

Uniwersytet Warszawski

Wydział Chemii



BADANIE CHIRALNYCH SUPERSTRUKTUR AMYLOIDOWYCH

VIKTORIA BABENKO

Praca doktorska zrealizowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w ramach Międzywydziałowych Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich pod kierunkiem dr hab., prof. UW Wojciecha Dzwolaka, i prof. dr hab. Krzysztofa Woźniaka

Warszawa, 2014

Serdecznie dziękuję

Moim promotorom - dr hab., prof. UW Wojciechowi Dzwolakowi i prof. dr hab. Krzysztofowi Woźniakowi za umożliwienie realizacji pracy doktorskiej, życzliwość i przekazaną wiedzę

Prof. Timothy Keiderlingowi za opiekę naukową w trakcie pobytu badawczego i wartościowe dyskusje oraz Ge Zhang za serdeczność i pomoc przy wykonywaniu pomiarów

Prof. Alison Rodger za przyjęcie na pobyt badawczy i pomoc w pracach eksperymentalnych

Wszystkim osobom, z którymi miałam okazję pracować w laboratorium za cenne wskazówki i miłą atmosferę

Dziękuję również rodzinie i bliskim mi osobom za wsparcie

Praca ta powstała dzięki środkom finansowym pochodzącym z grantów:

NCN 2011/03/N/ST4/00736 (VB)

MNiSW NN 301 101236 (WD)

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	7
1. WSTĘP	9
2. PODSTAWY TEORETYCZNE	11
2.1 Amyloidy – historia odkrycia i obecny stan wiedzy	11
2.2 Przebieg agregacji i struktura włókien amyloidowych.....	15
2.3 Hierarchiczna organizacja fibryli amyloidowych.....	21
2.4 Chiralność struktur amyloidowych.....	25
2.5 Chiralne superstruktury	28
2.5.1 Insulina.....	28
2.5.2 Amyloidogeneza insuliny	30
2.5.3 Chiralne aspekty agregacji insuliny.....	34
3. METODY BADAWCZE	41
3.1 Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni z transformacją Fouriera	41
3.2 Spektroskopia UV-Vis.....	44
3.3 Spektroskopia dichroizmu liniowego (LD).....	44
3.4 Spektroskopia dichroizmu kołowego	45
3.4.1 Elektronowy dichroizm kołowy.....	47
3.4.2 Wibracyjny dichroizm kołowy.....	49
3.4.3 Indukowany dichroizm kołowy	50
3.5 Spektroskopia fluorescencyjna	51
3.6 Mikroskopia fluorescencyjna i w świetle spolaryzowanym	56
3.7 Mikroskopia sił atomowych (AFM)	57
3.8 Procedury pomiarowe.....	59
3.9 Lista odczynników	61
4. BADANIA WŁASNE I DYSKUSJA UZYSKANYCH WYNIKÓW	63
4.1 Dichroizm kołowy indukowany w sondach molekularnych jako źródło informacji o strukturze	63
4.1.1 Pomiar dichroizmu kołowego tioflawiny T interkalującej w β -kartkowych agregatach zbudowanych z kwasu pol-L- lub poli-D glutaminowego.....	64
4.1.2 Analiza dichroizmu kołowego indukowanego w tioflawinie T w trakcie przejścia kwasu poliglutaminowego ze struktury typu kłębek statystyczny w α -helisę.....	65
4.2 Weryfikacja sygnałów dichroizmu kołowego próbek chiralnych agregatów.....	69
4.2.1 Analiza porównawcza widm absorpcyjnych i dichroizmu kołowego w zakresie UV-Vis barwników interkalujących we włóknach amyloidowych	69
4.2.2 Badania izotropowości optycznej superstruktur amyloidowych insuliny.....	71

4.2.3	Obrazowanie chiralnych superstruktur w świetle spolaryzowanym	75
4.2.4	Badanie możliwej roli różnicowego rozpraszania światła w genezie sygnału ICD superstruktur amyloidu insuliny	76
4.3	Wpływ warunków fizykochemicznych na agregację insuliny i asocjację w chiralne superstruktury	79
4.3.1	Analiza wpływu stężenia NaCl na agregację insuliny	80
4.3.1.1	Kinetyczny pomiar wpływu NaCl na szybkość agregacji insuliny	80
4.3.1.2	Agregacja insuliny wołowej przy różnych stężeniach NaCl pod nieobecność mieszania.....	81
4.3.2	Rola mieszania i anionów chlorkowych w chiralnej ścieżce agregacji	86
4.3.3	Analiza zmiana w przebiegu chiralnej agregacji pod wpływem różnego doboru parametrów fizykochemicznych.	87
4.3.3.1	Przebieg chiralnej agregacji przy różnych stężeniach NaCl.....	87
4.3.3.2	Przebieg chiralnej agregacji przy udziale różnych soli chlorkowych.....	88
4.3.3.3	Przebieg chiralnej agregacji w roztworach elektrolitów pozbawionych jonów chlorkowych	89
4.3.3.4	Wpływ pD na przebieg chiralnej agregacji.....	91
4.4	Uwarunkowania struktury pierwszorzędowej pozwalające na tworzenie się chiralnych agregatów typu +ICD i -ICD	93
4.4.1	Agregacja pojedynczych łańcuchów A i B insuliny wołowej z udziałem wytrząsania oraz przy jego braku.....	94
4.4.2	Agregacja peptydu LVEALYLV kluczowego w tworzeniu się fibryli insulinowych w warunkach prowadzących do powstania chiralnych superstruktur.....	98
4.4.3	Agregacja różnych białek prekursorowych oraz wariantów insuliny w warunkach prowadzących do powstania chiralnych superstruktur	100
4.4.4	Wpływ peptydów C-końcowych na przebieg chiralnej agregacji.....	102
4.5	Badania stabilności chiralnych superstruktur w dimetylosulfotlenku jako sposób wnioskowania o poziomie strukturalnym amyloidu, na którym pojawia się chiralny polimorfizm.....	104
4.5.1	Dysocjacja chiralnych superstruktur w DMSO	105
4.5.2	Analiza wpływu sonikacji i wymywania NaCl na stabilność chiralnego agregatu +ICD....	109
5.	WNIOSKI	111
6.	PODSUMOWANIE.....	123
7.	BIBLIOGRAFIA.....	125
	Wykaz publikacji autora	141
	Lista osiągnięć naukowych autora	142

Wykaz stosowanych skrótów

AC – *2-anthracenecarboxylate* – antraceno-2-karboksylan

AFM – *atomic force microscopy* – mikroskopia sił atomowych

CD – *circular dichroism* – dichroizm kołowy

CJD – *Creutzfeldt-Jakob disease* – choroba Creutzfeldta-Jakoba

DMSO – *dimethyl sulfoxide* - dimetylosulfotlenek

FT-IR – *Fourier transform infrared (spectroscopy)* – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

GdnHCl - chlorowodorek guanidyny

ICD – *induced circular dichroism* – indukowany dichroizm kołowy

cryo-EM – kriomikroskopia elektronowa

LD – *linear dichroism* – dichroizm liniowy

PGA – *polyglutamic acid* – kwas poliglutaminowy

SAA - surowiczy amyloid A

TCEP – *tris(2-carboxyethyl)phosphine* – tris(2-chloroetylo)fosforan

ThT – tioflawina T

TrisHCl - chlorowodorek tris(hydroksymetylo)aminoetanu

VCD – *vibrational circular dichroism* – wibracyjny dichroizm kołowy

1. WSTĘP

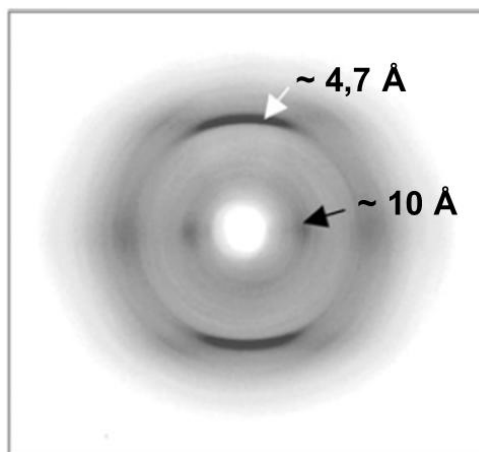
W pewnych warunkach białka ulegają nieprawidłowemu zwijaniu, co może prowadzić do powstania β -karkowych fibryli amyloidowych. Zjawisko to jest związane z przebiegiem szeregu chorób, takich jak choroba Alzheimera czy choroba Creutzfeldta-Jakoba, ale także z pożytecznymi procesami zachodzącymi w organizmach. Zarówno przebieg amyloidogenezy jak i struktura włókien amyloidowych nie są dostatecznie opisane, co czyni proces agregacji białek niezwykle ciekawym tematem badawczym o ważnych implikacjach biomedycznych.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej dotyczyły szczególnego aspektu agregacji białek – powstawania chiralnych superstruktur. Są to wysoce uporządkowane asocjaty włókien amyloidowych, wykazujące anomalnie intensywne widma dichroizmu kołowego. Ich chiralooptyczne właściwości mogą być obserwowane w elektronowym i wibracyjnym zakresie promieniowania oraz przy pomocy zewnętrznych znaczników interkalujących w tych strukturach. Celem przeprowadzonych prac eksperymentalnych było bliższe scharakteryzowanie procesu chiralnej agregacji oraz wyjaśnienie obserwowanych efektów chiralooptycznych. W badaniach wykorzystana została szeroka paleta metod biofizycznych – m.in. spektroskopia dichroizmu kołowego, spektroskopia FT-IR, kinetyczne pomiary z wykorzystaniem markerów fluorescencyjnych specyficznych wobec amyloidów, spektroskopia wibracyjnego dichroizmu kołowego czy wreszcie mikroskopia sił atomowych. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie roli wybranych czynników fizykochemicznych – takich jak obecność anionów – oraz szczególnych cech struktury kowalencyjnej insuliny w powstawaniu tego rodzaju struktur. Dokonano także analizy źródeł sygnału dichroizmu kołowego sondy molekularnej wiążącej się z agregatami białkowymi – tioflawiny T oraz zbadano relację tych informacji o chiralności próbki z sygnałami w zakresie podczerwieni pochodzącym od samych chiralnych agregatów. Rezultaty tych badań przekładają się na pełniejsze zrozumienie szczególnego rodzaju samoorganizacji molekularnej prowadzącej do nietypowych form strukturalnych białek i polipeptydów.

2. PODSTAWY TEORETYCZNE

2.1 Amyloidy – historia odkrycia i obecny stan wiedzy

Już w XVII wieku pojawiały się pierwsze wzmianki na temat „twardych białych kamieni w śledzionie” oraz „woskowej wątroby” obserwowanych *post mortem* w organach chorych [Boneti, 1679]. Początkowo, ze względu na ich wygląd, proponowano tłuszczową lub węglowodanową genezę złogów. Stąd też pochodzi nazwa *amyloid* wprowadzona w 1854 roku przez Rudolpha Virchowa, który zaobserwował wybarwienie amyloidu w tkankach mózgu przez jodynę, podobnie jak ma to miejsce w przypadku skrobi (lat. *amylum*) [Virchow, 1854]. Ostatecznie, w 1859 roku, Friedreich i Kekule wykazali białkowe pochodzenie złogów amyloidowych [Friedreich, 1859]. W kolejnych latach zaobserwowano występowanie amyloidowych skupisk w wielu innych tkankach i skorelowano je z szeregiem chorób. Jednym z istotnych odkryć było powiązanie w 1906 r. przez Aloisa Alzheimerera obecności agregatów białkowych w mózgu jego pacjentki ze zdiagnozowaną za jej życia chorobą umysłową, którą określilibyśmy dziś jako chorobę Alzheimerera. Zastosowanie selektywnego barwnika – czerwieni Kongo [Bennhold, 1922] – począwszy od 1922 roku pozwoliło uzyskać pierwsze informacje strukturalne o amyloidach. Zaobserwowano dwójtomność wybarwionych złogów w świetle spolaryzowanym [Divry, 1927], co wbrew wcześniejszym przypuszczeniom sugerowało ich ustrukturyzowany a nie amorficzny charakter. Jednak największy rozwój w badaniach nad amyloidami nastąpił później, wraz z rozwojem metod biologii strukturalnej. Istotną rolę odegrał postęp w rozumieniu struktury przestrzennej białek, a w szczególności zaproponowane przez Linusa Paulinga i współpracowników podstawowe motywy struktur II-rzędowych: α -helisy oraz β -kartki [Pauling, 1951a; Pauling 1951b]. Eksperymentalne potwierdzenie tych modeli pojawiło się w kolejnych latach podczas analizy krystalograficznej białek globularnych: mioglobiny [Kendrew, 1958] oraz lizozymu z białka jaja kurzego [Blake, 1965]. Odkrycia te były niezwykle ważne dla zrozumienia struktury amyloidów, co jednak zostało poprzedzone obserwacją ich fibrylnej morfologii. Doniesienia o włóknach amyloidowych o średnicy rzędu 20 nm i o mikrometrowych długościach pojawiały się już latach 40-tych w pracach Waugha [Waugh, 1944]. Następnym znaczącym krokiem w charakteryzowaniu struktur amyloidowych było uzyskanie motywu *cross- β* na dyfraktogramach pochodzących z rentgenografii proszkowej [Eanes, 1968]. Dwa prostopadłe prążki przy 4,75 Å i 9,8 Å uzyskiwane dla próbek uporządkowanych sugerują, że odpowiadają one ortogonalnym periodycznościom w fibrylach. Powiązano je ze znanymi już odległościami charakterystycznymi dla struktur białkowych [Pauling, 1953], odpowiednio: odległością pomiędzy łańcuchami polipeptydowymi w płaszczyźnie β -kartki oraz odległością pomiędzy sąsiadującymi β -kartkami. W ten sposób udało się poznać strukturę II-rzędową białek budujących włókna amyloidowe. Te trzy metody badawcze: wybarwienie czerwienią Kongo, obrazowanie mikroskopowe fibryli oraz rejestracja motywu *cross- β* w dyfrakcji proszkowej ukonstytuowały



Rys. 1 Obraz rentgenograficzny otrzymany dla wariantu drożdżowego białka prionowego Sup35 NM [Slotta, 2007].

kryteria rozpoznania amyloidów. W tym samym czasie badano już próbki amyloidowe pochodzące nie tylko z tkanek pacjentów, ale także uzyskiwane *in vitro*. Jak się okazało, miały one podobne obrazy krystalograficzne i również wykazywały dwójłomność po zabarwieniu czerwienią Kongo [Glennner, 1974], co sugerowało podobieństwo strukturalne z włóknami powstającymi *in vivo*. Dodatkowo zaobserwowano dwie bardzo istotne cechy amyloidów świadczące o dużej ich trwałości: nierozpuszczalność w warunkach fizjologicznych [Glennner, 1968] oraz odporność na trawienie enzymami proteolitycznymi [Sorenson, 1964].

Kliniczne próbki złogów amyloidowych analizowane przez badaczy pochodziły jak dotąd od pacjentów cierpiących na amyloidozy układowe, a więc z organów takich jak śledziona, wątroba czy nerki. Wraz z rozwojem technik oczyszczania i sekwencjonowania białek udało się rozpoznać poszczególne białka, których agregacja była powiązana z etiologią tych chorób [Glennner, 1971; Benditt, 1971; Sletten, 1976]. W kolejnych latach powiązano także inne choroby, między innymi niektóre choroby neurodegeneracyjne, z procesem amyloidogenezy i zidentyfikowano odpowiadające im prekursorzy białkowe. Do najpowszechniejszych chorób powiązanych z amyloidami należy choroba Alzheimera, której jedną z przyczyn jest agregacja peptydu A β [Glennner, 1984] oraz pasażowalne encefalopatie gąbczaste, t. j. choroba Creutzfeldta-Jakoba (CJD) lub choroba kłusowa u kóz i owiec (ang. *scrapie*) wywoływane nagromadzeniem się β -karkowych białek prionowych [Bolton, 1982]. Czynniki infekcyjnych w tych chorobach był badany intensywnie w latach 60-tych i 70-tych przez Gajduska [Gajdusek, 1972], natomiast samo pojęcie prionu zostało wprowadzone w 1982 roku przez Stanleya Prusiner, kiedy to opisano białkową cząsteczkę zakaźną, wywołującą CJD [Prusiner, 1982]. Idea ta była rewolucyjna, gdyż sugerowała, że wyłącznie białko (bez udziału kwasów nukleinowych) może być czynnikiem infekcyjnym. Na chwilę obecną uważa się, że etiologia co najmniej 30 chorób ludzkich i 10 zwierzęcych skojarzona jest z nieprawidłowym zwijaniem się białek

[Sipe, 2012]. Można je podzielić na dwie grupy. Do pierwszej z nich należą amyloidozy układowe oraz amyloidozy zlokalizowane w konkretnych organach. Przykładem może tu być starcza amyloidoza układowa czy dystrofia rogówki [Ueda, 2011; Klintworth, 2009]. Bezpośrednim czynnikiem chorobotwórczym jest w nich występowanie złogów amyloidowych, nawet w ilościach kilogramowych w przypadku pewnych amyloidoz ludzkich. Druga grupa chorób związanych z występowaniem amyloidów obejmuje choroby neurodegeneracyjne, z więc m. in. choroby Alzheimerera, Parkinsona i Huntingtona, przy czym czynnikiem toksycznym wydają się być w tym przypadku nie dojrzałe fibryle amyloidowe, lecz raczej wczesne formy pośrednie w procesie agregacji takie jak białka o zaburzonej strukturze natywnej lub niewielkie oligomery. Dla przykładu, stężenie rozpuszczalnych niskocząsteczkowych form peptydu A β w organizmie koreluje z niesprawnością poznawczą w przypadku choroby Alzheimerera lepiej niż stężenie dojrzałych form amyloidu A β [Lue, 1999; Naslund, 2000]. Dla tej grupy chorób przyczyny dysfunkcji organizmu są nadal analizowane i wskazuje się, że nieprawidłowo zwinięte prefibrylarne formy białka mogą w sposób nietypowy oddziaływać z innymi cząsteczkami w zatłoczonym środowisku komórkowym (bądź pozakomórkowym) i w ten sposób zaburzać pracę komórki, a ich relatywnie duża powierzchnia w porównaniu z dojrzałym włóknem mogłaby podwyższać wydajność takiego procesu [Cheon, 2007]. Alternatywna hipoteza tłumacząca patogenne właściwości agregatów nieprawidłowo zwiniętych białek jest powiązana z zaburzeniem homeostazy komórkowej. Sądzi się, że głównie niewielkie oligomery białek prekursorowych, ale niekiedy także dojrzałe formy fibrylarne mogą tworzyć niespecyficzne kanały w membranach fosfolipidowych, powodując szybkie wyrównywanie transmembranowego gradientu stężeń jonów i skutkując nieprawidłowym funkcjonowaniem komórki [Pollard, 1995; Lal, 2007].

Istotne odkrycia dotyczące złogów amyloidowych w latach osiemdziesiątych przyczyniły się do znacznego zainteresowania naukowców tematyką agregacji białek oraz poszukiwania nowych metod leczenia pacjentów. Obecnie opracowywanych jest szereg leków pod kątem terapii chorób związanych z procesem amyloidogenezy. Leki takie mogą wpływać na kilka różnych zjawisk: produkcję prekursora białkowego amyloidu, konwersję prekursora białkowego do stanu pośredniego w agregacji, tworzenie się włókien amyloidowych oraz stabilność tych włókien [Dember, 2009]. W przypadku amyloidoz układowych skuteczną strategią może być np. „wyczyszczenie” środowiska komórkowego z surowiczego składnika amyloidu P, chroniącego agregaty przed usuwaniem przez makrofagi, co prowadzi do zlikwidowania złogów amyloidowych [Bodin, 2010]. W przypadku chorób neurodegeneracyjnych związanych z występowaniem amyloidów przebieg patogenezy wydaje się nie być ani oczywisty ani wspólny dla całej ich kategorii. Ponadto, jedną z przeszkód w ich farmakologicznym leczeniu jest bariera krew-mózg, która znacząco ogranicza wybór cząsteczek możliwych do zastosowania jako leki, gdyż np. konwencjonalne ligandy białkowe, takie jak przeciwciała bądź aptamery DNA i RNA są do jej pokonania zbyt duże. O ile np. przy zastosowaniu

przeciwciał w odpowiednich warunkach możliwe jest ominięcie tej bariery, terapia immunizacyjna z zastosowaniem epitopów naśladujących agregaty białkowe może sprawiać dodatkowe problemy - stymulacja systemu immunologicznego pacjenta do wytwarzania własnych anty-amyloidowych przeciwciał niekiedy prowadzi do wystąpienia silnego stanu zapalnego [Lemere, 2013]. Inne podejście lecznicze zakłada zastosowanie małych cząsteczek specyficznie oddziałujących z białkiem, gdyż są one w stanie pokonać barierę krew-mózg. Większość testowanych cząsteczek to pochodne ligandów amyloidowych, takich jak czerwien Kongo, chryzamina G, kurkumina czy tioflawiny S i T o właściwościach hydrodynamicznych i fizykochemicznych pozwalających na przedostanie się do mózgu. Mogą one specyficznie bądź niespecyficznie oddziaływać z toksycznymi formami niepoprawnie zwiniętych białek. Największym wyzwaniem jest potwierdzenie ich zdolności terapeutycznych w warunkach *in vivo* oraz wykluczenie negatywnego wpływu na inne białka znajdujące się w środowisku komórkowym. Innymi obiecującymi czynnikami o działaniu leczniczym są biokompatybilne nanocząstki polimerowe. Mogą one hamować tworzenie się złogów oraz dezintegrować amyloidy A β , a nawet redukować toksyczność peptydów i oligomerów A β *in vivo* [Saraiva, 2010]. Jest to jednak zupełnie nowe podejście, a związki te muszą zostać zweryfikowane pod kątem bezpieczeństwa stosowania w postaci leków.

