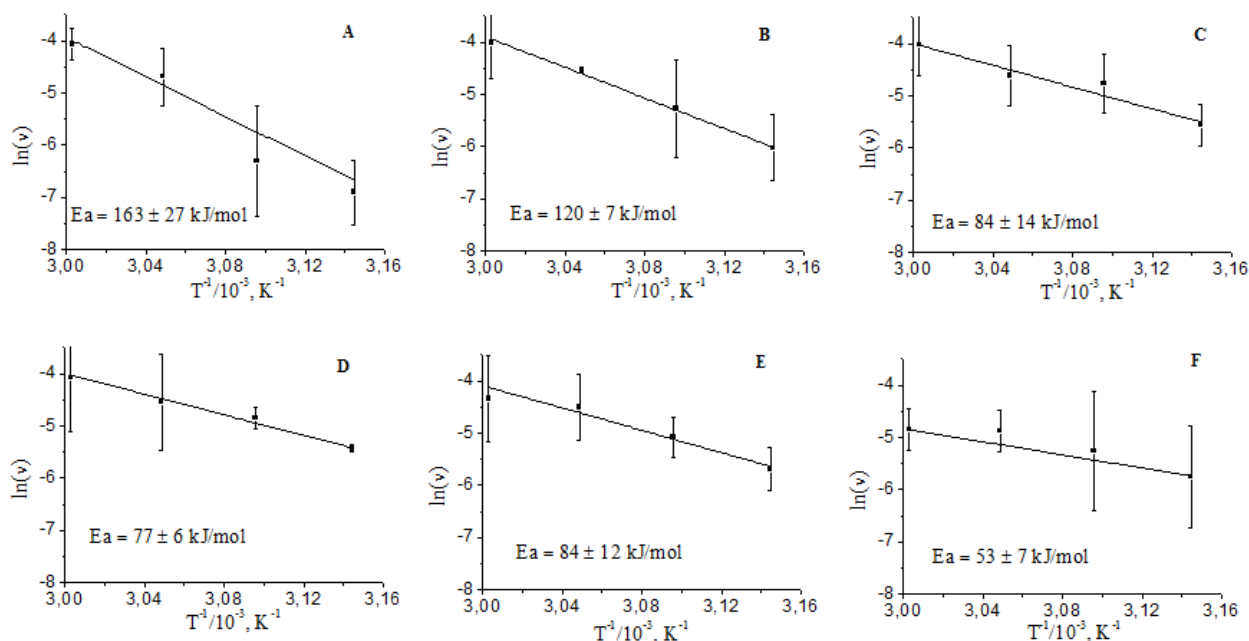
3.9 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose pH 5,5. A) 1 M GndHCl, B) 1,5 M GndHCl, C) 2 M GndHCl, D) 2,5 M GndHCl, E) 3 M GndHCl, F) 3,5 M GndHCl, G) 4 M GndHCl, H) 4,5 M GndHCl, I) 5 M GndHCl.

Kai pH 5,5 didinant GndHCl koncentraciją energetinis barjeras mažėja kol pasiekama 3 M GndHCl koncentracija. Aukštesnėse GndHCl koncentracijose aktyvacijos energija kinta paklaidų ribose.



3.10 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose pH 6,5. A) 1,5 M GndHCl, B) 2 M GndHCl, C) 2,5 M GndHCl, D) 3 M GndHCl, E) 3,5 M GndHCl, F) 4 M GndHCl, G) 4,5 M GndHCl, H) 5 M GndHCl.

Kai pH 6,5 didinant GndHCl koncentraciją energetinis barjeras mažėja kol pasiekama 2,5 M GndHCl koncentracija. Aukštesnėse GndHCl koncentracijose aktyvacijos energija kinta paklaidų ribose.



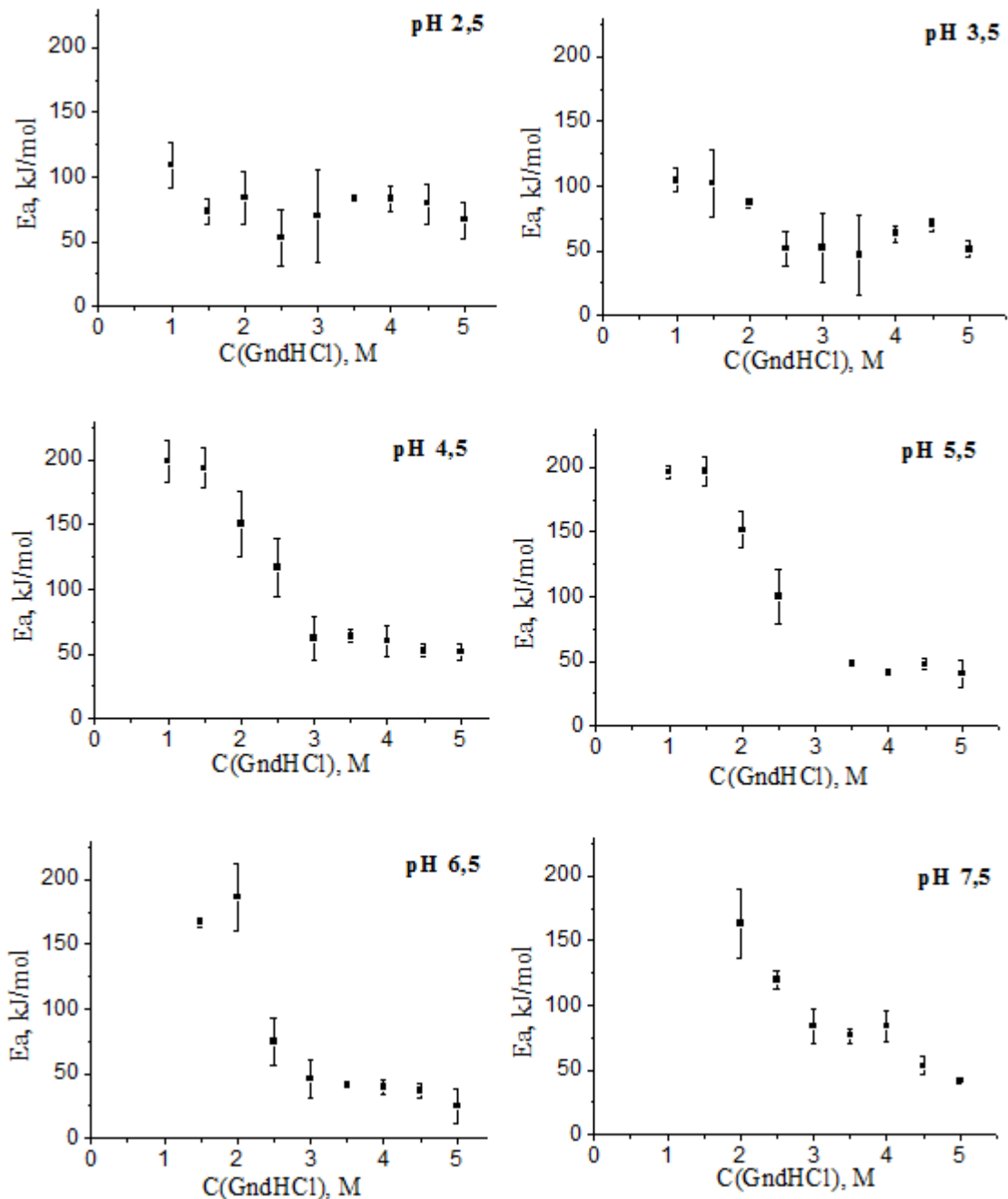
3.11 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose pH 7,5. A) 2,5 M GndHCl, B) 3 M GndHCl, C) 3,5 M GndHCl, D) 4 M GndHCl, E) 4,5 M GndHCl, F) 5 M GndHCl.

Kai pH 7,5 didinant GndHCl koncentraciją energetinis barjeras mažėja kol pasiekama 4,5 M GndHCl koncentracija. Aukštesnėse GndHCl koncentracijose aktyvacijos energija kinta paklaidų ribose.