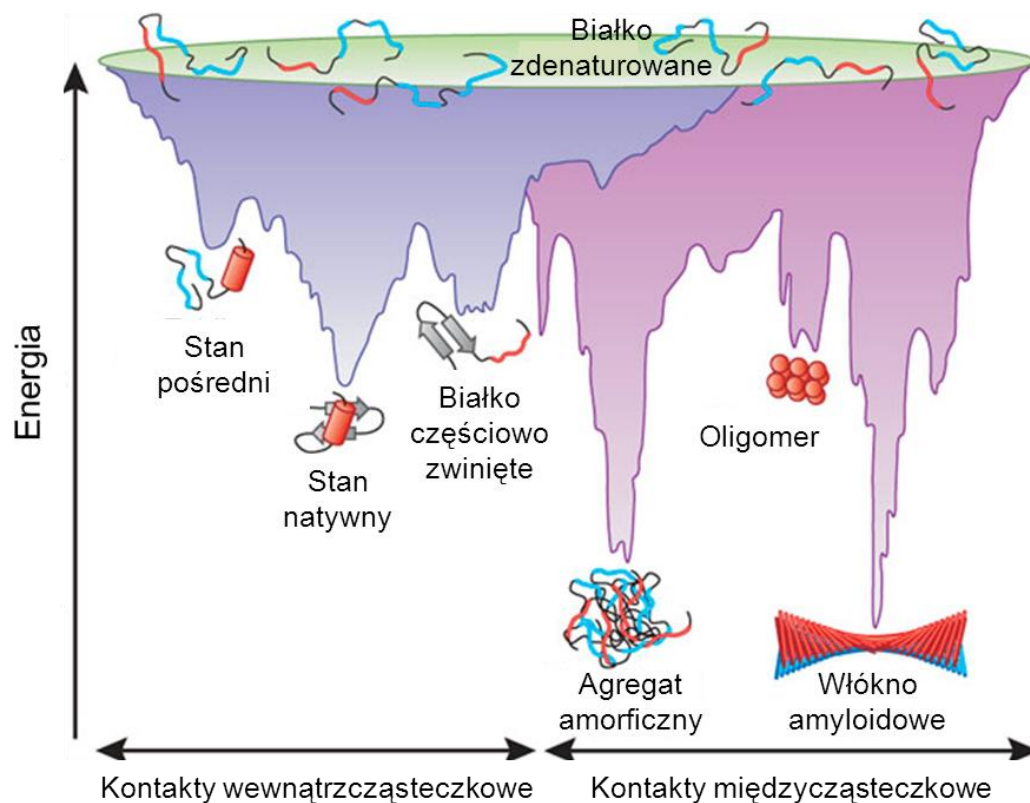
Należy podkreślić, że nie zawsze występowanie amyloidów *in vivo* wiąże się z procesem chorobotwórczym. Znane przykłady biologicznie funkcjonalnych amyloidów to m. in. włókna *curl*, służące bakteriom do tworzenia biofilmów [Olsen, 1989], agregaty białka Pmel17 wspomagające polimeryzację i biosyntezę melaniny [Fowler, 2005] czy priony [URE3] odpowiedzialne za wyłączenie katabolicznej represji azotu u bakterii [Masison, 1995]. Wszystkie te nienatywne formy białek mają strukturę typową dla amyloidów i stanowią ciekawe rozwiązanie ewolucyjne usprawniające funkcjonowanie tych organizmów. Dodatkowo funkcjonalizowane fibrylarne agregaty białkowe syntetyzowane *in vitro* mogą znaleźć zastosowania m.in. w nanotechnologii. Podstawową ich cechą, która jest w tym wypadku pożądana, jest zdolność do samoorganizacji bez zewnętrznego wkładu energii. Dotychczas zaproponowano szereg układów, w których wykorzystano włókna amyloidowe. Jednym z zastosowań jest wprowadzenie uporządkowania przestrzennego materiałów, które naturalnie nie mają zdolności do samoorganizacji. Przykładem są przewodzące nanodruły, powstałe przez depozycję metalu na powierzchni fibryli [Scheibel, 2003; Carny, 2006]. Innym sposobem wykorzystania agregatów białkowych jest tworzenie przy ich udziale powierzchni o określonych właściwościach i morfologii, służących np. jako układ mikroprzepływowy bądź jako silnie hydrofobowe, samooczyszczające się podłoże [Reches, 2006]. Dodatkową możliwością jest znakowanie białek bądź peptydów prekursorowych, co skutkuje określonymi cechami powstających agregatów. W taki sposób Channon i współpracownicy otrzymali z peptydów oznakowanych luminescencyjnie układ zbierający światło [Channon, 2009]. W większości z tych przypadków

agregaty białkowe mogą być traktowane przede wszystkim jako rusztowanie, które pozwala nadać pożądaną geometrię oddziałującym z nim innym cząsteczkom.

2.2 Przebieg agregacji i struktura włókien amyloidowych

Zrozumienie przyczyn chorób związanych z tworzeniem się amyloidów, jak również synteza nowych hybrydowych nanomateriałów opartych o włókna amyloidowe nie byłyby możliwe bez znajomości właściwości agregujących układów oraz struktury włókien. Ten nurt badań jest niezwykle istotny i zaczął się rozwijać wraz z odkryciem białkowej natury amyloidów.

Ponad 50 lat temu, badając małe globularne białko – rybonukleazę A, Christian B. Anfinsen wykazał, że po denaturacji spontanicznie odtwarza ono swoją w pełni aktywną enzymatycznie strukturę natywną [Anfinsen, 1961]. W oparciu o ten wynik Anfinsen postawił hipotezę, iż informacja potrzebna białku do przyjęcia struktury natywnej jest zakodowana w jego sekwencji aminokwasowej a konformacja ta odpowiada globalnemu (w warunkach fizjologicznych) minimum energii swobodnej łańcucha polipeptydowego białka. Proces zwijania się białka wiąże się z tzw. paradoksem Levinthala. W 1969 roku Cyrus Levinthal zauważył, że pojedynczy niezwiniony łańcuch polipeptydowy ze względu na bardzo dużą liczbę stopni swobody (i ogromną liczbę możliwych konformacji) w ogólnym przypadku mógłby poszukiwać tej o najniższej energii swobodnej przez astronomicznie długi czas



Rys. 2 Wykres energii potencjalnej zwijania i agregacji białek, zwany lejkiem zwijania. Na podstawie [Hartl, 2009].

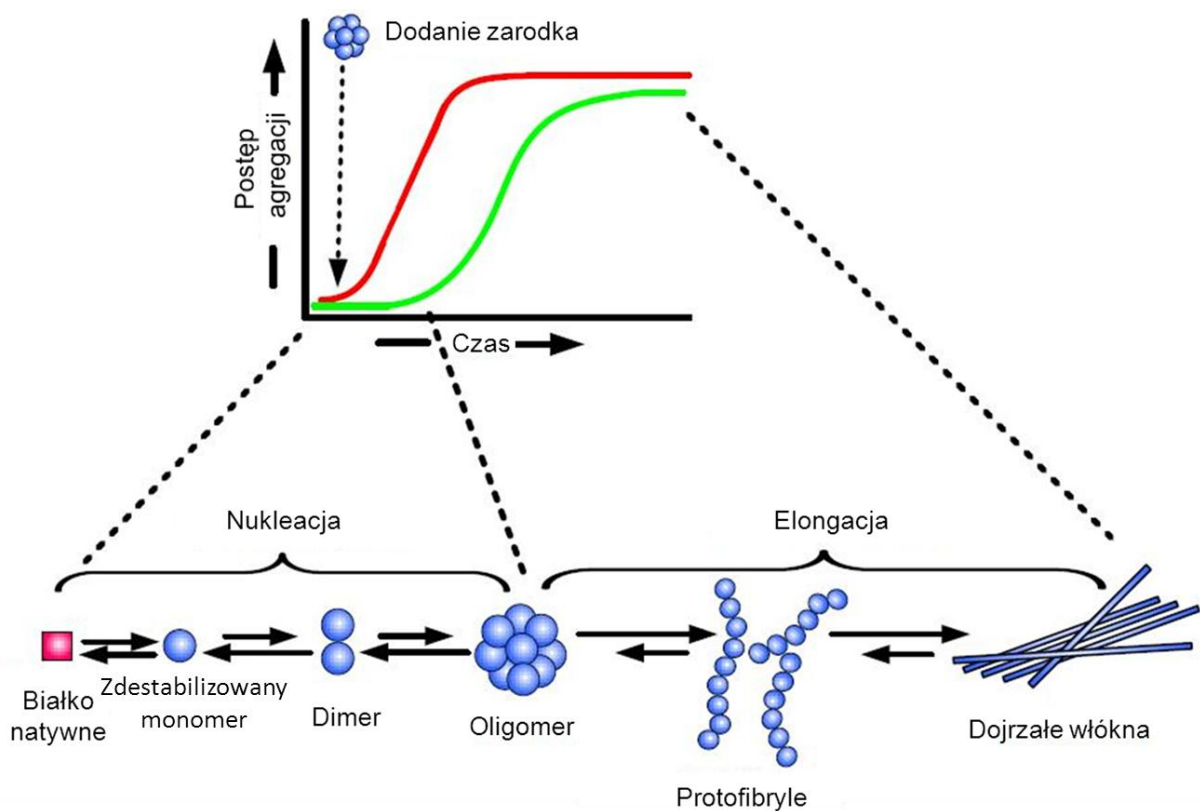
nieodpowiadający kinetykom rzeczywistych procesów związania się białek *in vivo* i *in vitro* [Levinthal, 1968]. Większość badanych białek związa się do struktury natywnej w czasach krótszych od sekundy, a więc proces ten musi przebiegać według określonej ścieżki z przejściem przez ściśle zdefiniowane, częściowo ustrukturyzowane stany pośrednie. Zaproponowano, że hiperpowierzchnia energii swobodnej białka w zależności od jego konformacji ma kształt lejka, zwanego lejkiem związania (Rys. 2) [Bryngelson, 1995]. Może on posiadać wiele minimów lokalnych, ale dopiero minimum globalne odpowiada strukturze natywnej, przy czym im bliżej jesteśmy dna lejka tym mniejszą swobodę konformacyjną ma białko i tym mniej możliwych geometrii układ musi „przeczesać” poszukując tej o najniższej energii. Zwinięte struktury białkowe stabilizowane są przez szereg oddziaływań, takich jak wiązania wodorowe, mostki solne, oddziaływania Van der Waalsa oraz kontakty hydrofobowe. Fakt spontanicznej konwersji stanu natywnego do trwałych włókien amyloidowych jest interpretowany w kontekście poziomów energii swobodnej jako przejaw istnienia jeszcze głębszego od stanu natywnego minimum na hiperpowierzchni energii potencjalnych dla konformacji wielu oddziaływujących monomerów [Gazit, 2002]. Należy podkreślić że głębsze, „amyloidowe” minimum energetyczne pojawić się może wyłącznie dla grupy cząsteczek a nie dla pojedynczej molekuly białka.

Amyloid powstaje z białka zdestabilizowanego w mniejszym lub większym stopniu. Szereg czynników denaturujących sprzyja powstawaniu zdolnej do asocjacji konformacji, przyczyniając się do inicjacji agregacji. W warunkach fizjologicznych najczęściej dochodzi do mutacji w sekwencji aminokwasowej, co zmniejsza stabilność cząsteczki. Dodatkowo w organizmie mogą niepoprawnie funkcjonować mechanizmy ochraniające procesy związania, takie jak działanie białek opiekuńczych (ang. *chaperones*) czy ścieżki degradacji niepoprawnie zwiniętych białek. *In vitro* agregacja może zostać wywołana destabilizacją białka spowodowaną umieszczeniem go w warunkach нефizjologicznych, takich jak zasadowe lub kwaśne pH, podwyższona temperatura, roztwory niewodne czy obecność tzw. denaturantów, np. mocznika albo chlorowodoru guanidyny. Ogólnie można przyjąć, że w znacznej części tych przypadków inicjacją agregacji jest odstąpienie hydrofobowych fragmentów sekwencji aminokwasowej wywołane penetracją rdzenia białka przez



Rys. 3 Obrazy mikroskopii elektronowej fibryli poli-L-lizyny (A), kwasu poli-L-glutaminowego (B) oraz poli-L-treoniny powstałe w odpowiednio dobranych warunkach. Skala: 200 nm. Na podstawie [Fändrich, 2002].

rozpuszczalnik. W wielu badaniach wykazano, że agregować *in vitro* może także wiele białek tworzących złogi amyloidowe *in vivo* [Chiti, 1999] a także syntetyczne polipeptydy, w szczególności spolimeryzowane α -aminokwasy [Fändrich, 2002] (Rys. 3), stąd wysnuty został wniosek, że zdolność do amyloidogennej agregacji jest ogólną cechą białek jako polimerów. Z drugiej strony warto pamiętać, że pewne fragmenty sekwencji oraz określone aminokwasy sprzyjają bardziej tworzeniu się β -karkowych agregatów. Jedną z pożądanych cech jest hydrofobowość sekwencji białkowej [Pawar, 2005], a także skompensowany ładunek elektryczny białka [Lopez De La Paz, 2002]. W tym kontekście należy przywołać prace pokazujące, że aromatyczne aminokwasy często występują w białkach związanych z chorobami o amyloidowej etiologii [Azriel, 2001]. Z kolei metodami analizy statystycznej określono, że w naturalnie występujących białkach sekwencje trzech lub więcej hydrofobowych aminokwasów pod rząd obserwowane są rzadziej niż wynika to z oczekiwań natury probabilistycznej, co może być efektem działania mechanizmów ewolucyjnych zapobiegających procesowi agregacji. [Schwartz, 2006]. Dodatkowo tworzeniu się amyloidów sprzyja obecność β -karkowych struktur drugorzędowych w białku natywnym [Chiti, 2002]. Sekwencje amyloidogenne są także zwykle pozbawione proliny oraz glicyny, gdyż te aminokwasy destabilizują strukturę β -karkową [Williams, 2004].



Rys. 4 Przebieg agregacji białka według mechanizmu „zależnego od zarodka”. Na podstawie [Kumar, 2011].

Odzwierciedleniem istnienia różnych faz wykształcania się fibryli są różne etapy kinetyki tego procesu, który może być monitorowany np. poprzez zmiany właściwości spektroskopowych próbki (intensywności fluorescencji, rozpraszania, zmiany położenia pasma amid I' we podczerwieni lub minimum sygnału dichroizmu kołowego). Agregacja białek ma przebieg mechanizmu „zależnego od zarodka”. Charakteryzuje się on fazą opóźnioną (ang. *lag phase*), potrzebną na pokonanie barier termodynamicznych związanych z tworzeniem pierwszych zarodków amyloidowych (Rys. 4). W tym czasie białko natywne zmienia konformację na sprzyjającą agregacji. Sprzyja to zajściu nukleacji, a więc wykształcaniu się zarodków fibryli zazwyczaj z kilku cząsteczek białka, który dopiero wówczas mogą zacząć się wydłużać. W trakcie drugiej fazy – elongacji – tworzą się dłuższe i grubsze sploty, a także do czasu wykorzystania wszystkich niezagregowanych cząsteczek białka powstają nowe fibryle. Nachylenie krzywej kinetycznej zależy od szybkości tego procesu. Po fazie wzrostu fibryli obserwowane jest *plateau*. Faza opóźniona może zostać skrócona poprzez „zasiewanie”, czyli dodanie do analizowanej próbki zarodków w postaci rozdrobnionego, dojrzałego amyloidu [Serio, 2000]. Kinetyka takiego procesu ma zupełnie inny przebieg ze względu na zmniejszenie barier termodynamicznych związanych z nukleacją, a elongacja zarodków rozpoczyna się natychmiast po ich wprowadzeniu do środowiska z rozpuszczalnym prekursorem (np. natywnym monomerem białka). Mechanizm wzrostu fibryli pod wpływem zasiewania jest podobny do analogicznych zjawisk zachodzących w trakcie krystalizacji białek czy wykształcanie się mikrotubuli [Jarrett, 1993]. Należy jednak podkreślić, że w przypadku amyloidów przemiana fazowa jest powiązana z przemianą konformacyjną, co odróżnia obraz termodynamiczny tego procesu.

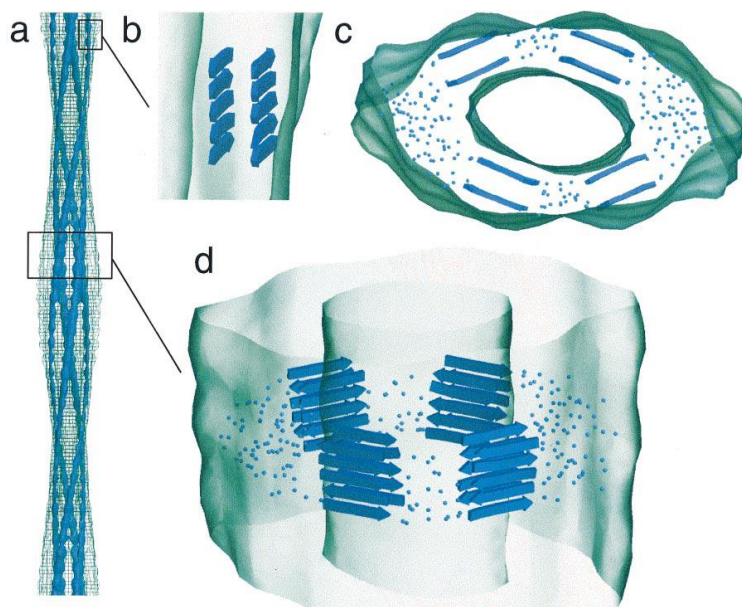
Do tej pory udało się uzyskać bardzo niewiele wysokorozdzielczych, eksperymentalnych struktur włókien amyloidowych powstałych z naturalnie występujących białek lub peptydów. Amyloidy mają zbyt duże masy cząsteczkowe do pomiarów magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w roztworze. Z kolei fakt, iż amyloidy nie tworzą kryształów, a także polidispersyjność próbek utrudnia zastosowanie metody NMR w ciele stałym, a przede wszystkim metod krystalograficznych. Zastosowania metody NMR w roztworze są ograniczone do molekuł o niskich i średnich masach cząsteczkowych m. in. ze względu na nakładanie się sygnałów. Ruchy Browna mają znaczący wpływ na czasy relaksacji spinowych momentów magnetycznych, stąd już dla cząsteczek o masie cząsteczkowej powyżej 50 kDa poszerzenie linii spektralnych nie pozwala na rozróżnienie sygnałów pochodzących od indywidualnych jąder. Limit ten można podwyższyć stosując odpowiednie sekwencje impulsów i pracując z silnym polem magnetycznym i chłodzonymi próbkami [Griswold, 2002], jednak masy cząsteczkowe włókien amyloidowych są wciąż zbyt duże dla tej metody. Dodatkowym, trudnym do spełnienia w przypadku amyloidów, warunkiem w spektroskopii NMR jest monodispersyjność próbki. Rozwiązaniem pozwalającym na badanie odpowiednio przygotowanych próbek włókien amyloidowych jest technika NMR w ciele stałym. Jej wykorzystanie w badaniach krótszych fragmentów białek pozwoliło na ustalenie struktury włókien powstałych z fragmentu

105-115 transtyretyny [Jaroniec, 2004] oraz fragmentu 11-25 peptydu A β [Petkova, 2004]. Dane o niskiej rozdzielczości są pozyskiwane przy pomocy klasycznych metod biofizycznych (m.in. metod optycznych) i służą głównie do detekcji form zagregowanych. Niosą one też informacje strukturalne pozwalające na rozróżnienie wariantów budowy struktur β -karkowych oraz geometrii włókien amyloidowych (Tab. 2). Poprzez kombinację tych metod mogą być następnie tworzone modele

Tab. 1 Zakres zastosowań metod biofizycznych w badaniach struktur amyloidowych.

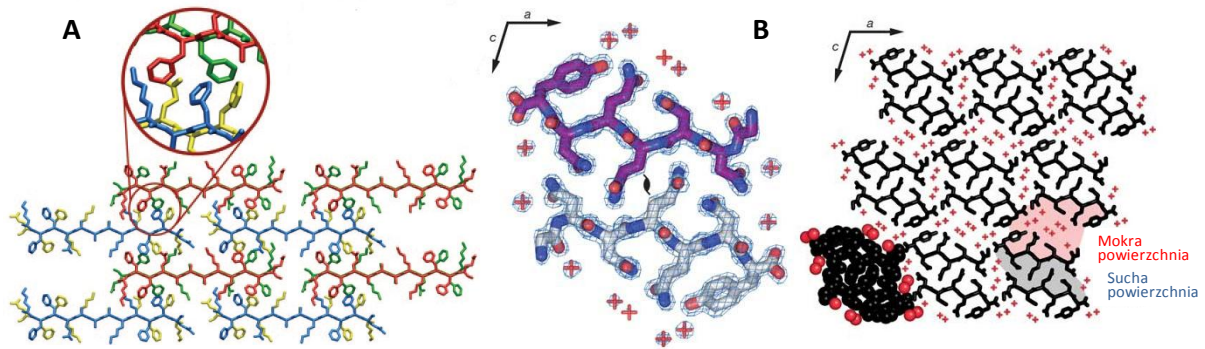
Struktura II-rzędowa	<ul style="list-style-type: none"> • Charakterystyczne widmo β-karkki w spektroskopii dichroizmu kołowego (CD). • Sygnały pochodzące od chromoforu amidowego w rezonansowej spektroskopii Ramana w głębokim nadfiolecie (DUVRR) pozwala na rozróżnienie α-helisy, β-karkki oraz struktury typu kłębek statystyczny. • Położenie pasm (energia wiązań), zwłaszcza pasma amid I/I' w spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) jest skorelowane z obecnością i typem β-karkki.
Struktura fibryli	<ul style="list-style-type: none"> • Dyfraktogramy proszkowe zorientowanych fibryli charakteryzują się dwoma prostopadłymi prążkami (motyw <i>cross-β</i>). Ich układ wykazuje, że wiązania wodorowe w β-karkkach ułożone są wzdłuż osi fibryli. • Barwniki histologiczne t. j. czerwień Kongo czy tioflawina T (ThT) wiążące się ze strukturami β-karkkowymi wskazują na obecność włókien amyloidowych (dwójłomność CR, fluorescencja ThT), badanie takich kompleksów pozwala na uzyskanie informacji strukturalnych o samych agregatach.
Morfologia	<ul style="list-style-type: none"> • Włókna amyloidowe o średnicy od 5-20 nm i o różnej długości widoczne w transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) i mikroskopii sił atomowych (AFM).

strukturalne. Jedną z pierwszych struktur trójwymiarowych fibryli amyloidowych, utworzonych przez domenę SH3 kinazy fosfatydylinyozytolu, Jimenez i współpracownicy uzyskali na podstawie obrazów z kriomikroskopii elektronowej. Analizując własne dane oraz wcześniejsze wyniki badań krystalograficznych zaproponowali oni również model upakowania badanego peptydu w strukturze włókna amyloidowego (Rys. 5). Dodatkowo wiele informacji na temat struktury włókna pozyskuje się pośrednio, np. badając krótkie peptydy krystalizujące w struktury przypominające podstawowe jednostki budulcowe włókien amyloidowych. Mogą to być sekwencje amyloidogenne stworzone na



Rys. 5 Model upakowania peptydu domeny SH3 kinazy fosfatidyliinozytoli w strukturze włókna amyloidowego. Kontur włókna uzyskany na podstawie map cryo-EM jest zaznaczony kolorem zielonym. Fragmenty β -kartkowe (niebieskie strzałki) oraz nieuporządkowane (niebieskie kropki) peptydu SH3 zostały dopasowane do mapy gęstości elektronowej włókna. Model całego włókna (a), przekrój podłużny protofilamentu (b), przekrój poprzeczny i skośny włókna (c, d) [Jimenez, 1999].

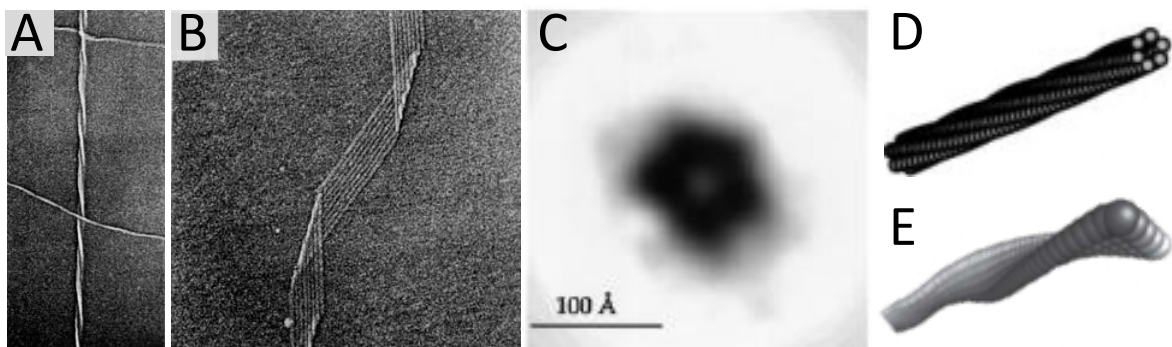
potrzeby eksperymentu [Makin, 2005] bądź też fragmenty rzeczywistych białek tworzących włókna amyloidowe, takich jak prion drożdżowy Sup35 [Nelson, 2005]. Na podstawie badań krystalograficznych takich obiektów uzyskano ich struktury dające informacje na temat upakowania łańcuchów bocznych oraz istotnych oddziaływań stabilizujących β -kartki amyloidowe. Dla przykładu badania przeprowadzone przez grupę Louise Serpell wykazywały wagę oddziaływań warstwowych typu π - π stabilizujących międzykartkowe kontakty (Rys. 6A), natomiast grupa Eisenberga stworzyła pojęcie „suwaka sterycznego” spajającego pary β -kartek połączonych dzięki ścisłemu dopasowaniu łańcuchów bocznych, posiadających „suchą” strefę kontaktu pomiędzy sobą w przeciwieństwie do „mokrej” powierzchni, zewnętrznej (Rys. 6B). Zaproponowali oni, iż centralny fragment sekwencji aminokwasowej białka odpowiedzialny za stabilność struktury β -kartkowej tworzy tak zwany rdzeń włókna amyloidowego. Sekwencję tę można rozpoznać sprawdzając zdolność do agregacji szeregu krótkich peptydów, ale także korzystając z technik ograniczonej proteolizy [Baxa, 2003].



Rys. 6 (A) Upakowanie w kryształach 12-aminokwasowego peptydu KFFEAAAKKFFE. Powiększenie obrazuje międzyłańcuchowe kontakty π - π . Oddzielne peptydy są zaznaczone 4 różnymi kolorami [Makin, 2005]. (B) β -Kartkowa struktura tworząca suwak steryczny zbudowana z peptydu GNNQQNY, widok wzdłuż kartek dla pary peptydów oraz przekrój przez sześć β -kartek. Cząsteczki wody są zaznaczone czerwonymi kropkami. Atomy w jednej komórce elementarnej na ogólnym przekroju są zaznaczone w postaci sfer w celu zobrazowania promieni van der Waalsa [Nelson, 2005].

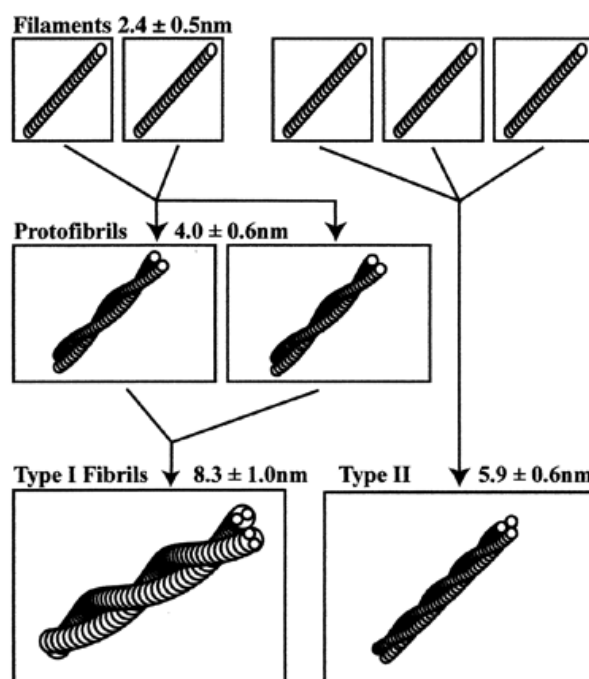
2.3 Hierarchiczna organizacja fibryli amyloidowych

Dojrzałe włókna amyloidowe zbudowane są zazwyczaj z cieńszych podjednostek, tak zwanych protofilamentów, które splatając się tworzą protofibryle a następnie fibryle (w zależności od ilości poziomów organizacji, Rys). Innym typem włókien są włókna wstążkowe (ang. *ribbon*), zbudowane z lateralnie złączonych protofibryli i tworzące strukturę o płaskim przekroju. Tak jak w przypadku ludzkiej kalcytoniny (Rys. 7A, B), oba typy struktur mogą powstawać z tego samego białka prekursorowego. Podobny polimorfizm został zaobserwowany dla ludzkiej amyliny [Goldsbury, 1997]. Nazewnictwo wariantów morfologicznych agregatów nie jest jednorodne i jednoznaczne, lecz oddaje wielopoziomową budowę fibryli amyloidowych.



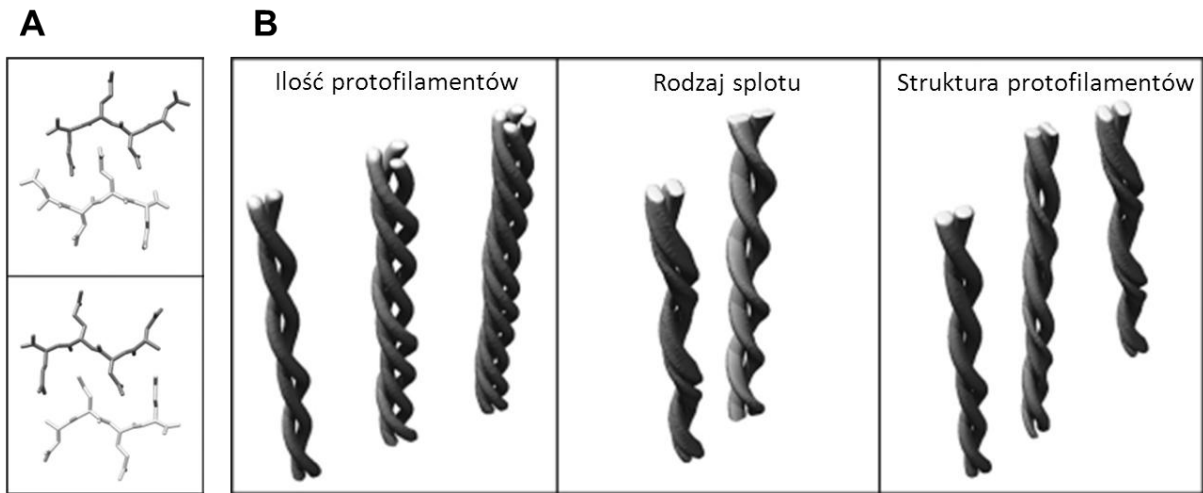
Rys. 7 Obrazy SEM włókna skręconego (A) oraz włókna wstążkowego (B), zbudowanych z ludzkiej kalcytoniny, skala 100 nm [Bauer, 1995]; przekrój przez włókno lizozymu Asp67His wykonany poprzez uśrednienie negatywnie wybarwionych obrazów SEM (C) [Serpell, 2000]; schematyczne przedstawienie włókna skręconego zbudowanego z białka G (D) [Khurana, 2000] oraz wstążkowego zbudowanego z β -laktoglobuliny (E) [Adamcik, 2011].

Można rozróżnić odmienne typy polimorfizmu struktur amyloidowych ze względu na poziomy organizacji, na których zaczyna się on manifestować: na poziomie konformacji łańcucha peptydowego (struktura II-rzędowa), upakowania β -kartek budujących protofilament bądź ilości protofilamentów budujących włókno i rodzaju ich splotu. Pierwszy rodzaj polimorfizmu jest rozpoznawany w widmach FT-IR, DUVRR oraz w pomiarach krystalograficznych i NMR dla mniejszych układów badawczych, natomiast morfologia agregatów jest rozróżniana głównie metodami



Rys. 8 Schemat tworzenia się dwóch typów włókien amyloidowych z łańcuchów lekkich immunoglobulin [Ionescu-Zanetti, 1999].

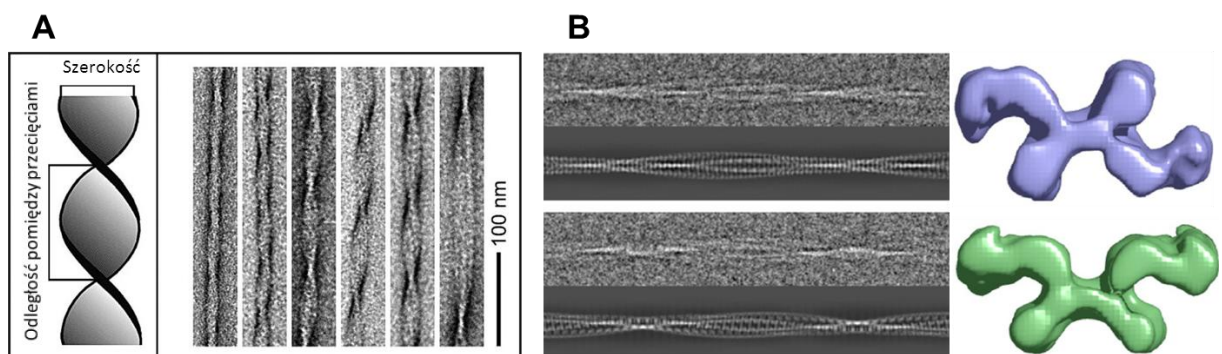
mikroskopowymi. Warianty strukturalne amyloidów mogą być rozróżnione także pośrednio poprzez badanie aminokwasów chronionych przed wymianą H-D [Whittemore, 2005]. Różne formy polimorficzne amyloidów powstałych z tych samych białek prekursorowych są skutkiem agregacji w różnych warunkach fizykochemicznych, definiowanych przez temperaturę, pH i mieszanie roztworu, stężenie białka oraz obecność innych substancji w roztworze (np. soli, rozpuszczalników organicznych itd.). Bezpośrednią tego przyczyną jest inna konformacja prefibrylarnej formy białka w zależności od parametrów środowiska, co rzutuje na strukturę powstającego rdzenia amyloidowego. Istotnym czynnikiem sprzyjającym wyłanianiu się określonego wariantu strukturalnego fibryli jest różna zdolność włókien do wzrostu, która może również zależeć od warunków fizykochemicznych wpływających na szybkość elongacji oraz stabilność pojedynczych protofilamentów i tendencją do związania się w grubsze sploty. Dla przykładu intensywne mieszanie powoduje łamanie się fibryli, czego konsekwencją jest znaczące zwiększenie się ilości „lepkich końców” zdolnych do przyłączania



Rys. 9 Struktura drugorzędowa dwóch wariantów polimorficznych mikrokrystalitów typu amyloidowego zbudowanych z peptydu NNQQ (A), schemat różnych typów morfologii protofibryli (B). Na podstawie [Fändrich, 2009].

nowych monomerów, stąd różne reżimy wytrząsania agregujących białek skutkują powstawaniem innych typów fibryli [Macchi, 2011]. O ile warunki agregacji definiują ogólnie strukturę powstających amyloidów, o tyle w danej próbce może być obecnych wiele różnych form jednocześnie. I tak, dla peptydu $A\beta_{1-40}$ zarówno bez, jak i w obecności soli obserwuje się dużą heterogeniczność próbki [Klement, 2007].

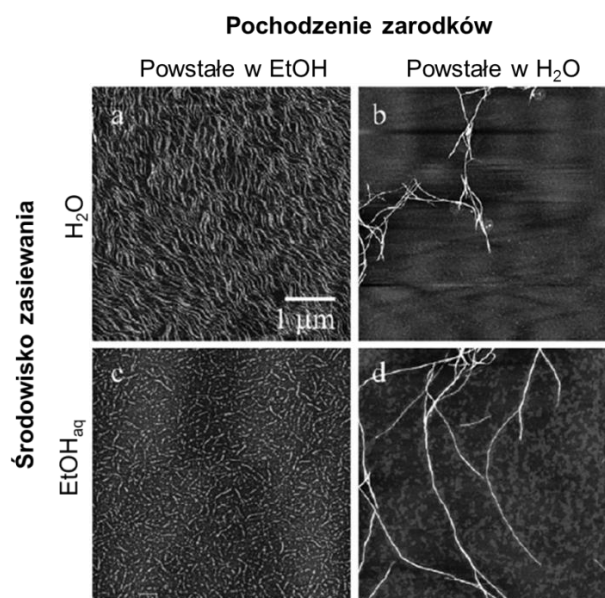
Włókna amyloidowe często różnią się typem splotu protofibryli. Warto zwrócić uwagę na to, że rodzaj splotu protofilamentów definiowany jako odległość między przecięciami decyduje o elastyczności dojrzałych włókien [Sachse, 2001]. Innym ciekawym rozróżnieniem strukturalnym jest możliwość utworzenia równoległego bądź antyrównoległego splecenia protofibryli. Takie zjawisko zostało zaobserwowane dla β_2 -mikroglobuliny a jego konsekwencją jest polarność bądź niepolarność



Rys. 10 Schematyczne przedstawienie włókna amyloidowego z zaznaczonymi charakterystycznymi odległościami oraz obrazy kriomikroskopii elektronowej włókien $A\beta_{1-40}$ o różnych odległościach pomiędzy przecięciami(A) [Fändrich, 2009]; obrazy cryo-EM, ich rekonstrukcje 3D oraz przekroje dla włókien o protofibrylach ułożonych antyrównoległe (niebieski) i równoległe (zielony) [White, 2009].

dojrzałych włókien [White, 2009]. Zjawisko polimorfizmu zostało zaobserwowane w badaniach próbek otrzymanych *in vitro* z białek takich jak amylna [Goldsbury, 1997], lizozym [Chamberlain, 2000], peptyd A β [Petkova, 2005] oraz wielu innych. Także włókna amyloidowe pozyskane z tkanek cechują się polimorfizmem [Jimenez, 2001; Crowther, 2000], co jest istotne w kontekście różnej ich toksyczności [Seilheimer, 1997]. Szczególnym przypadkiem są tzw. „szczepy prionowe”, czyli odmiany amyloidów powstałe z białka PrP [Weissmann, 2002]. Termin ten jest obecnie używany szerzej – różne formy strukturalne agregatów danego białka bywają nazywane „szczepami amyloidowymi”.

Najbardziej fundamentalnym aspektem polimorfizmu amyloidów jest ten dotyczący różnych form fibryli powstałych z identycznych pod względem struktury kowalencyjnej molekuł białka (peptydu). Z drugiej strony niekiedy nie można wykluczyć zajścia pewnych chemicznych modyfikacji sekwencji, takich jak fosforylacja, deamidacja lub utlenianie i zmieniających skład aminokwasowy prekursora, szczególnie w przypadku agregacji zachodzącej *in vivo*. Ciekawą cechą polimorfizmu amyloidów jest jego samopropagacja (ang. *self-propagating polymorphism*), wynikająca z autokatalicznego charakteru wzrostu fibryli – powstanie konkretnego typu strukturalnego włókien ułatwia tworzenie się tego samego wariantu agregatu w reszcie próbki. Konsekwencje samopropagacji polimorfizmu przejawiają się w procesie zasiewania. Z pokolenia „matki” na pokolenie „córek” przenoszone są cechy fibryli na poziomie struktury II-rzędowej, co może



Rys. 11 Obrazy AFM pokolenia fibryli zasiewanych homogenicznie (b, c) i krzyżowo (a, d) [Dzwolak, 2005a].

przekładać się także na inną morfologię próbek. Co ciekawe, propagacja danego strukturalnego wariantu amyloidu zachodzi nawet wtedy, gdy warunki agregacji faworyzują powstawanie zupełnie innych fibryli. Zostało to zobrazowane na podstawie morfologii włókien insuliny powstających w środowisku wodnym w niskim pH (długie fibryle) oraz w obecności 20% etanolu (krótkie fibryle).

Pokolenie córek zachowuje cechy matek niezależnie od środowiska, w którym agregacja zachodzi (Rys. 11).

Cechą polimorficzną struktur amyloidowych może być również różna skrętność dojrzałych włókien bądź protofilamentów i protofibryli je budujących. Kwestia ta zostanie omówiona szerzej.

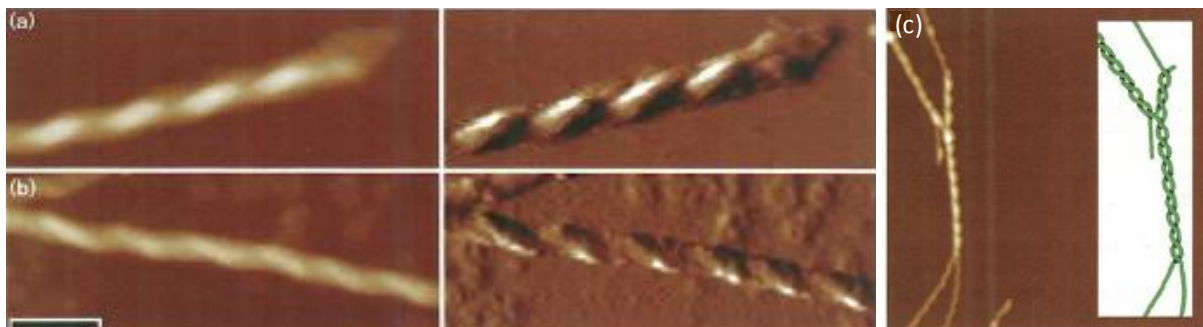
2.4 Chiralność struktur amyloidowych

Naturalnie występujące białka i peptydy zbudowane są z L-aminokwasów, co jest podstawową determinantą właściwości chiralnych struktur białkowych wyższego rzędu. Najpopularniejszym II-rzędowym motywem strukturalnym białek jest prawoskrętna α -helisa, występująca szczególnie często w białkach globularnych [Pauling, 1951a; Murzin, 1995.]. Strukturalną chiralność tj. skrętność można również zdefiniować w przypadku drugiej podstawowej struktury II-rzędowej – tj. β -kartki. Historycznie stosowano przy tym dwie różne konwencje, z czego ostatecznie zdecydowano się na określenie jej chiralności poprzez kierunek skręcenia wiązań wodorowych patrząc wzdłuż osi łańcucha [Schulz, 1974] (Rys. 12). Oznacza to, że w przypadku białek globularnych zbudowanych z L-aminokwasów, β -kartki są prawoskrętne.

W przypadku włókien amyloidowych także rozważa się kwestie skrętności. Początkowo sądzono, że z L-aminokwasów mogą powstawać struktury (na poziomie protofibryli i dojrzałych włókien amyloidowych) tylko o jednej skrętności. Potwierdzeniem tego był eksperyment Harpera i współpracowników, w którym uzyskano włókna będące swoimi odbiciami lustrzanymi z białka $A\beta_{1-40}$ zbudowanego bądź z aminokwasów typu L bądź wyłącznie z typu D [Harper, 1997] (Rys. 13), a także inne badania, w których obserwowano agregaty z różnych białek skręcone wyłącznie w lewo [Bauer, 1995; Khurana, 2003; Goldsbury, 1997; Xu, 2012]. Z czasem okazało się jednak, że powstawać mogą fibryle o obu skrętnościach, jak to miało miejsce w przypadku różnych krótkich fragmentów surowiczego amyloidu A (SAA) [Rubin, 2010]. Jest to o tyle interesujące, że włókna zbudowane z 12-aminokwasowego peptydu były prawoskrętne, natomiast skrócenie o pojedynczy C-końcowy kwas asparaginowy powodowało zmianę skrętności tworzących się agregatów. Co więcej, w przypadku oktapeptydu SAA_{2-9} tworzyła się heterogeniczna mieszanina włókien lewoskrętnych (dominujących) oraz prawoskrętnych. Autorzy

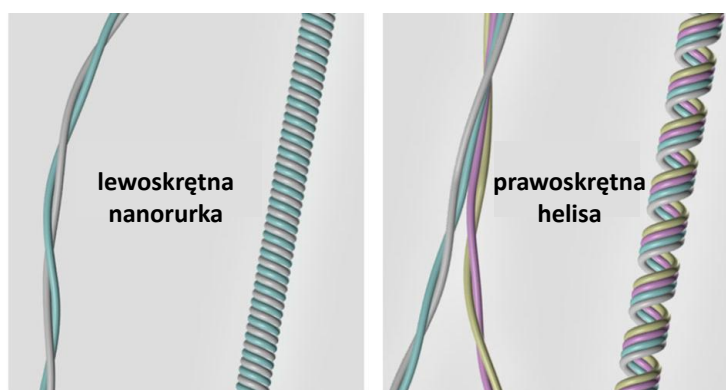


Rys. 12 Prawoskrętna β -kartkowa struktura zbudowana z antyrównoległych łańcuchów dehydrogenazy mleczanowej (aminokwasy 263-294) [Richardson, 1981].