3.1.2. Aktyvacijos energijos priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos

3.12 paveiksle pateikti aktyvacijos energijos priklausomybės nuo GndHCl koncentracijos grafikai. Iš jų matyti, kad žemesniuose pH ruožuose (pH 2,5; pH 3,5) energetinis barjeras nuo GndHCl koncentracijos nepriklauso. Aukštesniuose pH intervaluose (pH 4,5; pH 5,5; pH 6,5; pH 7,5) aktyvacijos energija mažėja kol pasiekiamos minimalios reikšmės. Kai pH 4,5 mažiausias energetinis barjeras (52 ± 2 kJ/mol), kai pH 5,5 (43 ± 3 kJ/mol), kai pH 6,5 (41 ± 1 kJ/mol), o kai pH 7,5 (53 ± 7 kJ/mol).

Vienas iš galimų tokių rezultatų paaiškinimų būtų, kad aukštesniuose pH ruožuose (pH 4,5; pH 5,5; pH 6,5; pH 7,5) ir esant mažesnėms GndHCl koncentracijoms reakcijoje dalyvauja natyvos konformacijos baltymas ir tam, kad susidarytų fibrilės, natyvi struktūra turi būti suardyta, todėl reikalinga didesnė aktyvacijos energija. Kai tirpale yra mažesnis pH (pH 2,5; pH 3,5) ar aukštesnės GndHCl koncentracijos HEWL gali būti praradęs savo natyvią struktūrą, todėl, tokiomis sąlygomis, energetinis barjeras reikalingas spontaniniam fibrilių susidarymui nedidelis ir mažai kintantis. Šios hipotezės patikrinimui buvo atlikti HEWL stabilumo tyrimai diferencinės skenavimo kalorimetrijos metodu.

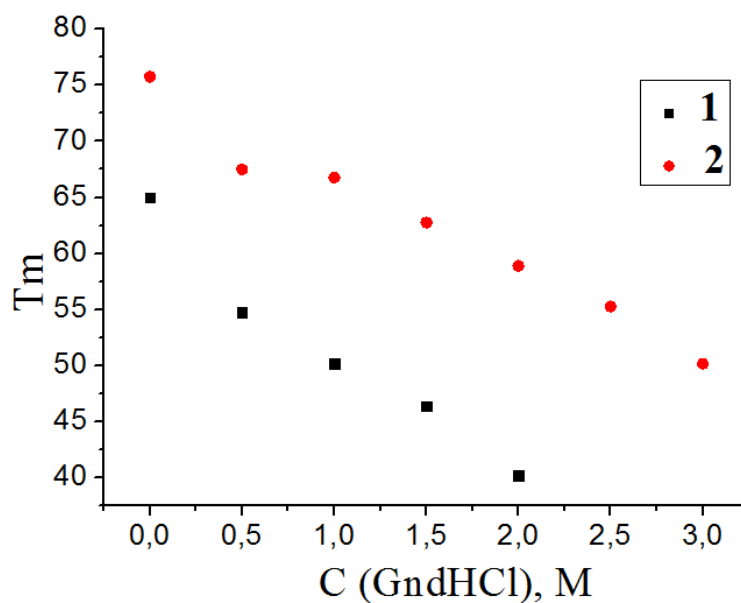


3.12 pav. Aktyvacijos energijos priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos.

3.1.3. Diferencinė skenavimo kalorimetrija

Atlikti HEWL stabilumo tyrimai, nustatant baltymo lydymosi temperatūrą T_m esant skirtingoms GdnHCl koncentracijoms, kai pH 2,5 ir 4,5. Diferencinės skenavimo kalorimetrijos tyrimų rezultatai, pateikiami (3.13 pav.). 3.13 paveiksle matome HEWL denatūracijos temperatūros priklausomybę nuo GndHCl koncentracijos. Šie tyrimai patvirtina hipotezę, kad GndHCl suardo natyvią baltymo struktūrą ir taip mažina fibrilių susidarymo aktyvacijos energiją. Kai reakcijos mišinyje žemas pH (pH 2,5) baltymo denatūracijos

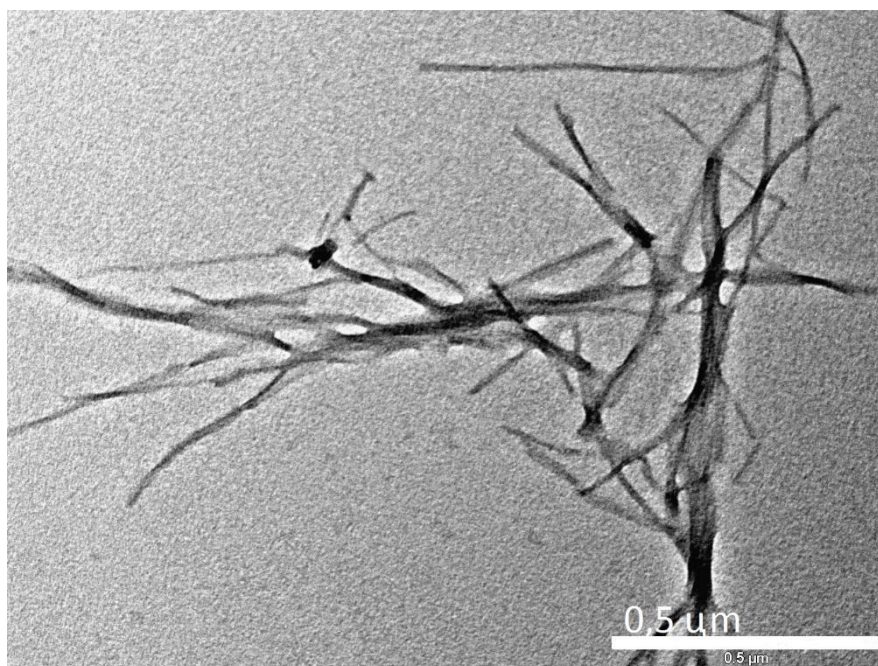
temperatūra neprisidėjus GndHCl yra 65 °C, tai yra mažesnė nei aukštesniuose pH ruožuose (pH 4,5). Galime teigti, kad žemesniame pH baltymo natyvi struktūra jau yra dalinai suardyta, todėl aktyvacijos energijos priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos nėra dėsninga.



3.13 pav. HEWL denatūracijos temperatūros priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos. 1) pH 2,5, 2) pH 4,5.

3.1.4. Elektroninės mikroskopijos rezultatai

Norint įsitikinti, jog tikrai susidaro amiloidiniai agregatai, naudojant elektroninį mikroskopą buvo gauti lizocimo fibrilių vaizdai (3.14 pav.).



3.14 pav. Vištos kiaušinio baltymo lizocimo fibrilės ruoštos 50 mM pH 2,5 fosfatiname buferiniame tirpale, kai GndHCl koncentracija 1 M, 40 °C temperatūroje.

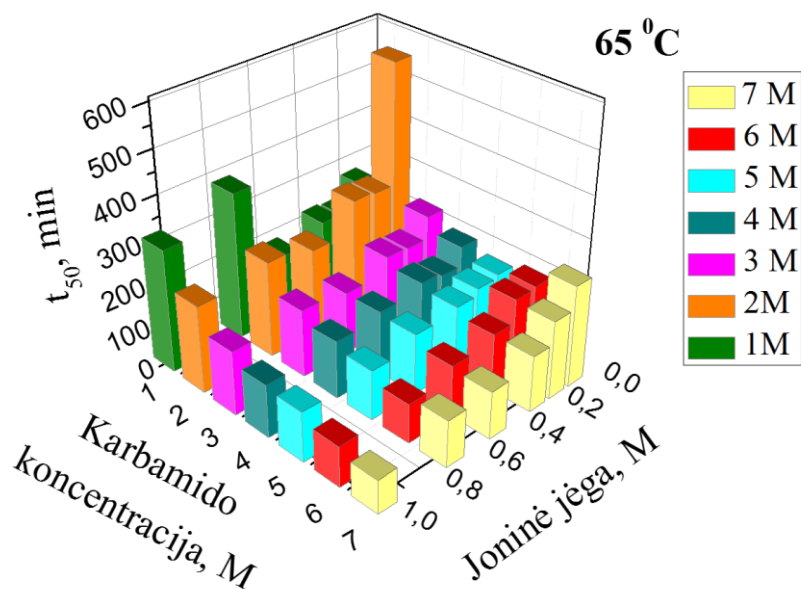
Paveiksle matoma, kad susidariusios fibrilės kartkartėmis apsieja viena kitą ar sulimpa į didesnius darinius.

3.2. Spontantinės agregacijos su karbamidu tyrimas

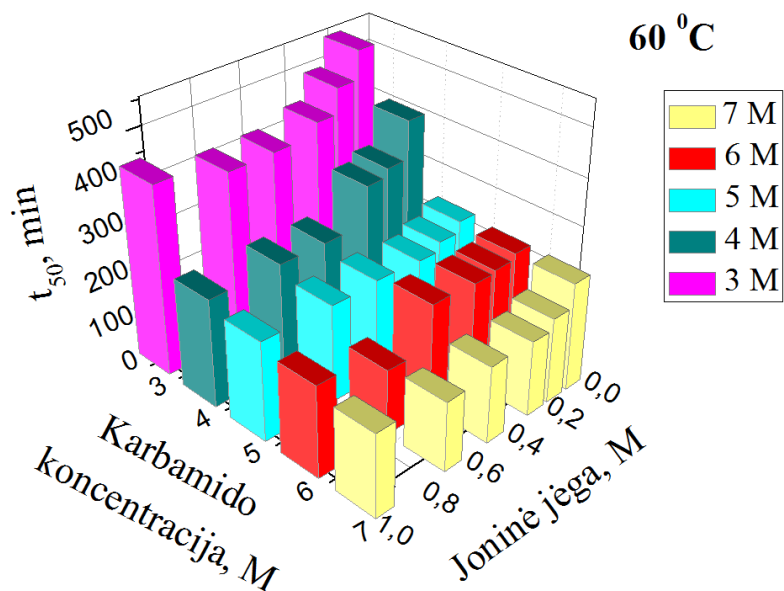
Kad būtų galima atskirti denatūrantų ir joninės jėgos įtaką spontaninei lizocimo agregacijai buvo vykdoma skirtingose karbamido koncentracijose esant skirtingoms joninėms jėgoms 64 mM pH 6,5 fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose 4 temperatūrose (50°C, 55 C, 60°C, 65 C).

3.2.1. Spontantinės agregacijos laiko priklausomybė nuo karbamido koncentracijos ir joninės jėgos

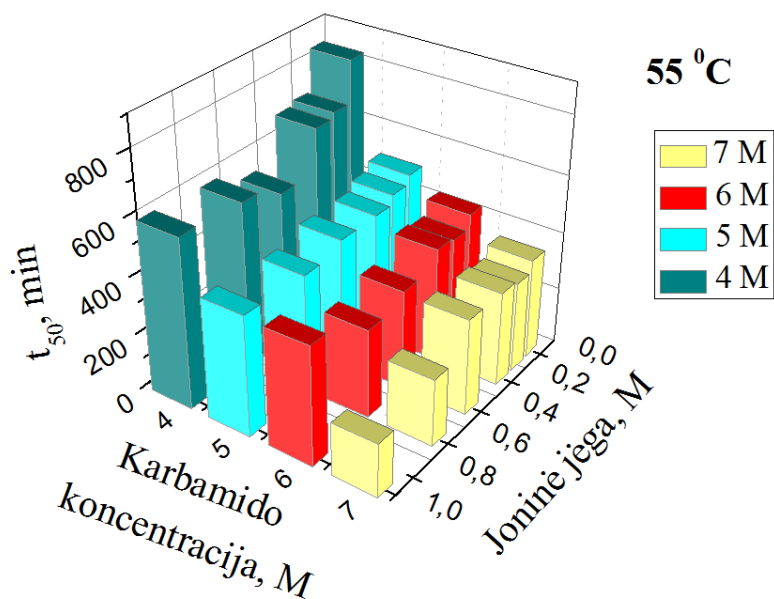
Laikas, per kurį suagregavo 50 % mėginyje esančio baltymo, pateikiamas 3D grafikuose (3.15 pav., 3.16 pav., 3.17 pav., 3.18 pav.), kuriuose matome jo priklausomybę nuo tirpalo joninės jėgos ir karbamido koncentracijos. Iš grafikų matyti, kad greičiausiai spontantinė agregacija vyksta esant didesnei nei 0,3 M joninei jėgai aukštesnėse karbamido koncentracijose. Žemesnėse karbamido koncentracijose spontantinė agregacija greičiausiai vyksta vidutinės joninės jėgos tirpaluose (0,2 M – 0,7 M).



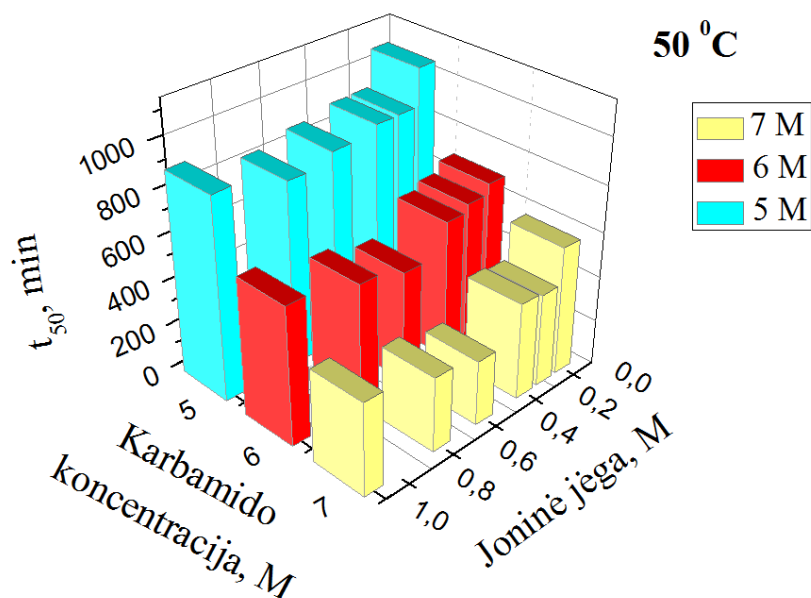
3.15 pav. Laiko, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo, priklausomybė nuo karbamido koncentracijos skirtingos joninės jėgos sąlygomis. Inkubacijos temperatūra 65 °C.



3.16 pav. Laiko, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo, priklausomybė nuo karbamido koncentracijos skirtingos joninės jėgos sąlygomis. Inkubacijos temperatūra 60 °C. Kadangi eksperimento laikas ribotas, nustatyti t_{50} mažesnėse karbamido koncentracijose nepavyko.