Rys. 13 Włókno amyloidowe z białka $A\beta_{1-40}$ z budowanego z (a) L-aminokwasów i (b) D-aminokwasów, skala 50 nm oraz interpretacja morfologii włókien $A\beta_{140}$ biologicznego pochodzenia [Harper, 1997].

pracy sugerowali jednak, że motywem drugorzędowym budującym te włókna jest bardziej elastyczna β -helisa nie β -kartka. Także w przypadku tego samego białka – insuliny, w zależności od pH roztworu, tworzą się 2 typy struktur o przeciwnej chiralności [Kurouki, 2012a]. Co więcej, dla fibryli powstałych w tych samych warunkach ich skrętność można zmienić *post factum*, zmieniając siłę jonową roztworu [Adamcik, 2011]. W późniejszej pracy tej grupy pokazano także inne bardzo ciekawe zjawisko. Przy długich czasach inkubacji surowiczej albuminy wołowej tworzyły się 2 typy fibryli. Jedne – lewoskrętne, powstałe z pojedynczych ciasno skręconych wokół siebie protofibryli w stopniu prowadzącym do powstania amyloidowych nanorurek, oraz drugie - utworzone z podwójnego kompletu zwiniętych protofibryli, zmieniających po połączeniu w płaską strukturę swą skrętność na helikalną prawostronną [Usov, 2013] (Rys. 14). W tym przypadku ich morfologiczna chiralność



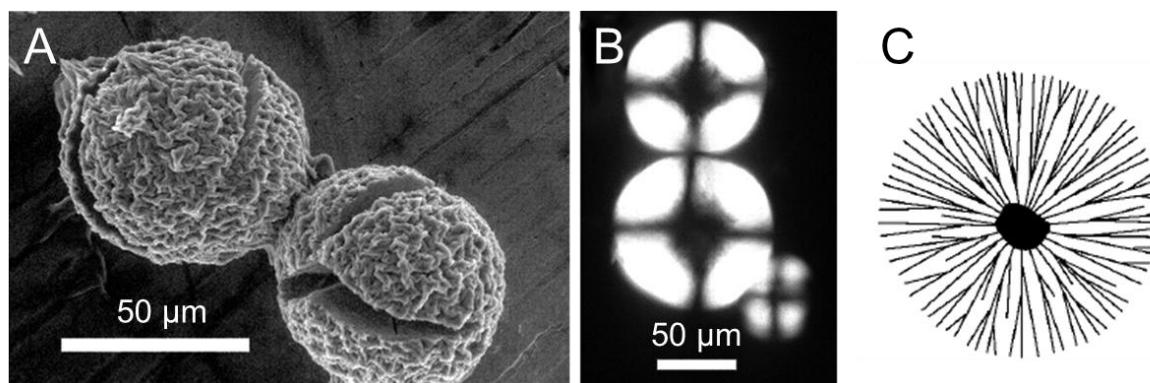
Rys. 14 Włókna amyloidowe o różnej skrętności tworzone przez surowiczą albuminę wołową [Usov, 2013].

rozróżniana na podstawie obrazów AFM była skorelowana ściśle ze stopniem złożoności strukturalnej. Autorzy tej pracy postawili tezę, że chiralność włókien odpowiada takiej geometrii, przy której energia strukturalna ma pewne minimum. Do tej energii wkłady mają efekty związane z chiralnością aminokwasów jak i z mechanicznymi naprężeniami w skręcającym się włóknie, jak również ładunki elektryczne zlokalizowane na łańcuchach bocznych i końcach łańcucha głównego

(kontrolowane przez pH i siłę jonową roztworu). W takim ujęciu, geometria fibryli jest więc wynikiem równowagi pomiędzy kulombowskimi oddziaływaniami a energią torsyjną. Z drugiej strony, ze względu na możliwość powstawania włókien o obu skrętnościach równocześnie można stwierdzić, że czynniki te nie determinują jednoznacznie efektu końcowego i w określonych warunkach różne warianty strukturalne mogą być stabilne termodynamicznie.

Skrętność włókien amyloidowych badana jest za pomocą metod mikroskopowych, takich jak mikroskopia sił atomowych czy mikroskopia elektronowa. Inną techniką czułą na pewne aspekty chiralne włókien amyloidowych jest spektroskopia indukowanego dichroizmu kołowego cząsteczek dokujących na powierzchni białka. Dzięki zastosowaniu tej metody odkryte zostały agregaty białkowe o innej chiralności rozumianej jako lokalna chiralność miejsc wiązania sondy molekularnej. Cząsteczką, której chiralność w tym przypadku badano była tioflawina T.

Agregacja białek nie zawsze prowadzi do powstawania pojedynczych włókien amyloidowych lub ich prostych lateralnych splotów. W pewnych warunkach mogą się tworzyć charakterystyczne struktury przestrzenne zbudowane z wielu fibryli. Pierwszymi superstrukturami, zaobserwowanymi zarówno *in vivo* w tkankach pochodzących od pacjentów [Vos, 1985; Manuelidis, 1997], jak i *in vitro* dla insuliny [Waugh, 1946] były tzw. "sferulity" (Rys. 15). Są one widoczne w obrazie mikroskopowym w świetle przechodzącym (okrągłe obiekty), jak również po wybarwieniu złogów amyloidowych



Rys. 15 Sferulity insuliny wołowej zarejestrowane przy pomocy skaningowej mikroskopii elektronowej (A) oraz mikroskopii optycznej w świetle spolaryzowanym (B) [Krebs, 2005a]; schemat sferulitu powstającego poprzez rozgałęzianie się włókien bądź nukleację nowych w przestrzeniach międzyfibrylarnych (C) [Rogers, 2006].

czzerwienią Kongo w badaniach mikroskopowych w świetle spolaryzowanym przy skrzyżowanych nikolach (motyw „krzyża maltańskiego”) (Rys. 15). Sferulity są zbudowane z fibryli, układających się w koncentryczne sfery przypominające kształtem dmuchawce. Gęstość tych obiektów nie zmienia się wraz ze zwiększeniem się odległości od środka, a więc nie powstają one z już utworzonych włókien i sklejonych *post factum*, lecz poprzez rozgałęzianie się tworzących się fibryli bądź nukleację nowych w przestrzeniach pomiędzy istniejącymi [Rogers, 2006]. *In vitro* można je uzyskać podczas agregacji

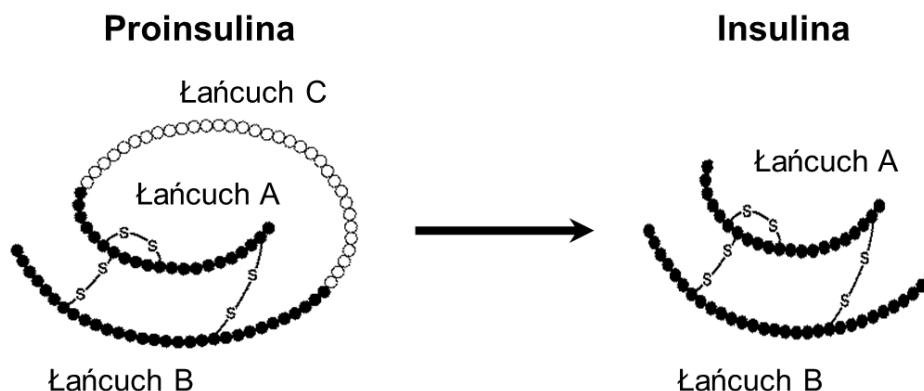
białka w wysokim stężeniu i bez wytrząsania. Jako że sferulity zostały wykryte w wielu tkankach jak i uzyskano je eksperymentalnie dla różnych białek, postuluje się, że zdolność do tworzenia sferulitów jest właściwością wszystkich agregujących białek [Krebs, 2004], podobnie jak ma to miejsce w przypadku włókien polimerowych [Magill, 2001].

2.5 Chiralne superstruktury

Chiralne superstruktury są jeszcze jednym aspektem polimorfizmu superstruktur amyloidowych. Zostały one zdefiniowane na podstawie pomiarów dichroizmu kołowego tioflawiny T związanej z agregatami insuliny. Jako że dotychczas zjawisko to zostało zaobserwowane tylko dla tego białka, właściwości tego insuliny zostaną opisane szerzej.

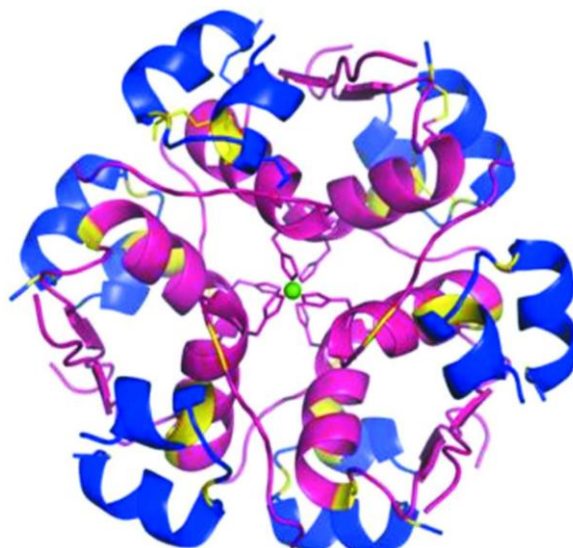
2.5.1 Insulina

Insulina jest hormonem peptydowym, pełniącym funkcję regulatorową w metabolizmie cukrów, a także tłuszczów. Białko to jest wytwarzane przez komórki B wysp Langerhansa w trzustce w postaci proinsuliny posiadającej dodatkowy fragment sekwencji (łańcuch C), który jest odcinany enzymatycznie podczas sekrecji insuliny (Rys. 16). Wydzielane insuliny zachodzi przede wszystkim w trakcie poposiłkowego zwiększenie stężenia glukozy we krwi. Insulina działa antagonistycznie w



Rys. 16 Schemat ilustrujący różnicę pomiędzy proinsuliną a insuliną przedstawiający wzajemne ułożenie poszczególnych łańcuchów. Na podstawie [Hoffman, 1997].

stosunku do innego hormonu – glukagonu, przerywając zużycie tłuszczów jako źródła energii, jednocześnie umożliwiając wnikanie glukozy do komórek wątroby i mięśni, gdzie może ona być przechowywana w formie glikogenu. W przypadku nadmiernego obniżenia stężenia glukozy wydzielany jest glukagon, który stymuluje proces odwrotny. Przy pomocy tego mechanizmu jest utrzymywany stały, fizjologiczny poziom cukru we krwi. Ze względu na możliwość wiązania się z różnymi receptorami insulina może wpływać także na szereg innych procesów komórkowych, m. in.



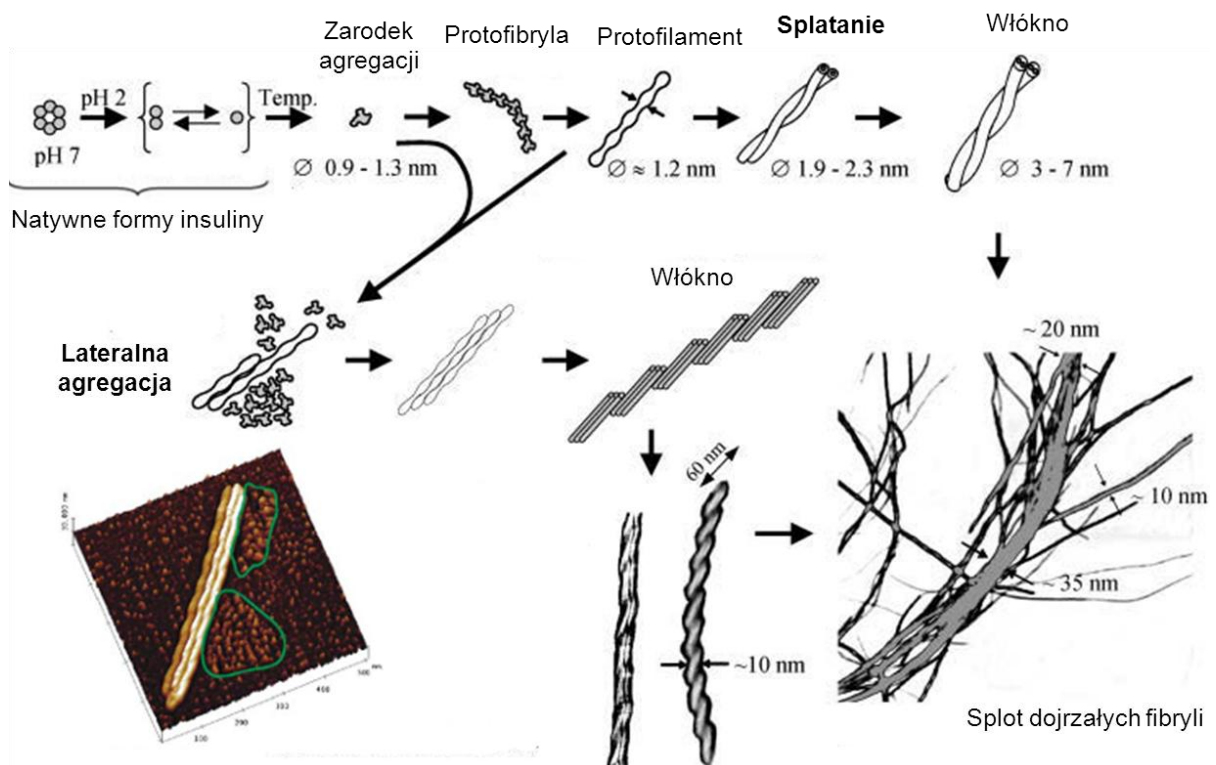
Rys. 18 Model strukturalny heksameru insuliny wołowej w formie zwartej T6 stabilizowanej przez 2 jony Zn^{2+} (zielony) udokładniony przy użyciu danych proszkowych. Łańcuch A zaznaczono na niebiesko, łańcuch B na różowo, cysteiny i mostki dwusiarczkowe zaznaczono na żółto. [Margiolaki, 2013].

poprzez kontakt hydrofobowy powierzchni dwóch monomerów (aminokwasy Asn^{A21} , Val^{B12} , Tyr^{B16} , Phe^{B24} , Phe^{B25} i Tyr^{B26}), z czego C-końcowe fragmenty łańcucha B tworzą antyrównoległą β -kartkę [Baker, 1988]. Formą aktywną biologicznie jest monomer, a więc do związania z receptorem niezbędna jest dysocjacja kompleksu heksamerycznego, w jakim insulina jest przechowywana w trzustce. Zachodzi to wraz z rozcieńczeniem białka po wydzieleniu do układu krwionośnego [Blundell, 1972]. Monomeryczne analogi insuliny są wytwarzane przemysłowo pod kątem farmaceutycznych ze względu na potrzebę podawania pacjentom szybko działającego hormonu. Jest to realizowane m. in. poprzez wprowadzenie podstawień aminokwasowych w C-końcowym fragmencie łańcucha B zawierających naładowane aminokwasy bądź geometrycznie wpływających na osłabienie oddziaływań hydrofobowych w dimerze. Monomeryzacja jest także niezbędna do utworzenia przez insulinę fibryli amyloidowych. W warunkach laboratoryjnych efekt ten może być osiągnięty poprzez obniżenie stężenia białka oraz obniżenie pH roztworu.

2.5.2 Amyloidogeneza insuliny

Insulina, jak wiele innych białek i peptydów, może tworzyć fibryle amyloidowe. W jej przypadku proces ten nie jest bezpośrednio związany z żadną z chorób neurodegeneracyjnych, jednak złogi amyloidu insuliny można często znaleźć w miejscu częstych iniekcji leku u pacjentów chorych na cukrzycę [Dische, 1988]. Dodatkowo, spontaniczna agregacja insuliny stanowi przeszkodę w długotrwałym przechowywaniu leku oraz w użytkowaniu przez cukrzyków pomp insulinowych. Jednocześnie białko to jest bardzo popularnym molekularnym obiektem badań procesu

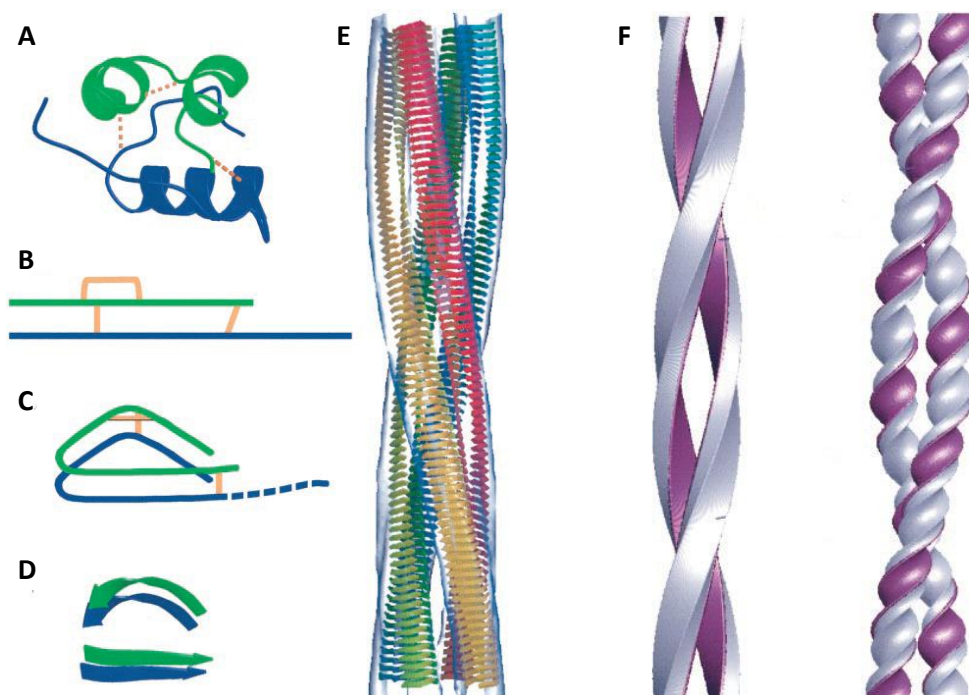
amyloidogenezy ze względu na małe rozmiary, szybkość agregacji oraz podatność na tworzenie różnych form polimorficznych w zależności od warunków. Stan fibrylarny insuliny wykazuje typowe dla amyloidów właściwości, a więc dwójtomność w świetle spolaryzowanym po wybarwieniu czerwienią Kongo, fibrylarną morfologią oraz motyw *cross-β* w dyfrakcji rentgenowskiej [Klunk, 1989; Nielsen, 2001b; Burke, 1972]. Podobnie jak inne białka, insulina agreguje według mechanizmu zależnego od zarodka, gdzie najwolniejszym etapem jest nukleacja [Waugh, 1953]. Wymagane jest w tym celu jednoczesne oddziaływanie niepolarnych fragmentów kilku cząsteczek insuliny, przy czym w różnych pracach wymienia się różną ich ilość, przykładowo 3-4 we wczesnych pracach Waughta [Waugh, 1957] oraz większe oligomery w nowszych doniesieniach: 3 dimery według Nayaka i współpracowników [Nayak, 2009] bądź 12 monomerów zgodnie z danymi Nettletona i współpracowników [Nettleton, 2000]. Uznaje się, że insulina w trakcie nukleacji występuje w formie częściowo zdenaturowanych monomerów bądź dimerów. Punkt izoelektryczny insuliny ludzkiej, wołowej i wieprzowej wynosi ok. 5,4 (według kalkulatora ExPASy [Gasteiger, 2005]). Agregacja prowadzona jest zazwyczaj w pH poniżej punktu izoelektrycznego, a więc cząsteczki insuliny są w tych warunkach naładowane dodatnio. Takie warunki eksperymentu pozwalają na rozpuszczenie białka natywnego oraz mają na celu dysocjację heksamerów, natomiast destabilizacja struktury pojedynczych cząsteczek wzmacniana może być poprzez podwyższenie temperatury [Waugh, 1946].



Rys. 19 Różne ścieżki tworzenia się włókien amyloidowych insuliny wołowej z wyróżnieniem możliwości splatania protofilamentów i lateralnej agregacji. Na obrazie fazowym AFM w lewym dolnym rogu oligomery gromadzące się wzdłuż wcześniej utworzonych fibryli są zakreślone na zielono. Na podstawie [Jansen, 2005].

Właśnie ze względu na stabilność swojej heksamerycznej formy białko to niechętnie agreguje *in vivo*. Jeżeli dojdzie już do utworzenia się zarodka, następuje szybki proces – elongacja fibryli amyloidowych. W przypadku insuliny mają one zazwyczaj budowę hierarchiczną, a więc pojedyncze włókno jest zwykle zbudowane ze splecionych protofibrili. Możliwy jest także inny mechanizm wzrostu struktur amyloidowych – lateralna agregacja, kiedy to przyłączanie nowych cząsteczek białka do struktury β -karkowej następuje nie na końcach, lecz na bocznych powierzchniach fibryli [Jansen, 2005] (Rys. 19). Hierarchiczność struktury włókien insulinowych oraz różne równoległe scenariusze przebiegu tego procesu prowadzą do znaczącego poliformizmu agregatów insuliny.

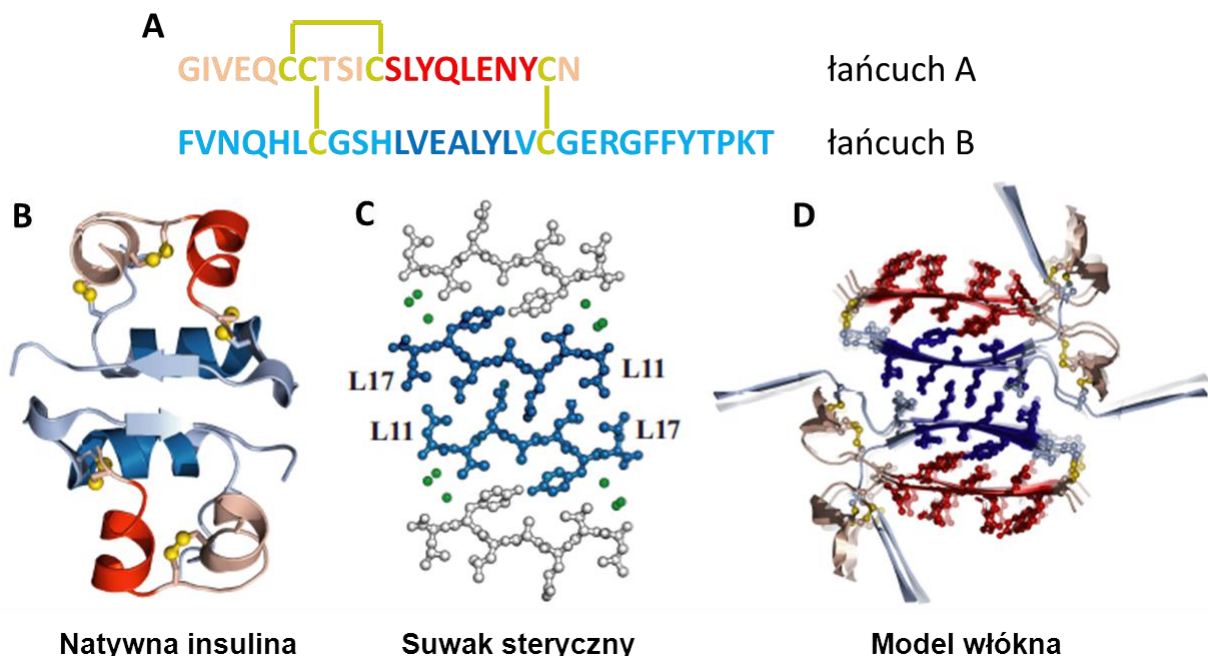
Dotychczas powstało kilka modeli strukturalnych włókien amyloidowych insuliny. Bazują one na danych eksperymentalnych uzyskanych różnymi technikami. Należy tu wspomnieć o dyfraktogramach rentgenowskich opisujących strukturę cross- β fibryli insulinowych [Burke, 1972] oraz o badaniach opisujących złogi amyloidowe zawierające insulinę o niezmienionej sekwencji i z zachowanymi mostkami dwusiarczkowymi u pacjentów leczonych na cukrzycę [Dische, 1988]. Położenie mostków dwusiarczkowych wskazuje na równoległy układ łańcuchów w β -karcie, co zostało zarejestrowane także w badaniach FT-IR [Bouchard, 2000]. Pierwszy z modeli strukturalnych amyloidu insuliny ukazujący upakowanie łańcuchów w β -karcie utworzono na podstawie obrazów



Rys. 20 Struktura włókien amyloidowych insuliny. Monomer insuliny z zaznaczonym na zielono łańcuchem A, na niebiesko łańcuchem B oraz pomarańczowymi mostkami dwusiarczkowymi (A); schemat wzajemnego układu łańcuchów A i B (B); topologia insuliny wbudowanej we włókno amyloidowe (C); model podstawowego fragmentu β -karkki budującej włókno amyloidowe (D); hipotetyczny układ β -karktek dopasowanych do gęstościowych danych mikroskopii elektronowej (szary kontur) (E); prawdopodobne sposoby upakowania protofilamentów we włóknie (F) [Jimenez, 2002].

kriomikroskopii elektronowej. Zakłada on równoległą β -kartkę, zwinięcie łańcuchów A i B na pół w strukturze amyloidowej oraz kontakty pomiędzy lewoskrętnymi protofilamentami przy udziale tylko jednej powierzchni. C-koniec łańcucha B znajduje się w tej strukturze poza rdzeniem fibryli i nie odgrywa istotnej roli w jej tworzeniu [Jimenez, 2002] (Rys. 20).

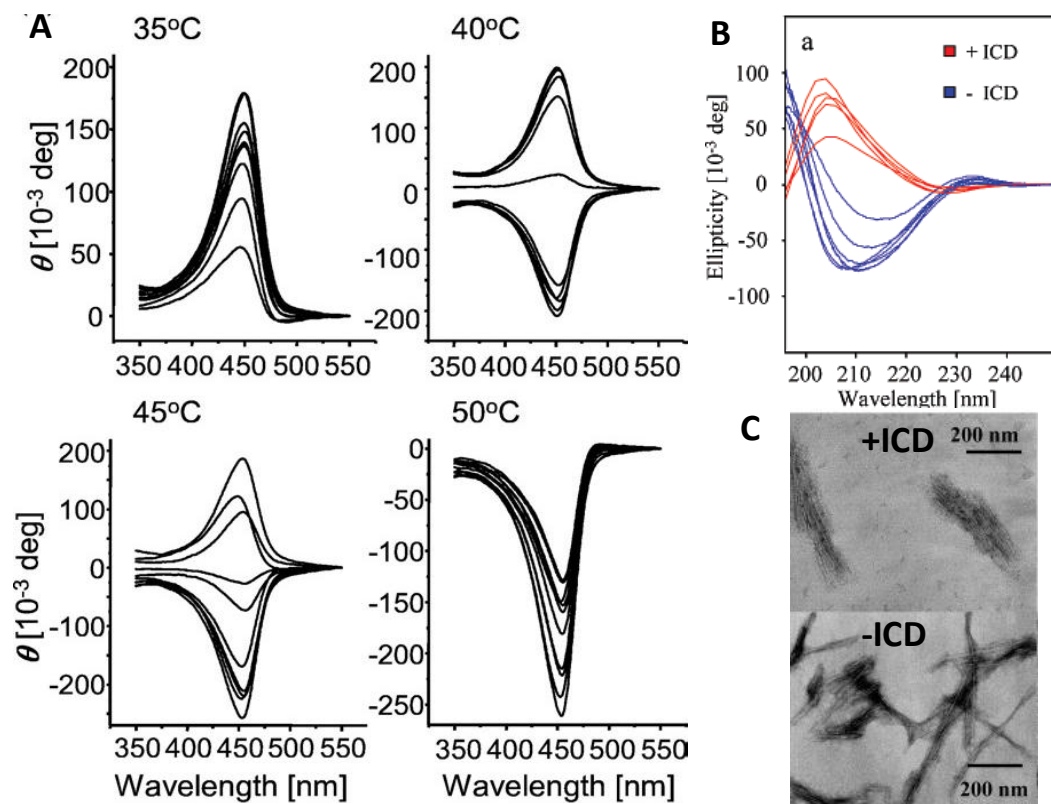
Kolejny model strukturalny amyloidu insuliny skonstruowano na podstawie badań krystalograficznych [Ivanova, 2009]. Zsyntetyzowano szereg peptydów będących fragmentami łańcuchów A i B insuliny i określono ich zdolność do tworzenia fibryli amyloidowych. W ten sposób wyznaczono najkrótsze sekwencje, agregujące w tzw. krystality – struktury o uporządkowanej strukturze β -kartkowej. Jeden z nich – peptyd LVEALYL – miał także zdolność do zasiewania bądź inhibicji agregacji insuliny w zależności od dobranego stosunku molowego. Dla uzyskanych pseudo-kryształów wykonano synchrotronowe pomiary dyfrakcyjne. Podobnie jak w przypadku wcześniej badanych peptydów [Nelson, 2005], fragmenty łańcucha insuliny tworzyły ściśle upakowany suwak steryczny, który został uznany za rdzeń struktury włókna amyloidowego (Rys. 21). Model fibryli oparto na strukturze atomowej peptydu rdzeniowego będącego częścią sekwencji łańcucha B, do którego dopasowano wysoce amyloidogenny fragment łańcucha A. Geometrię pozostałej części sekwencji insuliny wyznaczono za pomocą obliczeń teoretycznych. Wsymulowane poprzez cylindryczne uśrednianie intensywności rozpraszania na pojedynczych kryształach dla tak uzyskanego modelu fibryli insuliny obrazy dyfrakcyjne były zgodne z rzeczywistymi danymi pomiarowymi.



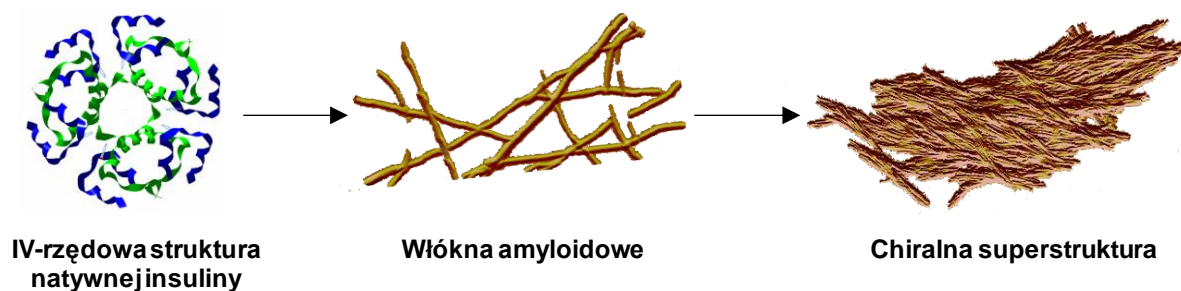
Rys. 21 Sekwencja aminokwasowa insuliny ludzkiej (A), struktura natywnego dimeru insuliny (B), struktura suwaka sterycznego stanowiącego rdzeń włókna amyloidowego (C) oraz model włókna amyloidowego (D). Na różowo zaznaczono łańcuch A, na niebiesko łańcuch B, na żółto cysteiny i mostki dwusiarczkowe; intensywniejsze kolory wskazują sekwencje rdzeniowe (A, B, D). Na rys. C peptyd LVEALYL jest zaznaczony na niebiesko, peptyd LYQLENY na biało, natomiast cząsteczki wody na zielono. Oś włókna amyloidowego jest prostopadła do powierzchni rysunku (C, D) [Ivanova, 2009].

2.5.3 Chiralne aspekty agregacji insuliny

Pierwszą obserwacją swoistego molekularnego aspektu chiralności amyloidów insuliny było zarejestrowanie widma dichroizmu kołowego o znaku ujemnym (-ICD) dla cząsteczki tioflawiny T związanej z amyloidem insuliny wołowej powstałym w trakcie wytrząsania w temperaturze 60°C. Wynik ten powiązano ze skręceniem cząsteczki barwnika wynikającym ze skręcenia fibryli powstałych z białek zbudowanych z L-aminokwasów [Dzwolak, 2005b]. Jednak wkrótce okazało się, że przeprowadzenie analogicznego eksperymentu w niższych temperaturach powoduje powstawanie agregatów generujących dodatni (+ICD) znak efektu Cottona w widmach tioflawiny T. Ostatecznie ustalono, że w wysokich temperaturach (50-60°C) tworzą się fibryle typu ujemnego, w niskich (25-35 °C) typu +ICD, natomiast w temperaturach pośrednich (40-45 °C) proces ten przebiega losowo i z tego samego roztworu wyjściowego powstają agregaty obu typów [Dzwolak, 2007] (Rys. 22A). Ze względu na stochastyczność tego zjawiska opisano je jako „chiralną bifurkację”, przy czym ma ona charakter autokatalityczny – włączenie pewnej ścieżki procesu prowadzi do dominacji danego typu agregatu – +ICD lub -ICD – w konkretnej próbce. Podobny przebieg – rozdzielenie ścieżki procesu z uzyskaniem dwóch odmiennych typów chiralnych struktur – ma kilka innych zjawisk fizykochemicznych zachodzących w trakcie mieszania, takich jak powstawanie chiralnych kryształów chloranu sodu o danej izomeryzacji [Kondepudi, 2001], nieracemicznej mieszaniny kryształów 1,1'-binaftyli



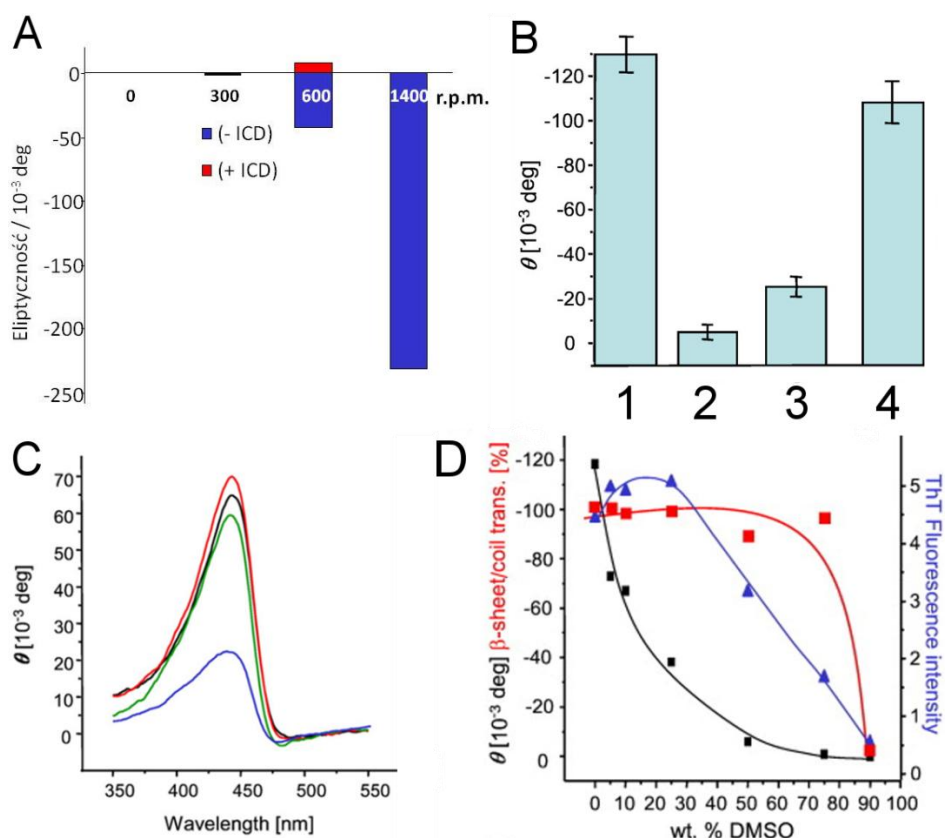
Rys. 22 Widma CD tioflawiny T związanej z chiralnymi amyloidami insuliny, powstałymi w różnych temperaturach (A) [Loksztejn, 2008], widma CD w zakresie dalekiego nadfioletu próbek +ICD oraz -ICD (B), negatywnie wybarwione obrazy TEM próbek +CD oraz -ICD (C) [Dzwolak, 2007].



Rys. 23 Schemat przedstawiający poziomy budowy struktur insuliny.

[Kondepudi, 1999] czy chiralnych porfirynewych mezofaz (ang. *J-aggregates*) [Ribo, 2001], jednak wymienione przypadki dotyczą dużo prostszych cząsteczek. Co istotne, w przeciwieństwie do wyżej opisanych układów w przypadku chiralnych superstruktur obserwowany znak efektu Cottona nie zależy od kierunku mieszania [Loksztejn, 2008]. Analogiczny efekt chiralnooptyczny – indukowany dichroizm kołowy – obserwowany jest również dla innych specyficznych dla amyloidów znaczników, takich jak czerwien Kongo i jony oligojodkowe [Loksztejn, 2008]. Jak się okazało, chiralność agregatów +ICD i -ICD przejawia się nie tylko w widmach indukowanego dichroizmu kołowego w obecności sond molekularnych, ale także w widmach CD w dalekim nadfiolecie samego białka (Rys. 22 B). Jest to o tyle zaskakujące, że widma te odzwierciedlają strukturę II-rzędową białka, a chromoforem jest wiązanie peptydowe, choć wydawałoby się, że β -kartką zbudowana z L-aminokwasów powinna mieć zawsze ujemny sygnał dichroizmu kołowego. Charakterystyczne w przypadku chiralnych superstruktur jest przesunięcie minimum/maksimum pików w kierunku krótszych fal w stosunku do typowego widma β -kartki. Co istotne – zarówno widma CD jak i ICD dla tych amyloidów są niezwykle silne, o intensywności dziesiątki razy większej niż dla innych układów białkowych. Efekt ten jest prawdopodobnie wywołany przez długodystansowe sprzężenie ekscytonowe momentów przejścia w zwartej superstrukturze amyloidowej [Ma, 2007].

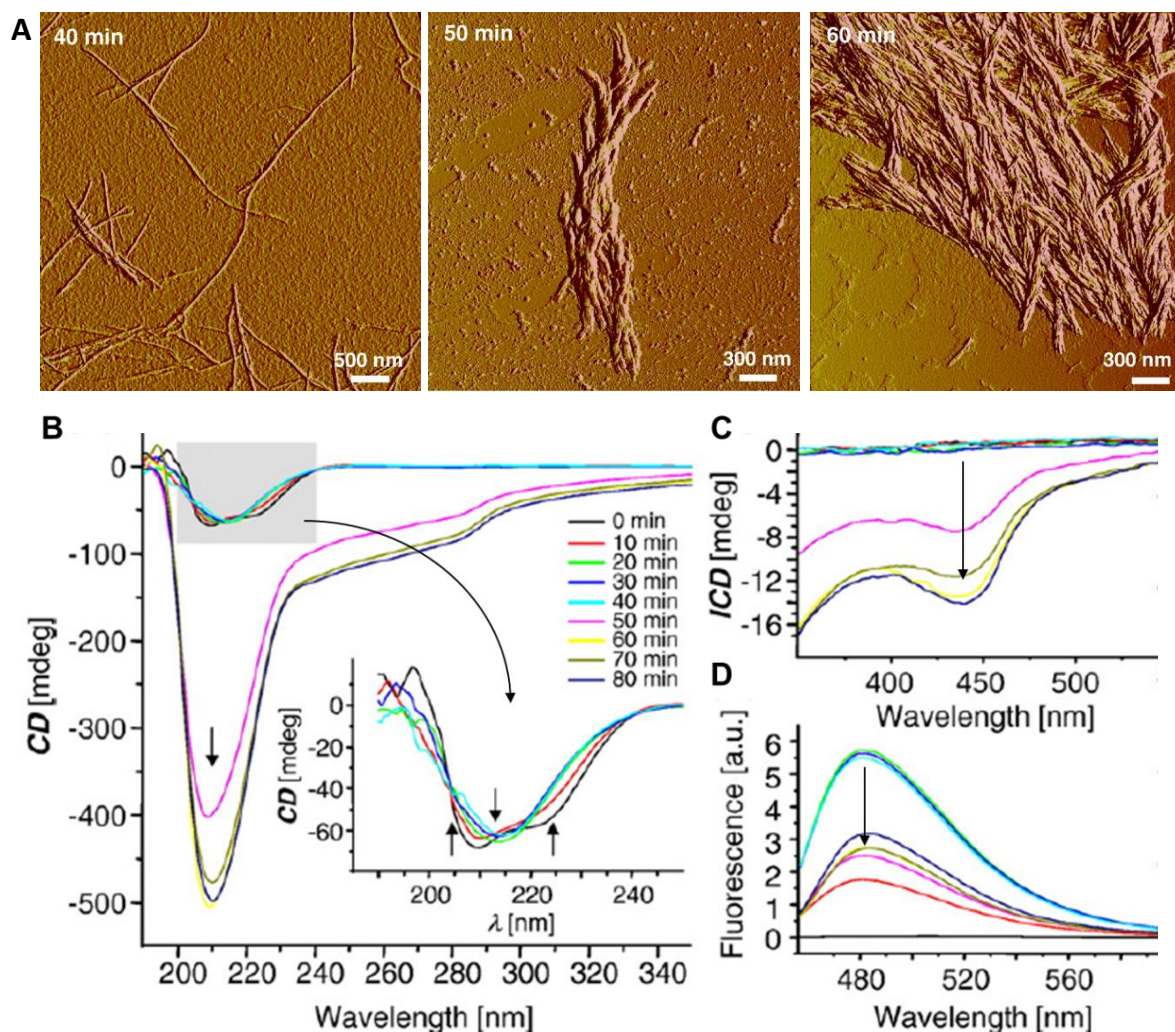
Amyloidy insuliny, charakteryzujące się wyraźnymi właściwościami chiralnooptycznymi, powstają w określonych warunkach: w trakcie intensywnego mieszania i w obecności jonów przeciwnie naładowanych niż białko w warunkach agregacji (w opisanych próbkach były to jony chlorkowe). Oba te czynniki umożliwiają zbliżenie się powstających włókien w trakcie agregacji do siebie: mechanicznie oraz poprzez ekranowanie Debye'a, które obniża barierę elektrostatyczną pomiędzy dodatnio naładowanymi włóknami. Dzięki temu chiralne agregaty mają charakterystyczną, niezwykle zwartą morfologię widoczną na obrazach AFM. Spoistość tych struktur może być zmniejszona dopiero przez sonikację próbki bądź przez wymycie jonów Cl^- (Rys. 24 B, C). Innym czynnikiem, który powoduje rozpad chiralnych superstruktur jest dimetylosulfotlenek (DMSO). Rozpuszczalnik ten wywołuje sukcesywny zanik efektów chiralnooptycznych w tioflawinie T związanej



Rys. 24 Czynniki odpowiadające za powstawanie i stabilność chiralnych superstruktur insuliny. (A) Wpływ szybkości mieszania w trakcie agregacji na znak i intensywność sygnału ICD obserwowanego po jej zakończeniu [Dzwolak, 2007]; (B) intensywność sygnału dla wyjściowej próbki typu -ICD (1), po 10-krotnym przemyciu H₂O (2), po 10-krotnym przemyciu rozcieńczonym HCl (3), po 10-krotnym przemyciu roztworem 0,1 M NaCl (4); (C) widma ICD amyloidu typu +ICD przed (czarny) i po (czerwony) inkubacji przez 48 godz. w temp 60°C, 60 °C/48 godz./1400 rpm (zielony) oraz 1 min. ultradźwięków (niebieski); (D) wpływ stężenia DMSO na stabilność amyloidu –ICD rejestrowany jako zawartość struktur β -karkowych określona przez FT-IR (czerwony) oraz jako intensywność ICD (czarny) i fluorescencji (niebieski) po wybarwieniu tioflawiną T [Loksztejn, 2008].

z amyloidem, spadek zawartości struktur amyloidowych rejestrowany fluorescencyjnie a następnie rozpad β -karkki widziany we FT-IR (Rys. 24 D).