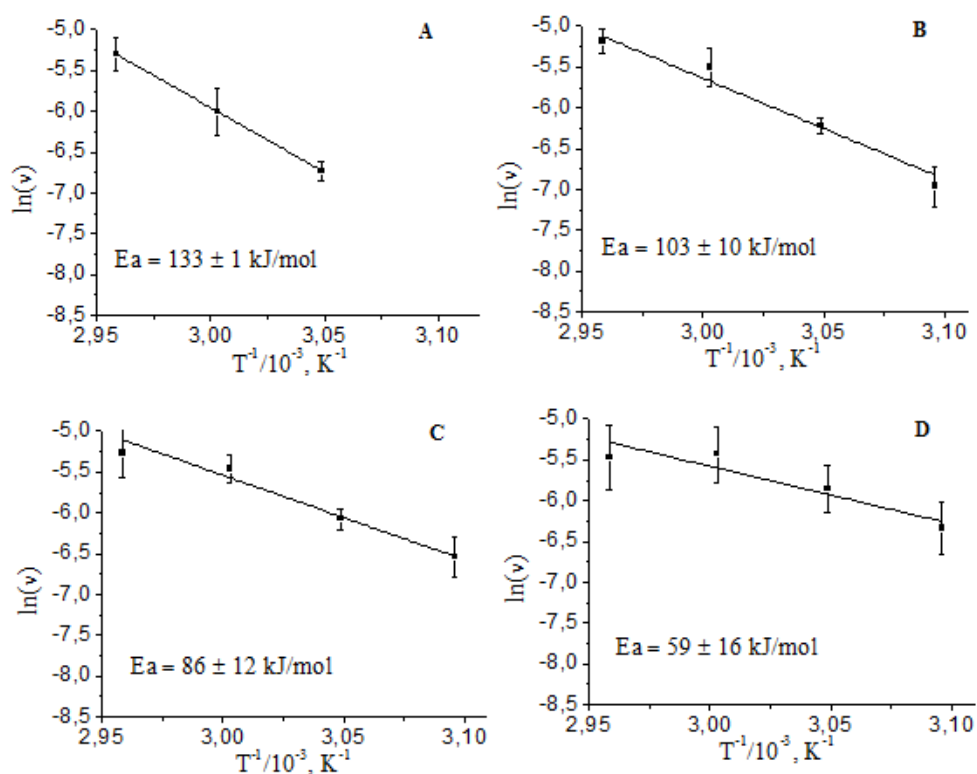
3.17 pav. Laiko, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo, priklausomybė nuo karbamido koncentracijos skirtingos joninės jėgos sąlygomis. Inkubacijos temperatūra 55 °C. Kadangi eksperimento laikas ribotas, nustatyti t_{50} mažesnėse karbamido koncentracijose nepavyko.



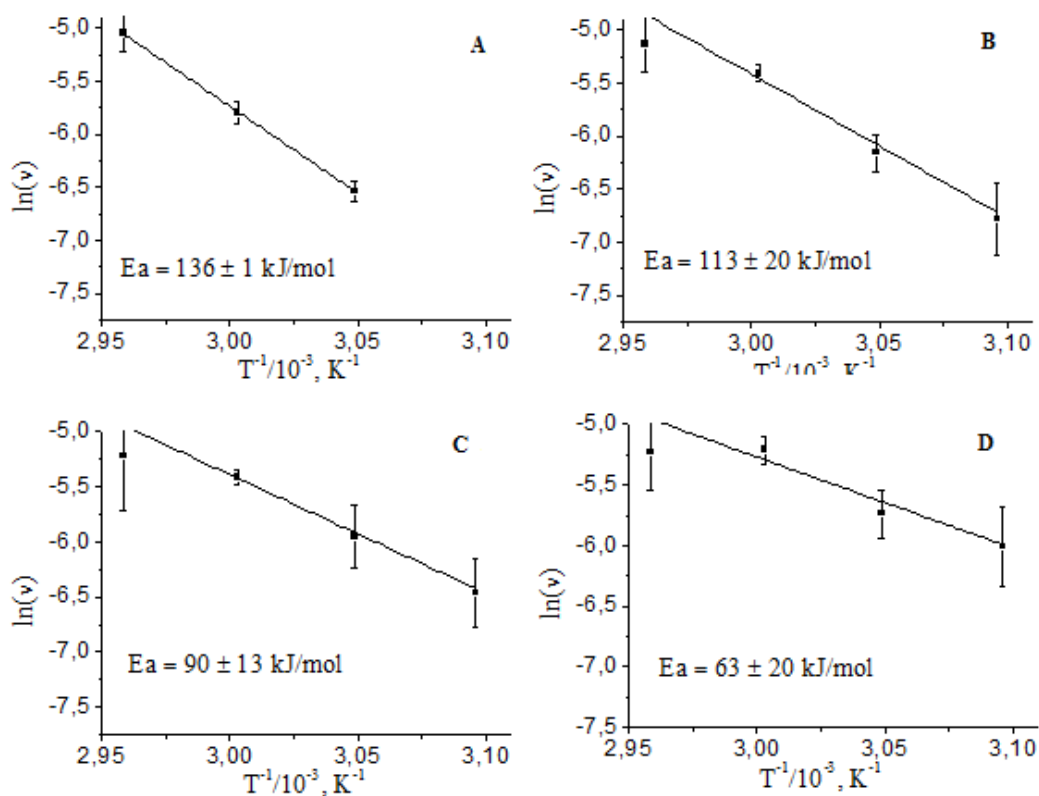
3.18 pav. Laiko, per kurį suagreguoja 50 % mėginyje esančio baltymo, priklausomybė nuo karbamido koncentracijos skirtingos joninės jėgos salygomis. Inkubacijos temperatūra 50 °C. Kadangi eksperimento laikas ribotas, nustatyti t_{50} mažesnėse karbamido koncentracijose nepavyko.

Visais atvejais didėjant karbamido koncentracijai nuo 0 iki 7 M agregacijos laikas trumpėja išskyrus 65 °C temperatūroje esant 0,1 M joninei jėgai. Joninės jėgos įtaka agregacijos laikui nėra vienareikšmiška. 65 °C temperatūroje aukštesnėse karbamido koncentracijose (3–7 M) matoma, kad didėjant joninei jėgai nuo 0,1 iki 1 M agregacijos laikas trumpėja. Žemesnėse karbamido koncentracijose (1–2 M) agregacijos laikas trumpėja joninei jėgai kintant nuo 0,1M iki 0,5 M, stiprėjant joninei jėgai nuo 0,5 iki 1M agregacijos laikas ilgėja. 60 °C temperatūroje esant (5–7 M) karbamido koncentracijai joninė jėga didelės įtakos neturi, o kai karbamido koncentracija 3–4 M agregacijos laikas trumpėja joninei jėgai kintant nuo 0,1M iki 0,5 M, stiprėjant joninei jėgai nuo 0,5 iki 1M agregacijos laikas ilgėja. 55 °C temperatūroje priklausomybė nuo joninės jėgos nevienareikšmiška, tačiau yra matoma, kad joninei jėgai kintant nuo 0,1M iki 0,5 M agregacijos laikas trumpėja. 50 °C matyti, kad agregacijos laikas trumpėja joninei jėgai kintant nuo 0,1M iki 0,5 M, stiprėjant joninei jėgai nuo 0,5 iki 1M agregacijos laikas ilgėja.

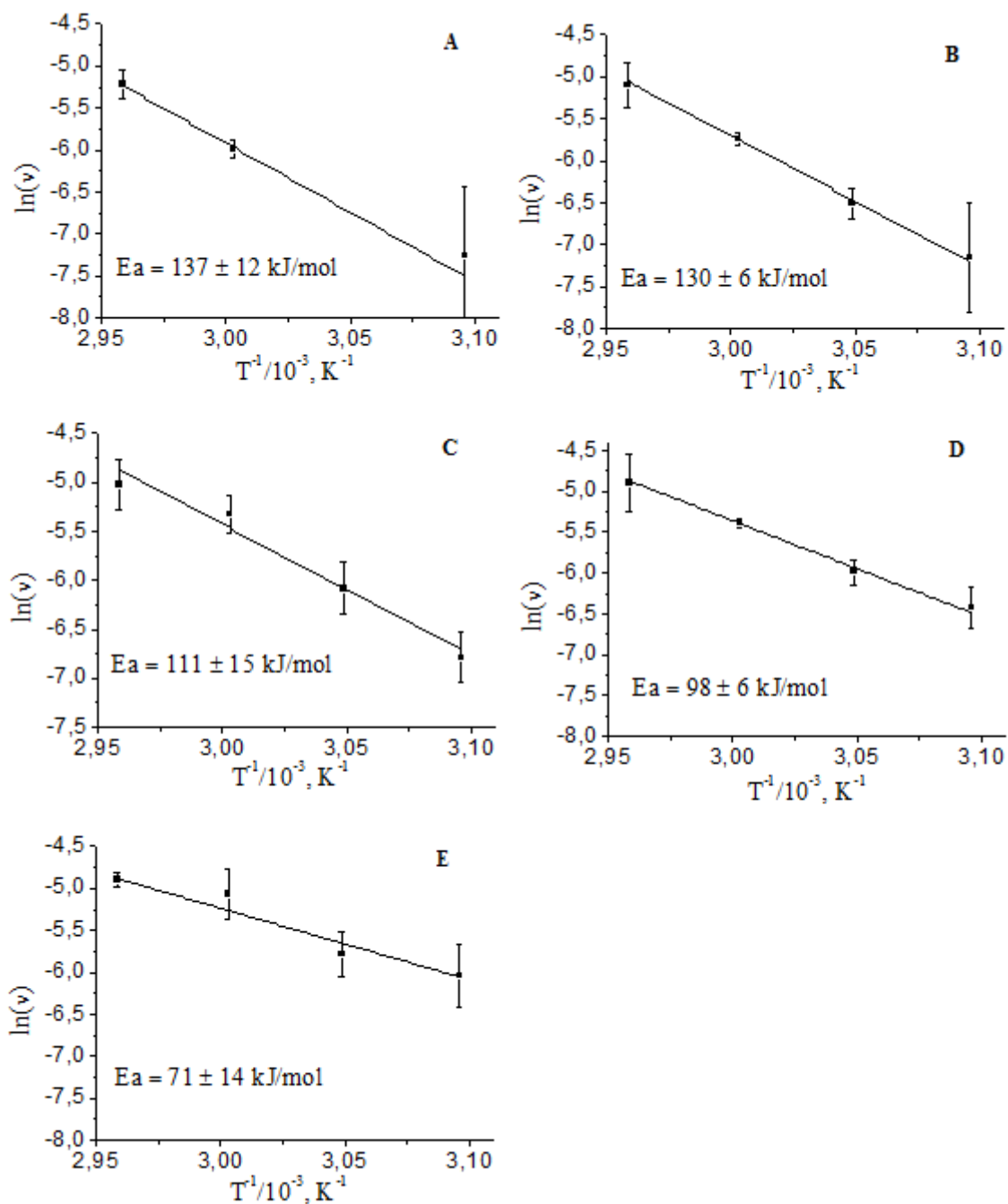
Naudojant apdorotus eksperimentinius duomenis, nubraižyta logaritminio greičio priklausomybė nuo atvirkštinės temperatūros (*Arrhenius* koordinatės) bei apskaičiuotos procesų aktyvacijos energijos esant skirtingoms joninėms jėgoms ir karbamido koncentracijoms (3.19 pav., 3.20 pav., 3.21 pav., 3.22 pav. 3.23 pav, 3.24 pav.). Gautos reikšmės nėra labai tikslios, nes eksperimentiniai duomenys išsibarstę t. y. t turi santykinai nemažas paklaidas.



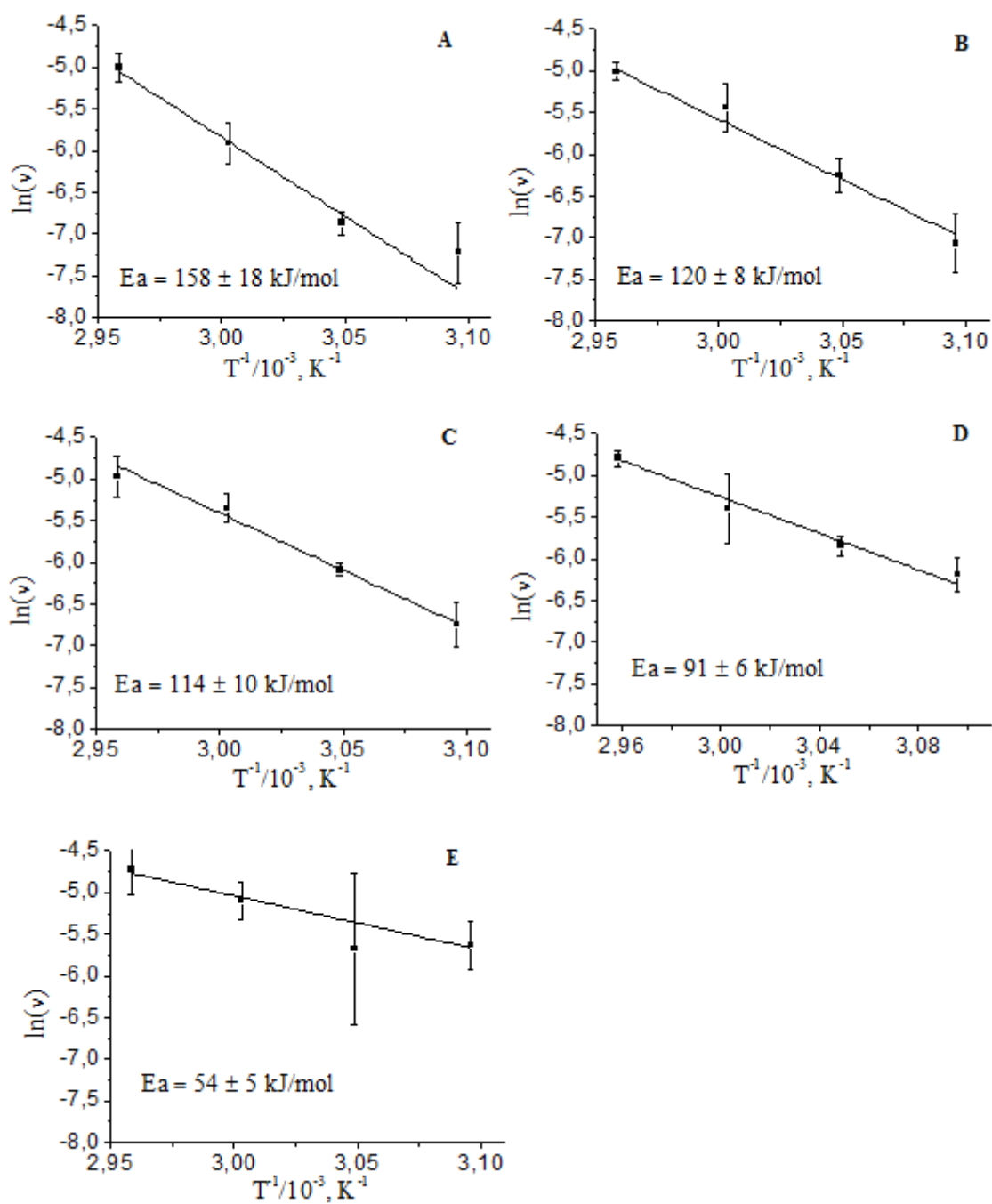
3.19 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose joninė jėga 0,1 M. Karbamido koncentracija A) 4 M, B) 5 M, C) 6 M, D) 7 M.