Kinetyka powstawania chiralnych superstruktur została prześledzona w przypadku tworzenia się amyloidu typu –ICD w 60°C [Loksztejn, 2010] (Rys. 25). Początkowo, po upływie ok. 20 min. wykształcają się pojedyncze fibryle, a w widmach CD w dalekim nadfiolecie obserwuje się typową zmianę przy przejściu z α -helisy do β -karkki. Agregaty te nie indukują dichroizmu kołowego tioflawiny T. Następnie, po ok. 50 min. tworzą się superstruktury chiralne widoczne na obrazach AFM, co idzie w parze z gwałtownymi zmianami cech spektroskopowych próbki. Następuje ok. 10-krotny wzrost intensywności sygnału CD białka powiązany z niewielkim przesunięciem minimum w kierunku krótszych fal, równocześnie pojawia się negatywny sygnał tioflawiny T związanej z amyloidem. Co ciekawe, następuje także silny (ok. dwukrotny) spadek fluorescencji tioflawiny T. Można więc

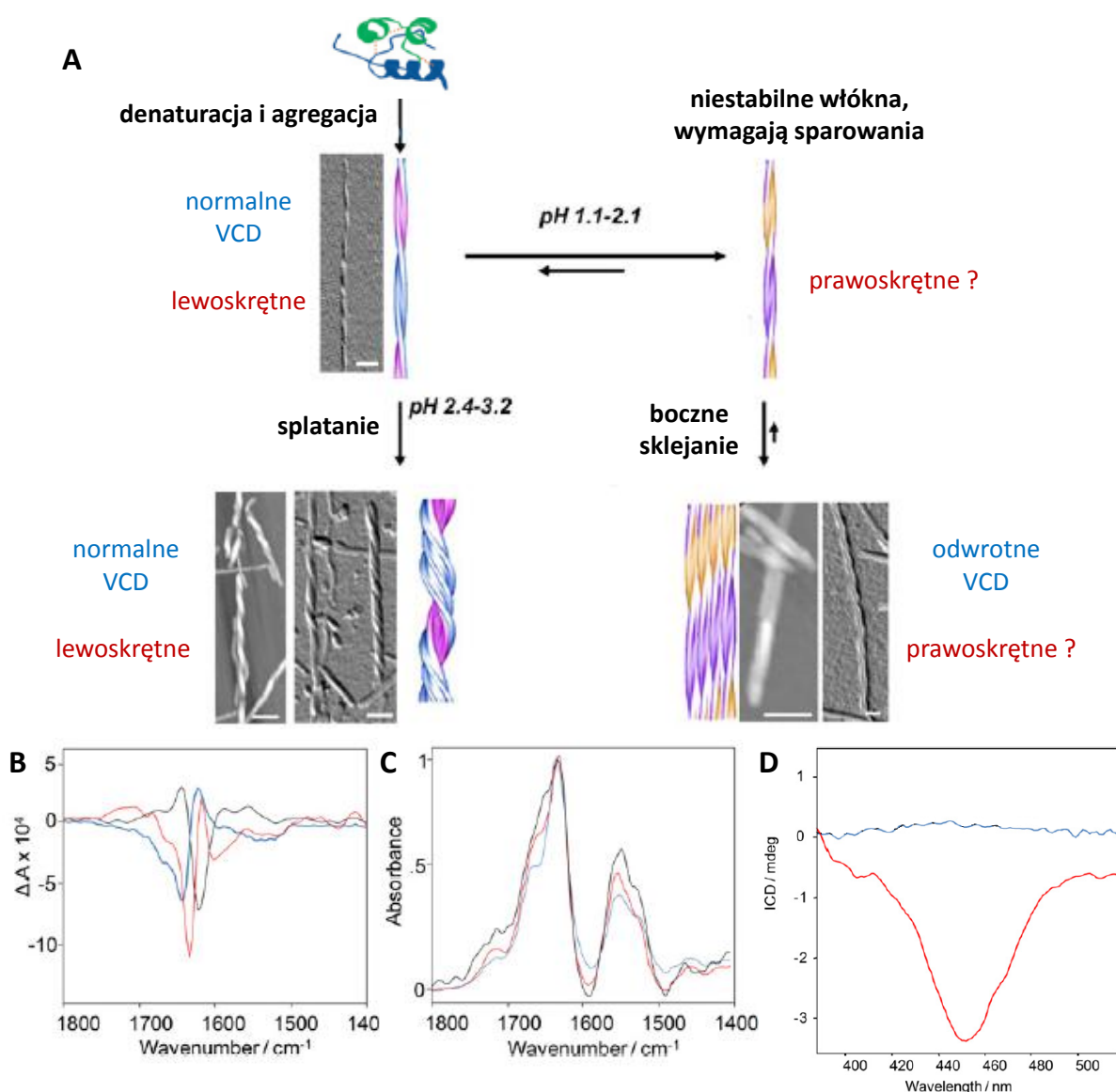


Rys. 25 Agregacja insuliny wołowej w trakcie mieszania w 60°C. Obrazy AFM agregatów w trakcie krytycznego etapu procesu 40-60 min (A), widma CD próbek pobranych w trakcie agregacji insuliny (B), odpowiadające im widma ICD tioflawiny T (C) oraz fluorescencji tioflawiny T (D). Na podstawie [Loksztejn, 2010].

stwierdzić, że jest to gwałtowny, autokatalityczny proces, a dopiero formowanie się dużych, zwartych złożeń wywołuje ich nietypowe chiralnoptyczne właściwości.

Pomiar dichroizmu kołowego zewnętrznego znacznika – tioflawiny T – znalazł zastosowanie w pracach innych grup jako metoda badania chiralności „rusztowania” β -karkowego budującego włókno amyloidowe. Efekt Cottona obserwowano dla fibryli zbudowanych z krótkich peptydów [Biancalana 2009], a także z fragmentu białka HET-s [Sabate, 2008]. W obu tych przypadkach intensywność widm ICD była znacznie mniejsza niż w przypadku chiralnych superstruktur, a więc jak dotąd wzmocnione efekty chiralnoptyczne zaobserwowano jedynie w przypadku wytrząsanych próbek insuliny. Inną metodą określania chiralności amyloidów nieodnoszącą się do morfologii fibryli jest pomiar sygnału wibracyjnego dichroizmu kołowego (VCD). W badaniach Kurouskiego i współpracowników zaobserwowano dwa typy struktur charakteryzujące się w przybliżeniu odwrotnymi, niezwykle silnymi widmami VCD, przy czym jedne były lewoskrętnymi włóknami, drugie

zaś wstążkami bez jednoznacznego skręcenia helikalnego [Kurouski, 2012b] (Rys. 26 A). Znak sygnału VCD dla tego układu przypuszczalnie odzwierciedla skręcenie pojedynczych protofibryli budujących włókno (Rys. 26 B). Ich struktura zależy od pH, w którym prowadzona jest agregacja. Protofibryle lewoskrętne powstają w roztworze o pH powyżej 2,4 i łączą się wraz z upływem czasu w coraz grubsze, również lewoskrętne sploty. Natomiast w pH poniżej 2,1 powstaje amyloid o kwazi-odwróconej sygnaturze spektralnej w VCD, co jest powiązane z inną morfologią – fibryle nie splatają się, lecz asocjują w płaskie wstążki. Mimo odwrotnego sygnału VCD nie mają one widocznej mikroskopowo skrętności, co wyjaśnia się tym, że manifestuje się ona na poziomie protofibryli nie



Rys. 26 Powstawanie „normalnych” oraz „odwrotnych” włókien insulinowych. Schemat opisujący proces (A); widma VCD (B), absorpcji IR (C) próbek uzyskanych w trakcie agregacji insuliny w pH 1,5 w 70°C na początku procesu (czarna linia), po 40 min (czerwona linia) oraz po 2 godz. (niebieska linia) inkubacji; widma ICD tioflawiny T związanej z normalnymi – NF (czerwona linia) oraz odwrotnymi – RF (niebieska linia) fibrylami (D). Na podstawie [Kurouski, 2012b].

rozdzielalnym przy pomocy techniki AFM. Chiralność tych agregatów sprawdzono także za pomocą ICD tioflawiny T związanej z amyloidem. W przypadku fibryli lewoskrętnych, nazywanych „normalnymi”, sygnał ICD-ThT był ujemny, natomiast w przypadku fibryli „odwrotnych” sygnał był zerowy (Rys. 26 D). Jak widać, wyniki uzyskane za pomocą metody VCD oraz ICD-ThT nie muszą być zgodne, ponieważ widma VCD mogą odzwierciedlać chiralność układu na niższym poziomie organizacji, natomiast tioflawina T jest czuła na chiralność miejsca wiązania fluoroforu. Z kolei obrazy mikroskopowe mają niekiedy niewystarczającą rozdzielczość nie pozwalającą na obserwację skręcenia pojedynczych protofibryli bądź nazbyt ciasno zwiniętych grubszych amyloidowych nanorurek.

3. METODY BADAWCZE

W trakcie realizacji pracy doktorskiej wykorzystywałam szereg pomiarowych metod biofizycznych. Przeprowadzone eksperymenty miały na celu rozpoznanie struktury agregatów białkowych oraz śledzenie kinetyki zachodzących procesów (metody spektroskopowe), a także obserwację morfologii otrzymywanych próbek (metody mikroskopowe).

3.1 Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni z transformacją Fouriera

Pasma w widmach absorpcyjnych w podczerwieni odpowiadają dozwolonym przejściom oscylacyjnym grup atomów w cząsteczce. Są one zależne od ich konformacji, otoczenia i oddziaływań wewnątrz- lub międzymolekularnych (np. wiązań wodorowych), w które te grupy atomów są uwikłane. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni jest bardzo użyteczna w badaniach konformacyjnych białek, gdzie pozwala na rozróżnienie struktur II-rzędowych. Obserwuje się 9 tzw. pasm amidowych, związanych z drganiami wiązań w obrębie grupy –CONH w łańcuchu białkowym, charakterystycznych dla konformacji *trans* wiązania peptydowego. Z punktu widzenia diagnostyki

Tab. 2 Drgania w podczerwieni charakterystyczne dla polipeptydów. Na podstawie [Kong, 2007].

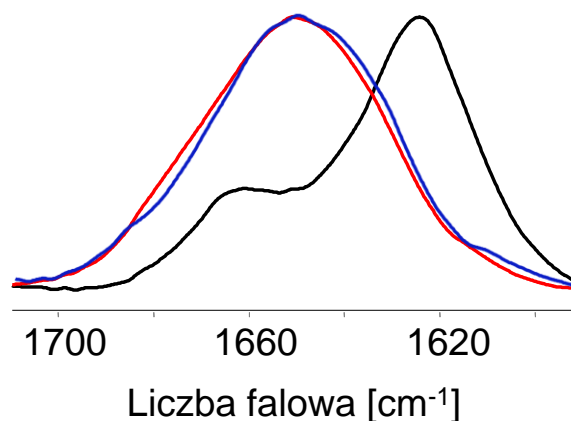
Pasma amidowe	Położenia pasma w D ₂ O [cm ⁻¹]	Opis drgań
A	~3300	Rozciągające grup N-H, nieczułe na konformację łańcucha głównego a jedynie na siłę wiązania wodorowego. Pasma te B stanowią dublet pochodzący od rezonansu Fermiego z pierwszym nadtonem pasma Amid II, położonym przy ok. 3100-3030 cm ⁻¹ .
B	~3100	
I	1600-1690	Rozciągające C=O, rozciągające C-N oraz deformacyjne N-H w płaszczyźnie. Odzwierciedlają konformację II-rzędową.
II	1480-1575	Zginające w płaszczyźnie N-H i rozciągające C-N. Czułe na wymianę H-D.
III	1229-1301	Rozciągające C-N i zginające w płaszczyźnie N-H. Można je skorelować z pasmem amid I.
IV	625-767	Zginające grup O=CN.
V	640-800	Zginające „poza płaszczyznę” grup N-H.
VI	537-606	Zginające „poza płaszczyznę” grup C=O.
VII	~200	Drgania torsyjne łańcucha głównego.

konformacji najistotniejsze jest pasmo amid I/I' odpowiadające w 85% drganiu rozciągającemu C=O, ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) oraz drganiom rozciągającym C-N i deformacyjnym N-H [Pelton, 2000]. Pomiary w podczerwieni dla białek prowadzone są przede wszystkim w roztworach ze względu na możliwość śledzenia kinetyki procesów takich jak przejście ze struktury α -helikalnej do β -kartkowej w trakcie agregacji. Najczęściej wykorzystywany rozpuszczalnik – woda – silnie absorbuje w zakresie odpowiadającym pasmu amidowemu I (drgania zginające H-O-H przy ok. 1640 cm^{-1}). Przeszkodę tę można pokonać na dwa sposoby: wykonując pomiar na bardzo krótkiej ścieżce optycznej przy dużym stężeniu białka i zwiększając w ten sposób stosunek sygnałów analiz/roztwór bądź wykonując pomiary w wodzie ciężkiej, gdzie pasmo D-O-D jest przesunięte w kierunku niższych częstości (ok. 1216 cm^{-1}) mniej istotnych dla analizy białek. Zastosowanie tej drugiej metody wiąże się z podstawieniem H-D wymienialnych protonów w białku. Nie wpływa ono znacząco na stabilność analizowanych struktur. Aby rozróżnić pomiary wykonane w wodzie zwykłej i ciężkiej stosuje się notację „amid I” dla H_2O oraz amid I''' dla D_2O . Położenie pasma amid I nie zmienia się znacząco przy zastosowaniu D_2O .

Tab. 3 Położenie pasma amid I' IR dla różnych konformacji II-rzędowych białek.

Konformacja	Położenia pasma amid I' D_2O [cm^{-1}]
α -helisa	1647-1654
β -kartka równoległa	1620-1638
β -kartka antyrównoległa	1610-1638 (silne) i 1662-1686 (słabe)
kłębek statystyczny	1640-1660
skręty i struktury nieuporządkowane	ramię przy ok. 1660

W badaniach agregacji białek podstawowe znaczenie ma analiza położenia pasma amid I/I', którego położenie zależne od lokalnej konformacji łańcucha głównego jest czułe na siłę wiązań wodorowych tworzonych z karbonylowym atomem tlenu. Utworzenie się wiązania wodorowego osłabia wiązanie C=O i następuje przesunięcie pasma w stronę niższych energii, co jest charakterystyczne dla silnych wiązań wodorowych. Należy mieć jednak świadomość, że w przypadku słabszych oddziaływań wodorowych może zdarzyć się odwrotny proces czyli odpyw ładunku z takiego wiązania [Grabowski, 2006; Woźniak, 2003]. Porównanie struktury pików wchodzących w amyloidowe pasmo amid I' pozwala na bardzo szczegółowe rozróżnienie wariantów strukturalnych agregatów jako że β -kartki mogą różnić się pomiędzy sobą siłą oddziaływań wodorowych pomiędzy budującymi je łańcuchami. Przykładem mogą być dwa rodzaje β -kartki tworzonej przez kwas



Rys. 27 Widma FT-IR w zakresie pasma amid I dla różnych struktur II-rzędowych białek: α -helisy (czerwony), β -kartki (czarny) oraz kłębka statystycznego (niebieski).

poliglutaminowy [Fulara, 2010]. Jednocześnie, o ile rozróżnienie pomiędzy α -helisą i β -kartką jest bardzo wyraźne, to piki charakterystyczne dla struktury typu kłębek statystyczny oraz α -helisa mają bardzo zbliżone położenie, co utrudnia identyfikację tych konformacji za pomocą techniki IR. Dodatkowo, w przypadku widm struktur β -kartkowych niemożliwe jest wnioskowanie czy agregat jest amorficzny czy fibrylarny. Należy także pamiętać, że pasmo amid I/I' jest efektem nakładania się zarówno wkładów od struktur II-rzędowych, jak i od reszt bocznych (aminokwasy Gln, Tyr, Arg). Warto też podkreślić, że przypisanie położenia pasma amid I' konkretnym typom struktur II-rzędowych nastąpiło na drodze empirycznych porównań, co pociąga za sobą ograniczenia zastosowania spektroskopii w podczerwieni do rozróżniania wariantów strukturalnych nowych klas białek. O ile teoria Miyazawy [Miyazawa, 1961] racjonalizuje geometrię pasm amidowych dla homopolipeptydów, o tyle w przypadku niejednorodnego składu aminokwasowego sytuacja staje się bardziej skomplikowana co utrudnia symulacje komputerowe widm IR dla białek.

Drugim istotnym diagnostycznie pasmem jest pasmo amid II, będące efektem złożenia drgań zginającego N-H i rozciągającego C-N, ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$). Analiza pasma amid II' ma zastosowanie w innym typie eksperymentów IR. O ile piki amid I' nie zmieniają znacząco położenia przy zastosowaniu H_2O bądź D_2O , o tyle pasmo amid II jest niezwykle czułe na efekty izotopowe (przesunięcie o ok. 100 cm^{-1} w kierunku niższych liczb falowych, a więc wyższych energii w przypadku podstawienia H-D). Wymiana H-D jest możliwa w wypadku wystawienia wymiennych protonów na działanie rozpuszczalnika, a więc jest powolna dla zwiniętych białek i zostaje przyspieszona w trakcie denaturacji. Kinetyka procesu wymiany H/D jest więc miarą stabilności struktury III-rzędowej [Hoshino, 2002].

Technika spektroskopii FT-IR charakteryzuje się pomiarem widma jednocześnie w całym badanym zakresie spektralnym. W aparaturze tego typu źródło promieniowania jest polichromatyczne. Wiązka światła przechodzi przez interferometr Michaelsona, dzięki czemu

generowane jest z różną intensywnością promieniowanie w całym niezbędnym zakresie częstotliwości. W czasie ok. 1 sekundy rejestrowane jest całe widmo próbki. Pomiar jest wykonywany wielokrotnie, przez co zwiększa się stosunek sygnału do szumów. Następnie uzyskane dane pomiarowe (zarejestrowane interferogramy) wymagają procesowania przy użyciu transformaty Fouriera, a więc informacja o absorpcji w funkcji czasu uśrednionej z n widm jest procesowana w celu otrzymania widma w postaci zależności absorpcji od liczby falowej [Griffiths, 2007]. Technika ta znacznie zwiększa szybkość pomiaru oraz rozdzielczość uzyskanych widm IR.

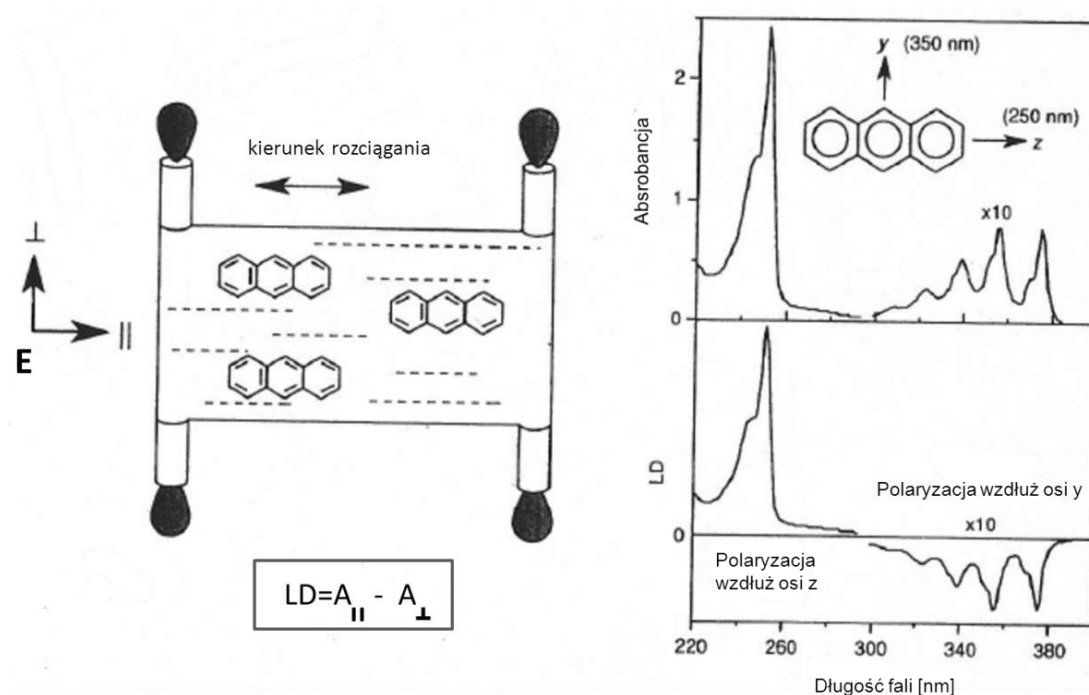
3.2 Spektroskopia UV-Vis

Jest to technika absorpcyjna w zakresie światła widzialnego i nadfioletu, a więc rejestrująca przejścia elektronowe. W przypadku cząsteczek biologicznych w typowym zakresie długości fali (powyżej 190 nm) obserwowane są szerokie pasma od grup zawierających wiązania wielokrotne. Dla białek są one wynikiem absorpcji światła przez wiązania peptydowe (zakres ok. 190-230 nm, przejście $\pi-\pi^*$ i wzbronione $n-\pi^*$) oraz układy aromatyczne grup bocznych aminokwasów (fenyloalanina – 258 nm, tyrozyna – 274 nm, tryptofan – 278 nm, przejścia $n-\pi^*$ i $\pi-\pi^*$), a także mostki dwusiarczkowe (ok. 260 nm, przejście $n-\Sigma^*$). W badaniach biofizycznych pomiary UV-Vis służą przede wszystkim określeniu stężenia białka w próbce poprzez pomiar intensywności widm chromoforów aromatycznych (w szczególności tyrozyny) i uwzględnienie ich współczynników absorpcji. Jednocześnie przesunięcia położenia pasm i zmiany ich kształtu i intensywności mogą świadczyć o zmianie otoczenia badanego chromoforu, wywołane np. zmianą struktury drugorzędowej białka i wyeksponowaniem go na rozpuszczalnik. W przypadku absorpcji przez chromofory amidowe łańcucha głównego rozszczepienie pasma absorpcyjnego i obecność podwójnego maksimum w widmie jest wywoływane sprzężeniem ekscytonowym pomiędzy momentami przejścia w tych chromoforach, jak to ma miejsce dla α -helisy. Hipochromizm, czyli obniżenie intensywności sygnału jest skutkiem rozproszenia energii poprzez wzajemne oddziaływanie stanów wzbudzonych. Z kolei zmiana położenia pików może wynikać ze zmiany polarności środowiska skutkującej zmianą energii poziomów podstawowych i wzbudzonych. Dla przykładu, jeżeli rozpuszczalnik (woda) jest bardziej polarny niż hydrofobowe środowisko wewnątrz zwiniętego białka, to następuje przesunięcie maximum pików aromatycznych reszt bocznych w kierunku fal krótszych (ang. *blue shift*). Wszystkie te efekty spektralne mogą być wykorzystane w badaniach białek.