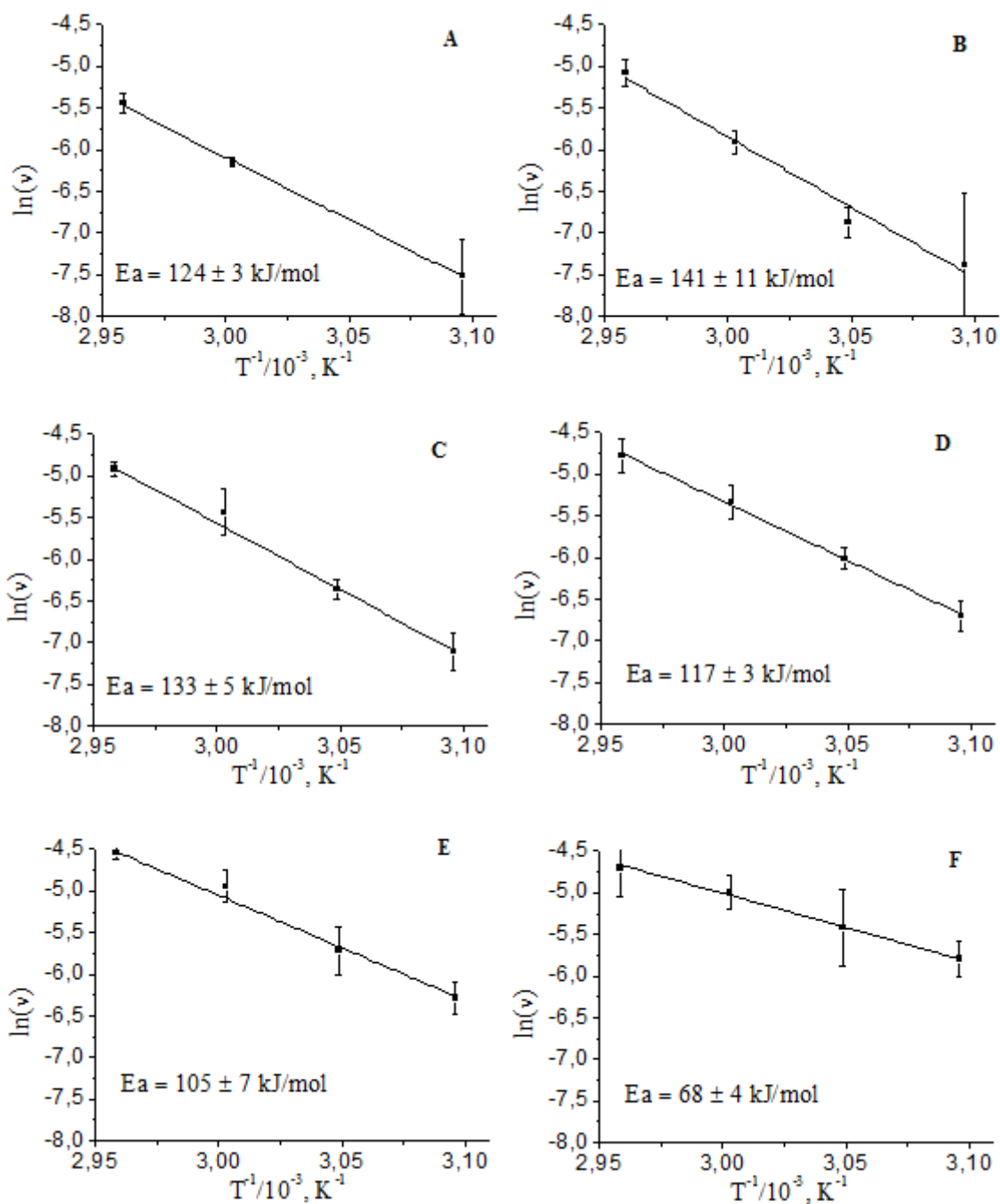
3.20 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose joninė jėga 0,2 M. Karbamido koncentracija A) 4 M, B) 5 M, C) 6 M, D) 7 M.



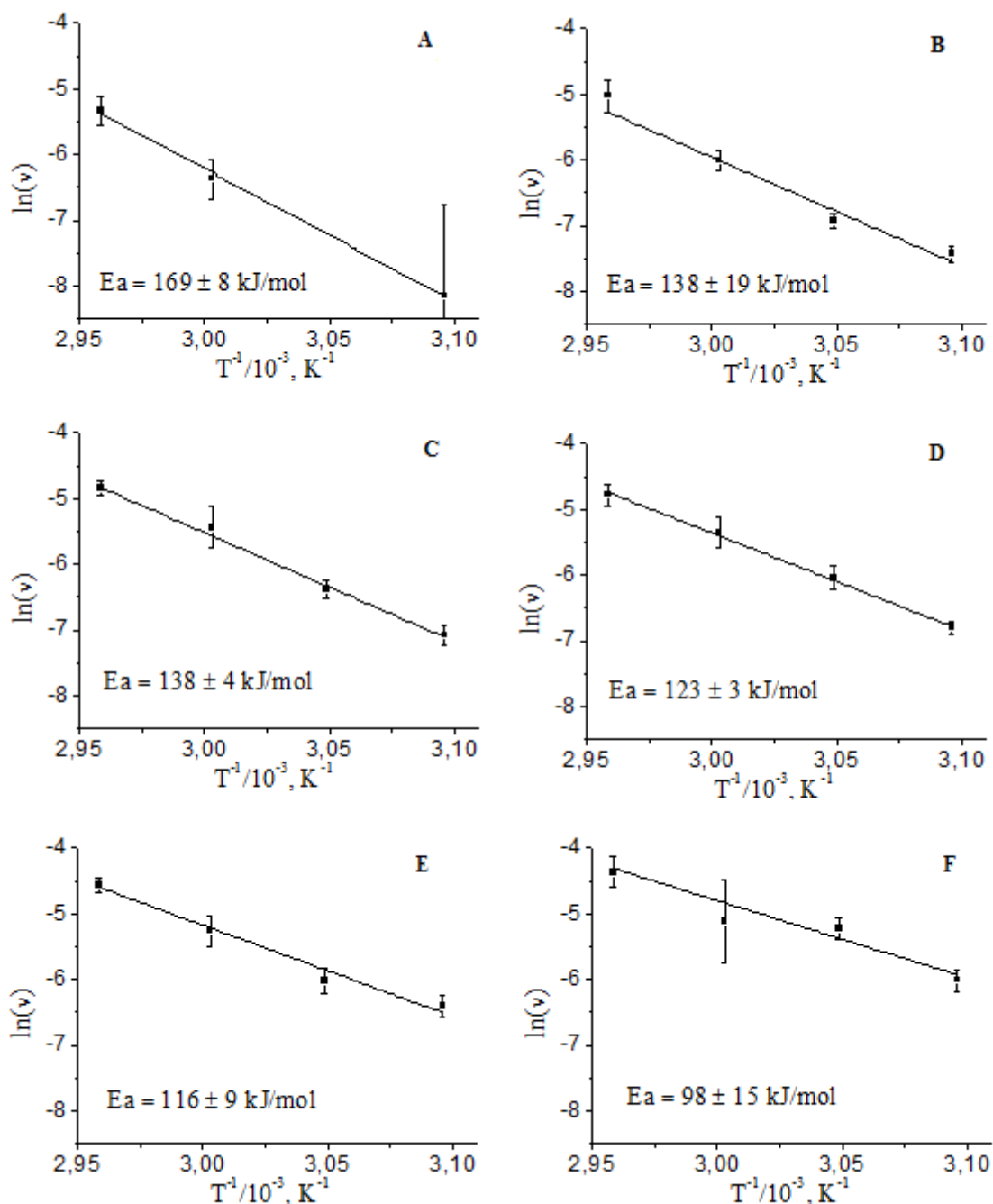
3.21 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose joninė jėga 0,3 M. Karbamido koncentracija A) 3 M, B) 4 M, C) 5 M, D) 6 M, E) 7 M.



3.22 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose joninė jėga 0,5 M. Karbamido koncentracija A) 3 M, B) 4 M, C) 5 M, D) 6 M, E) 7 M.



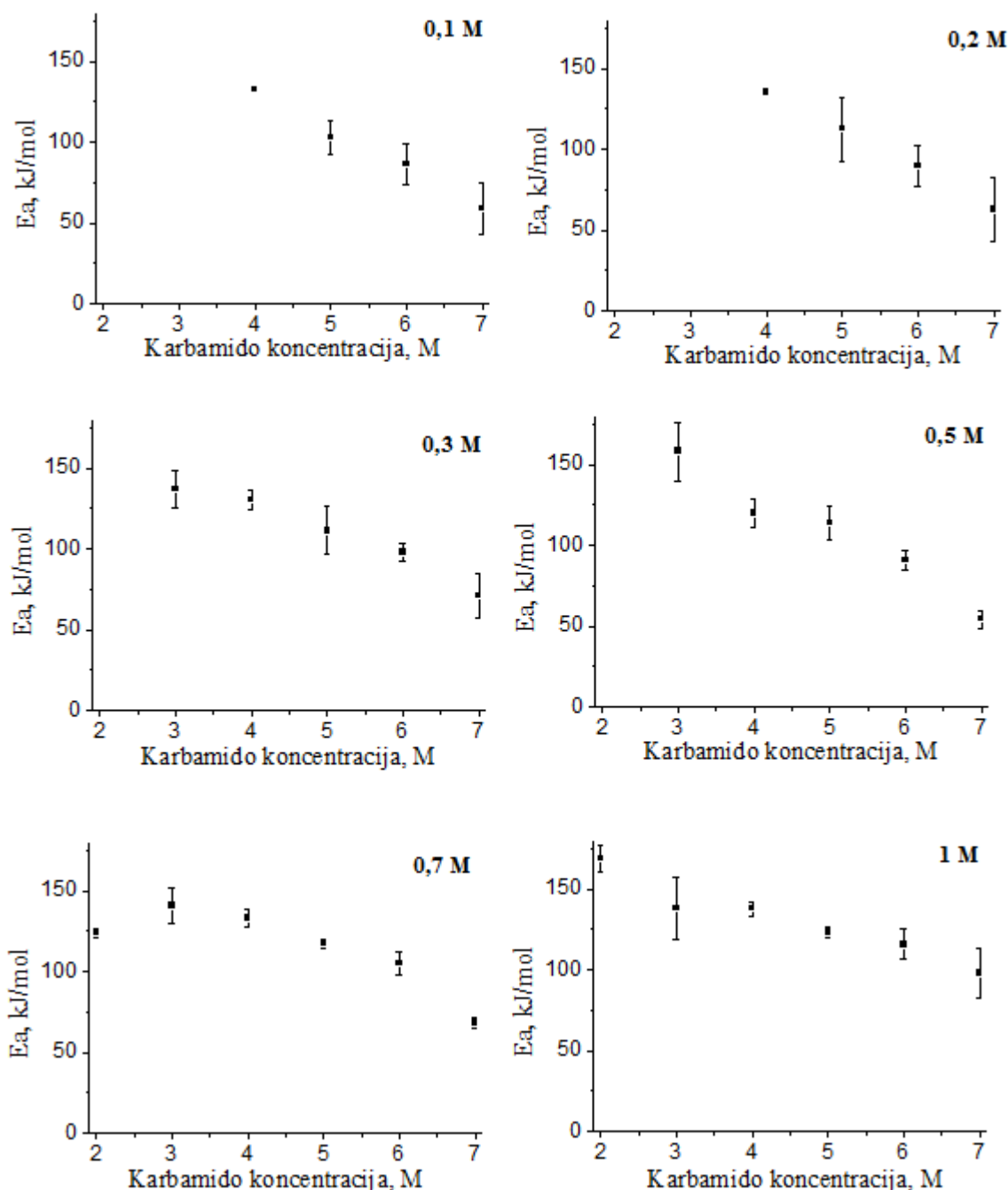
3.23 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose joninė jėga 0,7 M. Karbamido koncentracija A) 2 M, B) 3 M, C) 4 M, D) 5 M, E) 6 M, F) 7 M.



3.24 pav. Savaiminės agregacijos greičiai Arenijaus koordinatėse, aktyvacijos energijos apskaičiuotos iš gautos tiesės nuolinkio. Mėginiuose joninė jėga 0,7 M. Karbamido koncentracija A) 2 M, B) 3 M, C) 4 M, D) 5 M, E) 6 M, F) 7 M.

3.2.2. Aktyvacijos energijos priklausomybė nuo karbamido koncentracijos

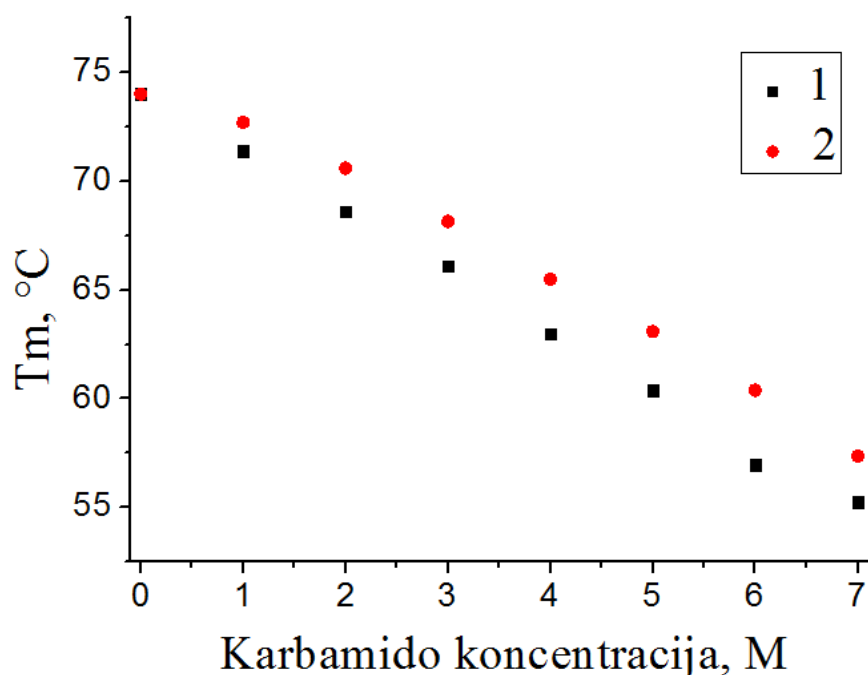
3.25 paveiksle pateikti aktyvacijos energijos priklausomybės nuo karbamido koncentracijos grafikai. Juose matyti, kad didėjant karbamido koncentracijai aktyvacijos energija po truputį mažėja, nepriklausomai nuo joninės jėgos. Žemesnės joninės jėgos reakcijos mišiniam reikalinga didesnė karbamido koncentracija, kad būtų galima stebėti agregaciją.



3.25 pav. Aktyvacijos energijos priklausomybė nuo karbamido koncentracijos. 1) kai joninė jėga 0,1 M; 2) kai joninė jėga 0,2 M; 3) kai joninė jėga 0,3 M; 4) kai joninė jėga 0,5 M; 5) kai joninė jėga 0,7 M; 6) kai joninė jėga 1M.

3.2.3. Diferencinė skenavimo kalorimetrija

Atlikti HEWL stabilumo priklausomybės nuo karbamido koncentracijos tyrimai diferencinės skenavimo kalorimetrijos metodu esant skirtingai joninei jėgai (3.26 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad net pridėjus 7 M karbamido baltymas išsivynioja tik didesnėje nei 55 °C temperatūroje tiek esant mažai (0,1 M), tiek didelei (1 M) joninei jėgai.



3.26 pav. HEWL denatūracijos temperatūros priklausomybė nuo karamido koncentracijos. 64 mM PB pH 6,5. 1) 0,1 M joninė jėga, 2) 1M joninė jėga.

Palyginus spontaninės agregacijos eksperimentus su GndHCl ir su karbamidu, matoma, kad karbamidas daug silpniau inicijuoja HEWL agregaciją nei GndHCl. Žemas pH suardo natyvią baltymo struktūrą, todėl eksperimentų rezultatai nėra dėsningi. Aukštesniuose pH intervaluose stebimas aktyvacijos energijos, reikalingos spontaniniam fibrilių susidaryti, mažėjimas didėjant denatūrantų koncentracijai. GndHCl daug stipresnis denatūrantas nei karbamidas. Eksperimentuose su GndHCl energetinis barjeras pasiekia minimalią ribą ties 3 – 3,5 M koncentracija ir dar labiau didinant denatūrantų koncentraciją jis mažai tesikeičia. Eksperimentuose su karbamidu minimalus energetinis barjeras nėra pasiekiamas. Joninė jėga didelės įtakos spontaninės agregacijos laikui neturi.

IŠVADOS

1. HEWL gali agreguoti į amiloidines struktūras plačiame pH ir denatūrantų koncentracijų ruože.
2. Agregacijos laikas trumpesnis žemesniuose pH ir vidutinėse (3–4 M) guanidino hidroklorido (GndHCl) koncentracijose.
3. Lizocimo agregacijos laikas trumpėja, didinant karbamido koncentraciją nuo 0 iki 7 M ir joninę jėgą nuo 0,1 iki 0,5 M.
4. Nustatyta fibrilių susidarymo aktyvacijos energijos priklausomybė nuo pH ir denatūrantų koncentracijos. Išsiaiškinta, kad ši priklausomybė atsiranda dėl lizocimo denatūracijos.