3.3 Spektroskopia dichroizmu liniowego (LD)

Dichroizm liniowy jest miarą różnicy absorpcji ortogonalnych, spolaryzowanych liniowo wiązek promieniowania. Opiera się on na zależności absorpcji od wzajemnej orientacji momentów przejścia cząsteczki (μ) i składowej elektrycznej fali (E), jako że prawdopodobieństwo absorpcji

kwantu światła jest proporcjonalne do kwadratu momentu przejścia oraz do kwadratu cosinusa kąta pomiędzy wektorami μ i E . Intensywne efekty LD mogą być obserwowane w kryształach (oprócz kryształów centrosymetrycznych), gdzie orientacja wszystkich cząsteczek jest jednakowa. Z kolei w roztworach, ze względu na losową orientację momentów przejścia cząsteczek, dichroizm liniowy nie jest obserwowany – absorpcja promieniowania dla różnych ustawień płaszczyzny fali ma jednakową intensywność. Dichroizm liniowy jest więc miarą anizotropii optycznej ośrodka tj. globalnej orientacji cząsteczek, które go tworzą. Pomiar LD przeprowadza się w celu zbadania stopnia uporządkowania próbki bądź też w celu obserwacji kinetyki procesu, w trakcie którego tworzą się obiekty o konkretnym ukierunkowaniu. Orientacji cząsteczek w próbce dokonuje się za pomocą kilku technik: rozciągania folii polimerowych pułapkujących badane molekuly, kierunkowemu rozsmarowywaniu próbki, orientacji w przepływie laminarnym bądź w polu elektrycznym. Do pomiarów dichroizmu liniowego zwykle wykorzystuje się odpowiednio dostosowane spektrofotometry CD.

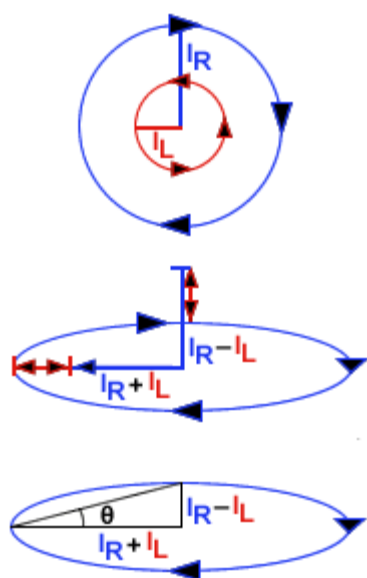


Rys. 28 Wyjaśnienie pochodzenia widma LD antracenu zorientowanego na rozciągniętej folii. Zgodnie z definicją dichroizmu liniowego sygnał dodatni występuje w przypadku momentów przejścia równoległych do osi polaryzacji wiązki, natomiast dla momentów przejścia prostopadłych jest ujemny. Na podstawie [Rodger, 2007].

3.4 Spektroskopia dichroizmu kołowego

Dichroizm kołowy polega na niejednakowej absorpcji światła spolaryzowanego kołowo prawo- i lewoskrętnie przez badany układ. Wynikiem jest superpozycja dwóch wiązek po przejściu przez absorbujący układ, które nadal są spolaryzowane kołowo lecz różnią się intensywnością – czyli światło spolaryzowane eliptycznie. Jego miara (eliptyczność) jest również miarą dichroizmu kołowego

przy danej długości fali. Zjawisko to zostało zaobserwowane już pod koniec XIX wieku. Występuje ono dla cząsteczek chiralnych bądź dla cząsteczek związanych z chiralnym otoczeniem (indukowany dichroizm kołowy). Pomiary CD biopolimerów wykonywane są najczęściej w zakresie światła widzialnego i nadfioletu, gdzie obejmują przejścia elektronowe, a także w zakresie podczerwieni, gdzie dotyczą przejść oscylacyjnych. Widma dichroizmu kołowego mierzy się w zakresach pasm charakterystycznych dla danego związku w jednostkach eliptyczności bądź dichroizmu kołowego.



Eliptyczność

$$\theta = \arctg\left(\frac{b}{a}\right)$$

Dichroizm kołowy

$$A_L - A_P = \frac{\theta \cdot 4\pi}{2,303 \cdot 180}$$

Rys. 29 Po przejściu przez próbkę chiralną komponent prawoskrętny i lewoskrętny fali elektromagnetycznej mają różną intensywność. Elipsoidalna opisująca nową polaryzację światła jest ograniczona przez dwa wektory a i b będące odpowiednio sumą ($I_R + I_L$) i różnicą ($I_R - I_L$) wektorów pola elektrycznego. Na tej podstawie definiowana jest eliptyczność fali (θ) [<http://www.photophysics.com/tutorials>].

Sygnal CD jest skutkiem jednoczesnych zmian elektrycznego i magnetycznego momentu dipolowego. Widoczne jest to w wyrażeniu na tzw. „siłę rotora” (ekwiwalentu siły oscylatora w zwykłej, niechiralnoptycznej spektroskopii absorpcyjnej), która określa intensywność przejścia CD:

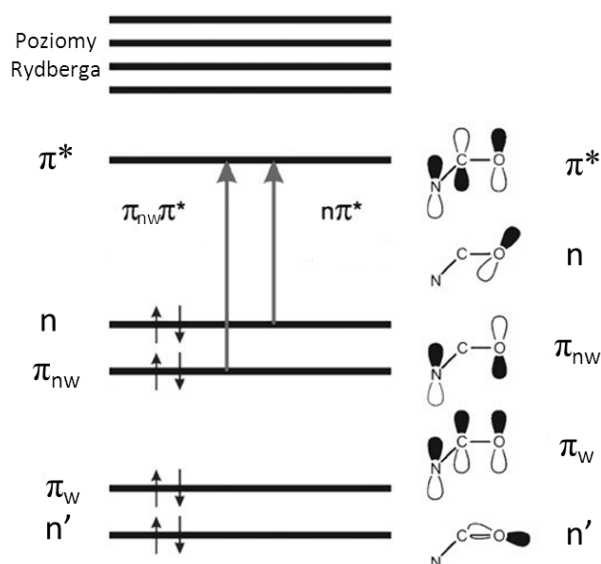
$$R_{0 \rightarrow 1} = \text{Im}(\langle \psi_0 / \mu / \psi_1 \rangle \cdot \langle \psi_1 / m / \psi_0 \rangle),$$

gdzie μ i m są operatorami odpowiednio elektrycznego i magnetycznego momentu dipolowego, natomiast ψ_0 i ψ_1 funkcjami falowymi elektronowego stanu podstawowego i wzbudzonego. Absorpcja elektryczna generuje ruch ładunku wzdłuż kierunku μ (dipol elektryczny). Oddziaływanie molekuly ze składową magnetyczną fali generuje kołowy obieg ładunku wokół osi wyznaczonej przez kierunek m (dipol magnetyczny). W przypadku równoległych komponentów członów elektrycznego i magnetycznego równania na siłę rotora indukowany jest helikalny obieg ładunku, a więc cząsteczka wykazuje aktywność optyczną.

W spektrometrach CD polaryzację eliptyczną fali uzyskują się dzięki zastosowaniu modulatora fotoelastycznego. Jest to element oscylujący, którego działanie opiera się na efekcie fotoelastycznym, a więc wykazywaniu dwójfomności przez materiały pod wpływem nacisku.

3.4.1 Elektronowy dichroizm kołowy

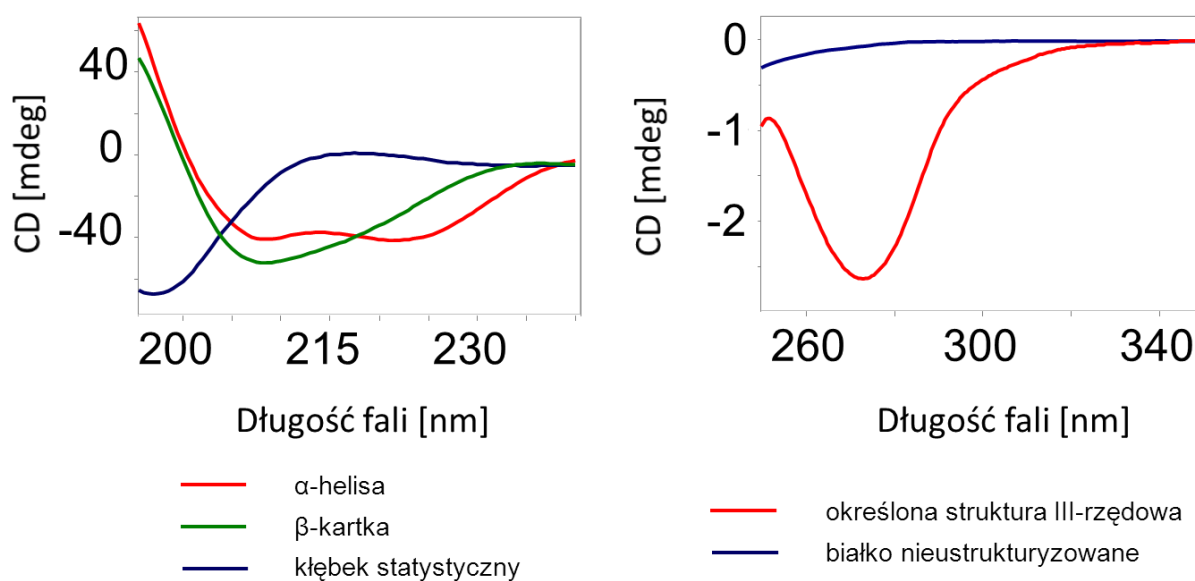
W zakresie dalekiego i bliskiego nadfioletu obserwuje się charakterystyczne pasma, które informują o konformacji białek. Istotne diagnostycznie są dwa zakresy długości fal. Obszar 190-240 nm odpowiadający absorpcji światła przez wiązania peptydowe pozwala na uzyskanie informacji o strukturze II-rzędowej białka, gdyż poszczególne warianty strukturalne charakteryzują się innymi widmami dichroizmu kołowego. Dla α -helisy obserwuje się maksimum przy 190 nm oraz minimum przy 208 nm wynikające z rozszczepienia ekscytonowego przejść elektronowych z amidowego orbitala niewiążącego π na antywiązący orbital π^* oraz ujemny pik przy 220 nm powstający przez



Rys. 30 Poziomy elektronowe grupy amidowej oraz geometria poszczególnych orbitali. Przejścia elektronowe zaznaczono strzałkami [Bulheller, 2007].

przejście elektronowe z orbitala wolnej pary elektronowej tlenu n na orbital π^* . Konformacja β -kartkowa charakteryzuje się maksimum przy ok. 195 nm oraz pojedynczym minimum przy 216 nm. Z kolei dla struktur typu kłębek statystyczny typowe jest pojedyncze minimum przy ok. 195 nm i rozmyte maksimum przy ok. 215 nm (Rys. 31) [Brahms, 1980]. Na podstawie udziału poszczególnych pasm można szacować udział poszczególnych konformacji II-rzędowych w strukturze białka. Nie jest to jednak proste i jednoznaczne, gdyż istnieje wiele doniesień, szczególnie o strukturach β -kartkowych, opisujących nietypowe widma dichroizmu kołowego. Obliczenia te mają największe zastosowanie dla białek natywnych i w tym przypadku są często zgodne z danymi krystalograficznymi.

Ze względu na duży udział konformacji α -helikalnych w strukturze białek natywnych w badaniach agregacji śledzi się przede wszystkim przemianę α w β która jest bardzo wyraźna w widmach CD, a więc metoda ta służy do badania kinetyki przemian struktur białkowych. Z analizy krzywych kinetycznych i przy uwzględnieniu temperatury przemian można wyznaczyć także parametry termodynamiczne takiego procesu. Pomiaru wykonywane są zazwyczaj do 190 nm ze względu na absorpcję krótszych fal przez roztwory buforowe.



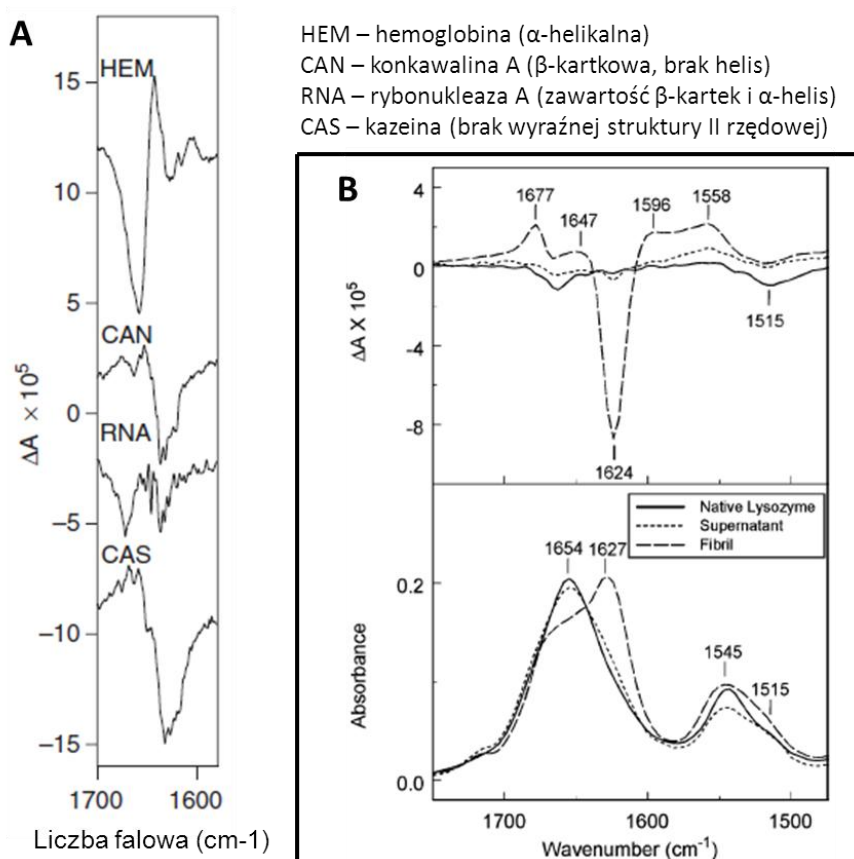
Rys. 31 Charakterystyczne widma dichroizmu kołowego białek w zakresie dalekiego oraz bliskiego nadfioletu.

Drugi zakres długości fal, w którym można uzyskać informację o strukturze białka to tzw. bliski nadfiolet (240–350 nm). W tym obszarze absorbują aromatyczne grupy boczne (260–320 nm) z niewielkim udziałem mostków dwusiarczkowych (ok. 260 nm), a więc do pomiarów jest konieczna obecność takich grup funkcyjnych w białku. Sprzężenie pomiędzy indywidualnym momentem przejścia w takiej reszcie aminokwasowej a najbliższym centrum chiralnym (C_α) generuje bardzo słabą siłę rotatora i słabe CD. Typowy silny sygnał w bliskim nadfiolecie powstaje w wyniku sprzężeń momentów przejścia w blisko położonych resztach aromatycznych znajdujących się w chiralnym układzie, np. w α -helisie. Kształt widm zależy od mobilności grup oraz właściwości otoczenia – zarówno białkowego jak i roztworu (polarność, tworzenie wiązań wodorowych) [Kelly, 2005]. Widma w zakresie bliskiego nadfioletu zapewniają więc informację na temat struktury III-rzędowej białka i rozróżniają przede wszystkim struktury uporządkowane od struktur typu kłębek statystyczny lub tzw. *molten globule* (częściowo zdestabilizowany stan natywny o mniej ściśle upakowanych resztach bocznych aminokwasów) (Rys. 31). Widma tych ostatnich są praktycznie płaskie ze względu na wysoką mobilność aromatycznych grup bocznych [Ptitsyn, 1995].

Do zalet spektroskopii elektronowego dichroizmu kołowego należy możliwość wykonywania pomiarów w stosunkowo niewielkich stężeniach a więc do analiz jest wymagana niewielka ilość materiału badawczego.

3.4.2 Wibracyjny dichroizm kołowy

Analogicznie do elektronowego CD można wykonywać różnicowe pomiary absorpcyjne w zakresie podczerwieni. Ze względu na większą możliwą liczbę przejść oscylacyjnych niż elektronowych oraz mniejszą szerokość półkową pasm, za pomocą spektroskopii VCD można rozróżnić i scharakteryzować struktury o podobnych widmach CD, co jest szczególnie istotne w zastosowaniach białkowych. Dodatkową zaletą VCD jest brak utrudnień pomiarowych związanych z rozpraszaniem światła, co jest przeszkodą w elektronowym CD. Najczęściej analizowane i interpretowane są widma VCD odpowiadające zakresowi pasma amid I'. Dotychczasowo zebrane dane dla typowych białek α -helikalnych, t. j. hemoglobina oraz β -karkowych, t. j. konkawalina A posiadające widma VCD o przeciwnych znakach [Keiderling, 1997], służą jako wzorce do oszacowania udziału struktur typu α i typu β w mierzonych próbkach [Keiderling, 2002]. W przypadku β -katek amyloidowych widma VCD mogą się znacząco różnić od tych wzorcowych i zależą od struktury całego włókna.

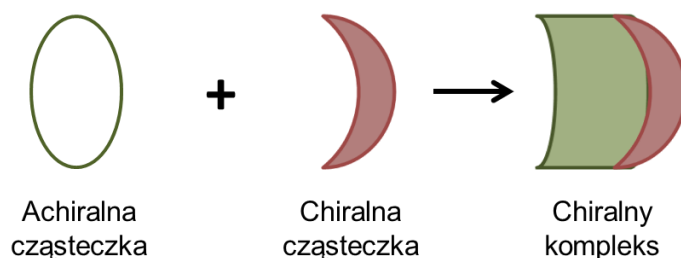


Rys. 32 Widma VCD pasma amid I' białek zbudowanych z różnego typu struktur II-rzędowych (A) [Keiderling, 2002]; porównanie widma VCD dla lizozymu natywnego oraz zagregowanego w pH 2 w 60°C (osad i supernatant) [Ma S., 2007].

Spektroskopia VCD może być wykorzystana do określenia kierunku skręcenia helikalnego β -kartkowych fibrylarnych agregatów, zarówno w przypadku polipeptydów zbudowanych z L i D-aminokwasów [Fulara, 2011] jak i włókien białkowych [Kurouki, 2010]. Intensywność sygnału VCD jest ok. 10^5 razy mniejsza niż intensywność absorpcji badanej próbki. Widma VCD dość skutecznie mogą być symulowane metodami *in silico*, co znacząco zwiększa znaczenie tej techniki pomiarowej [Stephens, 1985].

3.4.2 Indukowany dichroizm kołowy

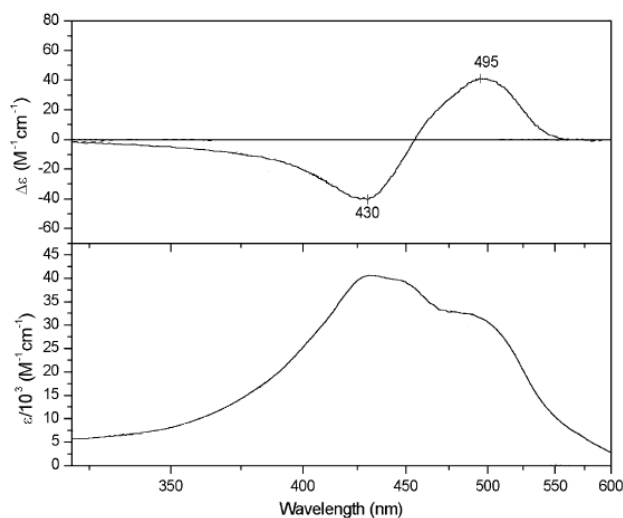
Jest to zjawisko nadawania achiralnym cząsteczkom chiralnych właściwości spektroskopowych przez optycznie czynne otoczenie. Pomiar ICD mogą służyć zrozumieniu struktury zarówno chiralnego związku kompleksującego jak i achiralnego ligandu. Początkowo wykonywano je przede wszystkim dla prostych związków organicznych, takich jak kompleksy cyklodekstryn z



Rys. 33 Objaśnienie mechanizmu indukcji dichroizmu kołowego w niechiralnych cząsteczkach.

achiralnymi chromoforami [Otagiri, 1974], jednak w końcu spektrum zastosowań rozszerzyło się m. in. o układy białkowe. Jednym z pierwszych zastosowań była analiza ICD w badaniach kompleksów błękitu Cibacon i czerwieni Kongo z różnymi rodzajami dehydrogenaz. Wykazano wówczas, że w przypadku pierwszego z tych barwników efekty chiralooptyczne były różne, natomiast kompleksy z czerwienią Kongo miały jednakowe widma ICD, a więc ligandy te miały inną czułość na różnice w strukturze dehydrogenaz [Edwards, 1977]. Innym, późniejszym przykładem zastosowania pomiarów ICD jest analiza oddziaływań kurkuminy z ludzką albuminą osocza, na podstawie której określono miejsce wiązania barwnika z białkiem [Zsila, 2003] (Rys. 34). Metoda ta znalazła także zastosowanie w badaniach agregatów insuliny za pomocą tioflawiny T [Dzwolak, 2005]. Fibryle amyloidowe o określonej chiralności stanowią asymetryczne „rusztowanie” które nadaje właściwości chiralooptyczne barwnikom z nimi związanym. Pomiar wykonywane są tak jak w przypadku standardowych widm CD, z tym że analizowane zakresy są dostosowywane do położenia pasm absorpcyjnych ligandów. Zjawisko ICD jest szczególnie użyteczne w sytuacji, gdy pomiar widm CD w zakresie pomiarowym związku kompleksującego nie jest możliwy np. ze względu na silną absorpcję

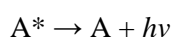
rozpuszczalnika, natomiast w zakresie dla ligandu - tak. Efekt ICD może wystąpić zarówno w zakresie elektronowym jak i wibracyjnym.