LITERATŪRA

1. Biancalana, M., Koide, S. 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*. vol. 1804, p. 1405–12.
2. Biancalana, M., Makabe, K., *et al.* 2008. Aromatic cross-strand ladders control the structure and stability of beta-rich peptide self-assembly mimics. *J Mol Biol*. vol. 383, p. 205–213.
3. Booth, D. R., Sunde, M., *et al.* 1997. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*. vol. 385, p. 787–793.
4. Burns, C., Aronoff-Spencer, E., *et al.* 2002. Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry*. vol. 41, p. 3991–4001.
5. Chatani, E., Ohnishi, R., *et al.* 2010. Pre-steady-state kinetic analysis of the elongation of amyloid fibrils of beta(2)-microglobulin with tryptophan mutagenesis. *J Mol Biol*. vol. 400, p. 1057–1066.
6. Chiti, F., Dobson, C. M. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annual Review of Biochemistry* vol. 75, p. 333–366.
7. Cushman, M., Johnson, B. S., *et al.* 2010. Prion-like disorders blurring the divide between transmissibility and infectivity, *Journal of Cell Science* vol. 123, p. 1191–1201.
8. Dobson, C. M., Evans, P. A., *et al.* 1994. Understanding how protein fold: the lysozyme story so far. *Trends Biochem. Sci.* vol. 19, p. 31–37.
9. Dumoulin, M., Last, A. M., *et al.* 2003. A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature*. vol. 424, p. 783–788.
10. Fleming, A. 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. R. Soc. Lond. B.* vol. 93, p. 306–317.
11. Groenning, M., Norrman, M., *et al.* 2007. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. *J Struct Biol*. vol. 159, p. 483–497.
12. Groenning, M., Olsen, L., *et al.* 2007. Study on the binding of Thioflavin T to beta-sheet-rich and non-beta-sheet cavities. *J Struct Biol*. vol. 158, p. 358–369.
13. Harrison, R. S., Sharpe, P.C., *et al.* 2007. Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. vol. 159, p. 1–77.
14. Jolles, P. 1960. Lysozyme. In: The ‘‘Enzymes’’, Boyer, P., Lardy, D., and Myrback, K. (Eds.) *Academic Press*. vol. 4, p. 431–445.
15. Jolles, P. 1964. Recent developments in the study of lysozymes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* vol. 3, p. 28–36.
16. Khurana, R., Coleman, C., *et al.* 2005. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* vol. 151, p. 229–38.

17. Krishnamurthy, V. M., Kaufman, G. K. *et al.* 2008. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein–Ligand Binding. *Chemical Reviews*. vol. 108, p. 946–1051.
18. Lee, C., Nayak, A., *et al.* 2007. A Three-Stage Kinetic Model of Amyloid Fibrillation, *Biophysical Journal* vol. 92, p. 3449–3458.
19. LeVine, H. 3rd. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer’s disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* vol. 2, p. 404–410.
20. Maji, S. K., Wang, L., *et al.* 2009. Structure-activity relationship of amyloid fibrils. *FEBS Lett.* vol. 583, p. 2610–2607
21. Makin, O. S., Serpell, L. C. 2005. Structures for amyloid fibrils. *FEBS Journal.* vol. 272, p. 5950–5961.
22. Marshall, K. E., Serpell, L. C. 2009. Insights into the Structure of Amyloid Fibrils. *Open Biol J.* vol. 2, p. 185–192.
23. Mauro, M., Craparo, E. F., *et al.* 2007. Kinetics of Different Processes in Human Insulin Amyloid Formation, *J. Mol. Biol.* vol. 366, p. 258–274.
24. Merlini, G., Bellotti, V. 2003. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* vol. 349, p. 583–596.
25. Milto, K., Botyriute, A., *et al.* 2013. Amyloid-Like Fibril Elongation Follows Michaelis Menten Kinetics, *PLoS ONE* vol. 8, p. 6864–6867.
26. Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., *et al.* 2000. Signal transduction through prion protein. *Science.* vol. 289, p. 1925–1928.
27. Naiki, H., Higuchi, K., *et al.* 1989. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem.* vol. 177, p. 244–249.
28. Nielsen, L., Khurama, R., *et al.* 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation elucidation of the molecular mechanism, *Biochemistry* vol. 40, p. 6036–6046.
29. Ohnishi, S., Takano, K. 2003. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding, *Cell. Mol. Life Sci.* vol. 61, p. 511–524.
30. Pepys, M. B., Hawkins, P. N., *et al.* 1993. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature.* vol. 362, p. 553–557.
31. Puchtler, H., Sweat, F. 1965. Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem.* vol. 13, p. 693–694.
32. Sabaté, R., Lascu, I., *et al.* 2008. On the binding of Thioflavin-T to HET-s amyloid fibrils assembled at pH 2. *J Struct Biol.* vol. 162, p. 387–396.
33. Sabate, R., Rodriguez-Santiago, L., *et al.* 2013. Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. *Chem Commun.* vol. 49, p. 5745–5747.

34. Sipe, J. D., Cohen, A.S. 2000. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol.* vol. 130, p. 88–98.
35. Smirnovas, V., Baron, G. S., *et al.* 2011. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol.* vol. 18, p. 504–506.
36. Stefani, M., Dobson, C. M. 2003. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of molecular medicine.* vol. 81, p. 678–699.
37. Swaminathan, R., Ravi, V. K., *et al.* 2011. Lysozyme: a model protein for amyloid research, *Adv Protein Chem Struct Biol.* vol. 84, p. 63–111.
38. Vassar, P. S., Culling, C. F. 1959. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol.* vol. 68, p. 487–498.
39. Wetter, L. R., Deutsch, H. F. 1951. Immunological studies on egg white proteins IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. *J. Biol. Chem.* vol. 192, p. 237–242.
40. Zhang, D., Neumann, O., *et al.* 2009. Gold nanoparticles can induce the formation of protein-based aggregates at physiological pH. *Nano Lett.* vol. 9, p. 666–671.

1 Priedas. Buferinių tirpalų su skirtinga jonine jėga ir karbamido koncentracija ruošimas

Joninė jėga, M	Karbamido koncentracija, M	1 Buferinis tirpalas, ml	2 Buferinis tirpalas, ml	3 Buferinis tirpalas, ml
0,1	0	-	-	2
	1	-	0,225	1,775,
	2	-	0,450	1,550
	3	-	0,675	1,325
	4	-	0,900	1,100
	5	-	1,125	0,875
	6	-	1,35	0,65
	7	-	1,575	0,425
0,2	0	0,04	-	1,960
	1	0,04	0,225	1,736
	2	0,04	0,450	1,511
	3	0,04	0,675	1,286
	4	0,04	0,900	1,061
	5	0,04	1,125	0,836
	6	0,04	1,35	0,611
	7	0,04	1,575	0,386
0,3	0	0,08	-	1,920
	1	0,08	0,225	1,696
	2	0,08	0,450	1,471
	3	0,08	0,675	1,246
	4	0,08	0,900	1,021
	5	0,08	1,125	0,796
	6	0,08	1,35	0,571
	7	0,08	1,575	0,34
0,5	0	0,16	-	1,84
	1	0,16	0,225	1,614
	2	0,16	0,450	1,389
	3	0,16	0,675	1,164
	4	0,16	0,900	0,939
	5	0,16	1,125	0,714
	6	0,16	1,35	0,489
	7	0,16	1,575	0,264
0,7	0	0,24	-	1,76
	1	0,24	0,225	1,532
	2	0,24	0,450	1,307
	3	0,24	0,675	1,082
	4	0,24	0,900	0,857
	5	0,24	1,125	0,632
	6	0,24	1,35	0,407
	7	0,24	1,575	0,182
1	0	0,37	-	1,63
	1	0,37	0,225	1,407
	2	0,37	0,450	1,182
	3	0,37	0,675	0,957
	4	0,37	0,900	0,732
	5	0,37	1,125	0,507
	6	0,37	1,35	0,282
	7	0,37	1,575	0,057

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju baigiamojo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui, taip pat Linai Baranauskienei ir Tomui Šneideriui už suteiktas žinias, naudingus patarimus bei pastabas baigiamojo bakalauro darbo metu.