Rys. 34 Porównanie widm ICD i absorpcji molowej kompleksu kurkuminy z ludzką albuminą osocza w 0,1 M NaCl pH 9, bufor Tris-HCl [Zsila, 2003].

3.5 Spektroskopia fluorescencyjna

Technika ta opiera się na badaniu promienistego odtworzenia stosunku obsadzeń poziomów energii elektronowej. Proces fluorescencji zachodzi pomiędzy stanami o tej samej multipletowości, zwykle są to singletowe stany S_1 i S_0 . Czas życia fluorescencji, czyli średni czas pomiędzy momentem wzbudzenia a powrotem do stanu podstawowego wynosi ok. 10^{-8} sekundy. Proces absorpcji promieniowania możemy opisać jako:



Uznając, że jego szybkość emisji jest proporcjonalna do liczby molekuł w stanie A^* , opisujemy ją zgodnie z notacją dla reakcji pierwszego rzędu:

$$v_{Em} = k_E \cdot n_{A^*}$$

Podobnymi równaniami możemy opisać bezpromienisty proces relaksacji, z tym że kwant światła nie jest w takim procesie emitowany.

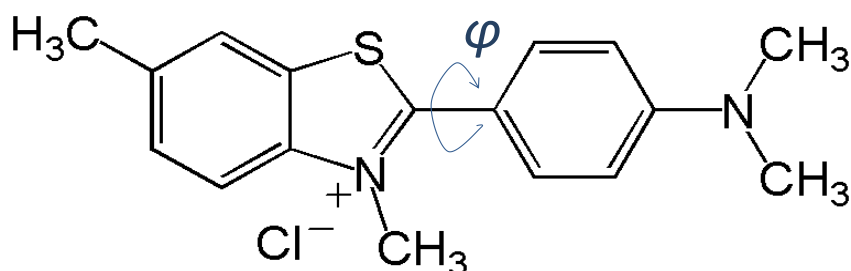
Na widmo fluorescencji wpływ ma bezpośrednio otoczenie fluoroforu, a więc dostępność i fizykochemiczne właściwości rozpuszczalnika, ale również obecność innych fluoroforów w bliskiej odległości. Związane jest z tym często obniżenie intensywności fluorescencji, które może być wywołane kilkoma zjawiskami. Zasadniczą molekularną przyczyną obniżenia intensywności fluorescencji jest wygaszanie (ang. *quenching*). Proces ten zachodzi za sprawą dwóch podstawowych mechanizmów: poprzez tworzenie się niefluorescencyjnego kompleksu wygaszacza z fluoroforem

(wygaszanie statyczne) bądź przez oddziaływanie wygaszacza ze stanem wzbudzonym fluoroforu prowadzącym do bezpromienistego powrotu do stanu podstawowego (wygaszanie kolizyjne).

Możliwy jest pomiar dwóch typów widm: wzbudzeniowych i emisyjnych. W przypadku widm wzbudzeniowych monochromator emisyjny ustawiony jest na określoną długość fali w zakresie fluorescencji, natomiast monochromator na wiązce światła wzbudzającego przemiata zmieniającą się długością fali. Znacznie częściej analizowane są widma emisyjne, kiedy to monochromator wzbudzający jest ustawiony na określoną długość fali absorbowaną przez próbkę, natomiast monochromator emisyjny rejestruje wypromieniowywane światło w całym zakresie.

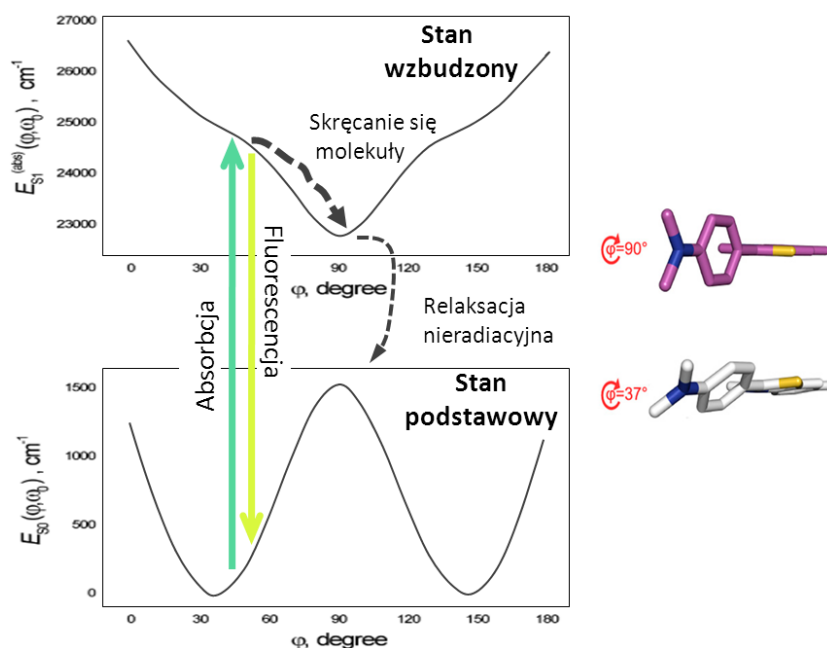
W spektroskopii fluorescencyjnej rejestruje się sygnał pochodzący od fluoroforu będącego integralną częścią badanego układu (fluorescencja wewnętrzna) lub mierząc fluorescencję zewnętrzną znacznika związanego z analizowaną cząsteczką. W pierwszym przypadku w eksperymentach z białkami rejestruje się widma chromoforów aromatycznych, stanowiących reszty boczne aminokwasów – tryptofanu oraz tyrozyny. Pomiar fluorescencji tryptofanu są najbardziej użyteczne ze względu na wysoki współczynnik absorpcji grupy indolowej, wyraźne rozdzielenie pomiędzy położeniami pasma absorpcji i emisji oraz czułość na wygaszanie. Fluorescencja fenyloalaniny jest bardzo słaba i praktycznie nie znajduje zastosowania w badaniach białek. Oczywiście w przypadku tej metody ograniczeniem jest obecność aromatycznych aminokwasów w sekwencji budującej białko. Jeśli chodzi o fluorescencję zewnętrznego znacznika, to w przypadku białek jego wybór zależy od informacji, którą chcemy uzyskać i od tego, z jaką formą konformacyjną taka sonda się wiąże [Hawe, 2008]. Najbardziej użyteczna jest grupa barwników nie wiążących się kowalencyjnie z białkiem. Można tu wymienić ANS (kwas 8-anilino-1-naftalenosulfonowy), czuły szczególnie na formę częściowo zwiniętą (ang. *molten globule*) [Semisotnov 1991], czerwień nilową oddziałującą z hydrofobowymi powierzchniami w przypadku destabilizacji i agregacji białek [Sackett, 1987] i tioflawinę T interkalującą w β -kardce.

Tioflawina T jest barwnikiem fluorescencyjnym powszechnie stosowany do wizualizacji oraz do detekcji złogów amyloidowych [Naiki, 1989]. W obecności amyloidów obserwowane jest znaczne wzmocnienie fluorescencji tego barwnika [LeVine III, 1993]. Tioflawina T składa się z dwóch grup



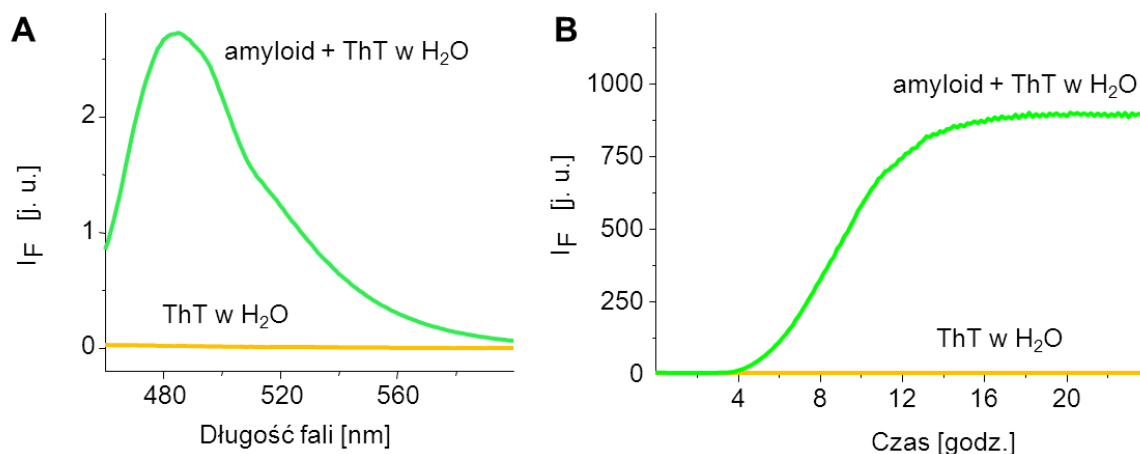
Rys. 35 Struktura ThT z zaznaczonym kątem dwuściennym pomiędzy dwoma grupami aromatycznymi. Rotacja grupy aminowej nie wpływa w istotny sposób na energię cząsteczki.

aromatycznych – pierścienia benzotiazolowego oraz dimetyloaminobenzenowego (Rys. 35). Częśćeczka ta należy do grupy rotorów molekularnych – jej wzbudzenie jest powiązane z wewnątrzcząsteczkową rotacją, która generuje transfer ładunku z części donorowej do części akceptorowej [Grabowski, 2003]. Na podstawie obliczeń opartych na metodzie DFT (ang. *Density Functional Theory*) określono, że swobodna cząsteczka tioflawiny T osiąga minimum energii w stanie podstawowym dla kąta dwuściennego φ równego ok. 37° . Krzywa energii potencjalnej dla stanu wzbudzonego (Rys. 36), występującego tuż po absorpcji fotonu (stan Francka-Condon), wygląda zupełnie odmiennie, gdyż minimum energetyczne przypada na $\varphi=90^\circ$. Grupy aromatyczne mogą



Rys. 36 Wykresy energii stanu podstawowego i stanu wzbudzonego tioflawiny T w zależności od kąta φ i zbioru innych parametrów geometrycznych cząsteczki (ω). Na podstawie [Stsiapura, 2007].

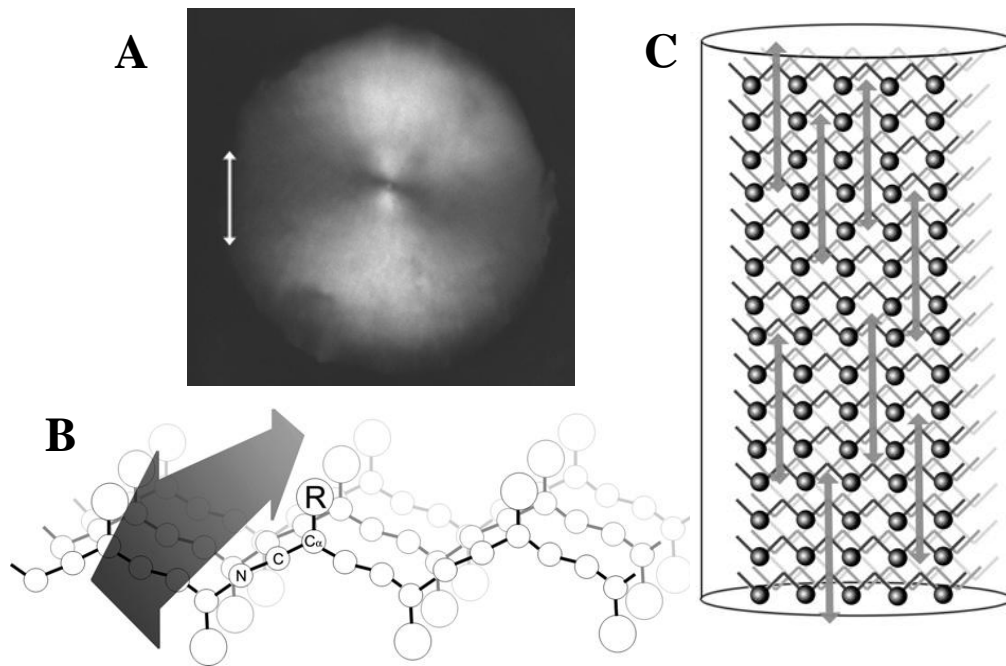
swobodnie rotować względem siebie gdy cząsteczka znajduje się w roztworze. Po pierwotnym wzbudzeniu następuje zwiększenie się kąta skręcenia z 37° do 90° powiązane z przeniesieniem ładunku ujemnego na grupę benzotiazolową. Zanika wówczas sprzężenie pomiędzy dwoma grupami aromatycznymi. Stan ten nazywany jest TICT (ang. *twisted internal charge-transfer*). Skutkiem tego prawdopodobieństwo przejścia radiacyjnego pomiędzy stanem wzbudzonym a stanem podstawowym jest bliskie zero. Wzrost wydajności fluorescencji występuje wtedy, gdy cząsteczka tioflawiny T znajduje się w środowisku o wysokiej lepkości bądź jest związana ze sztywnym układem blokującym rotację, takim jak włókno amyloidowe. Zmiana kąta φ jest wówczas utrudniona i powrót do stanu podstawowego zachodzi z konformacji zbliżonej do stanu Francka-Condon. Dzięki temu możliwe jest śledzenie przebiegu agregacji przy pomocy tego barwnika [Stsiapura, 2007]. Przy czym w rozpuszczalnikach protycznych wzbudzenie następuje przy ok. 340 nm a emisja przy 445 nm, natomiast po związaniu z amyloidem maksimum ekscytacyjne przesuwają się do 450 nm a emisyjne do



Rys. 37 Widmo fluorescencji po wzbudzeniu falą o dł. 450 nm tioflawiny T związanej z amyloidem (A) oraz kinetyka agregacji białka śledzona przy pomocy obserwacji zmian fluorescencji tioflawiny T (B).

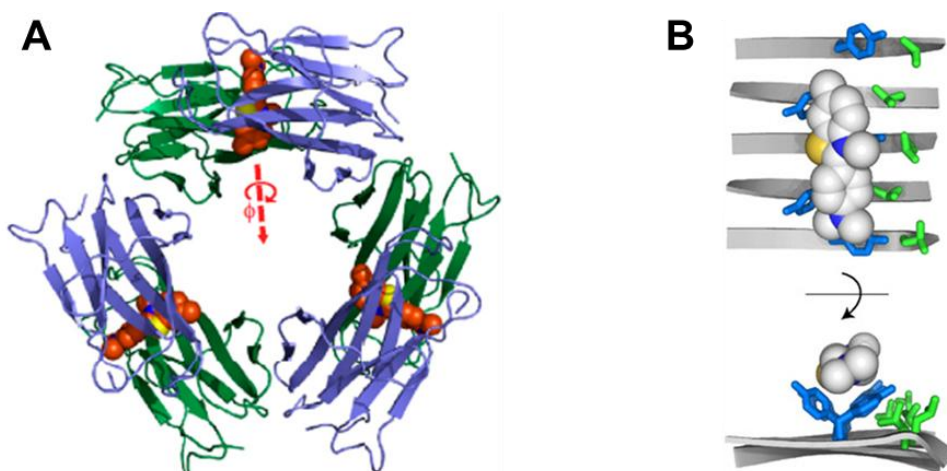
480 nm. Tioflawina T interkaluje w β -kartce amyloidowej zarówno w przypadku agregatów wielu różnych białek jak i syntetycznych peptydów, a więc barwnik ten rozpoznaje motyw rusztowania β -kartkowego praktycznie niezależnie od sekwencji. Co istotne, wzrost fluorescencji jest wynikiem związania się tioflawiny T z dowolną β -kartką amyloidową, a więc badanie tego zjawiska nie daje informacji na temat długości powstałych włókien a jedynie o całkowitej ilości struktur fibrylarnych.

Tioflawina T w badaniach amyloidów jest szeroko stosowana od lat 90-tych, jednak nadal nie jest w pełni poznany sposób wiązania się tego barwnika z fibrylami amyloidowymi. Istotnym krokiem w zrozumieniu tych oddziaływań był eksperyment przeprowadzony przez M. R. H. Krebsa i współpracowników, w którym badano fluorescencję sferulitów zabarwionych tioflawiną T przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Sferulity naświetlono światłem spolaryzowanym w płaszczyźnie pionowej i zaobserwowano, że fluorescencja jest najsilniejsza w płaszczyźnie zgodnej z płaszczyzną wiązki wzbudzającej (Rys. 38 A). Znając kierunek absorpcyjnego momentu przejścia cząsteczki barwnika oraz układ β -kartek w fibryli wyciągnięto wniosek, iż tioflawina T interkaluje w rowkach włókna równoległe do jego osi [Krebs, 2005b] (Rys. 38 B, C). Rozdzielczość danych pochodzących z mikroskopii fluorescencyjnej była niewielka a dokładniejsze informacje o sposobie interkalacji tioflawiny T we włóknach są trudne do uzyskania ze względu na niejednorodność struktury fibryli. W celu określenia oddziaływań barwnik-amyloid wykonano szereg symulacji dynamiki molekularnej, wykorzystując w tym celu dane wysokorozdzielcze dla krótkich peptydów [Wu, 2008]. Te badania, oraz inne symulacje opierające się na podobnych strukturach białkowych, potwierdziły znaczenie rowków w β -kartce jako miejsc wiązania tioflawiny T, jak również wskazały istotność aromatycznych reszt bocznych [Biancalana, 2009] (Rys. 39 B). Określono także, że do związania barwnika konieczna jest β -kartka zbudowana minimalnie z 4 łańcuchów – pod warunkiem, że są one nienaładowane i zawierają aromatyczne reszty boczne [Wu, 2009]. Dlatego też większość β -kartkowych białek



Rys. 38 Fluorescencja sferulitu insuliny zabarwionego tioflawiną T, polaryzacja wiązki wzbudzającej zaznaczona strzałką (A); model tioflawiny T interkalującej we włóknie amyloidowym, cząsteczka barwnika zaznaczona strzałką – widok na płaszczyznę β -kartki (B) oraz na włókno z boku (C) [Krebs, 2005b].

globularnych nie wiąże tioflawiny T – zawierają one zwykle co najwyżej 3 i to nazbyt skręcone łańcuchy budujące taką strukturę [Chothia, 1973]. Znaczenie oddziaływań π -elektronowych w wiązaniu barwnika podkreśla także praca Michala Harela i współpracowników, w której przedstawiono strukturę krystaliczną kompleksu tioflawiny T z globularnym białkiem – acetylocholinoesterazą [Harel, 2008]. Z kolei dane strukturalne kompleksu tioflawiny T z β_2 -mikroglobuliną w amyloidopodobnej formie oligomerycznej potwierdziły, że barwnik interkaluje w



Rys. 39 Struktura kompleksu tioflawiny T z β_2 -mikroglobuliną w postaci sześciocząłowego kompleksu β_2 holo (A) [Wolfe, 2010] oraz model tioflawiny T interkalującej w β -kartkowej strukturze zawierającej 5 tyrozyn (B) [Biancalana, 2009].

β -kardce prostopadle do kierunku łańcuchów, przy czym tu także widoczna była stabilizacja kompleksu przez kontakty π - π i kation- π [Wolfe, 2010] (Rys. 39 A). Eksperyment ten też jest o tyle ciekawy, że o ile zakłada się, że tioflawina T fluoryzuje przy planarnym ułożeniu grupy benzotiazolowej i dimetyloaminobenzenowej, to w tym przypadku grupy aromatyczne były praktycznie prostopadłe, a jednocześnie występowało wzmocnienie fluorescencji. Było to wywołane stabilizacją ładunku na pierścieniach przez grupy boczne tyrozyn otaczających tioflawinę T. Oznacza to, że znaczącym wkładem we wzmacnianie fluorescencji tego barwnika są oddziaływania aromatyczne. Jednocześnie włókna amyloidowe zbudowane z polipeptydu nie zawierającego reszt aromatycznych – kwasu poli-L-glutaminowego – także wywołują wzmocnienie fluorescencji ThT [Fulara, 2010]. Takie rozumowanie pozwala wyjaśnić różną wydajność kwantową fluorescencji tioflawiny T interkalującej w amyloidach zbudowanych z innych białek prekursorowych.

3.6 Mikroskopia fluorescencyjna i w świetle spolaryzowanym

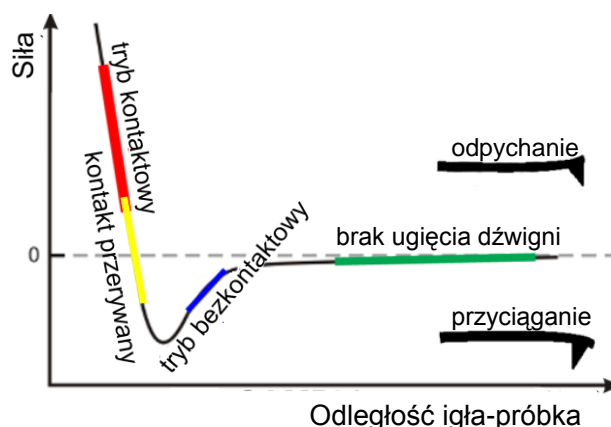
Mikroskopia optyczna jest jedną z podstawowych technik eksperymentalnych i znalazła zastosowanie także w badaniach amyloidów. Powiększony obraz jest generowany dzięki wykorzystaniu światła przechodzącego przez soczewki. Najprostszy tryb analizy obiektów opiera się na prostym, optycznym powiększeniu, jednak w pracy z białkowymi próbkami fibrylarnymi istotne są także dwa inne warianty obrazowania: fluorescencyjne i w świetle spolaryzowanym.

Analiza mikroskopowa amyloidów wybarwionych tioflawiną T przy użyciu techniki fluorescencyjnej została szeroko opisana w latach 60-tych [Hobbs, 1963] i jest odtąd klasyczną metodą rozpoznawczą w diagnostyce chorób związanych z agregacją białek, znajdującą także zastosowanie w eksperymentach biofizycznych *in vitro*. Ta metoda badawcza wymaga zastosowania odpowiednich filtrów optycznych. Obserwowane efekty optyczne można wyjaśnić w taki sam sposób, jak w przypadku spektroskopii fluorescencyjnej.

Obrazowanie w świetle spolaryzowanym przy skrzyżowanych nikolach bez wybarwienia próbki jest istotne dla jednego z typów struktury amyloidowej – sferulitów. W takim układzie optycznym światło nie trafia do detektora, chyba że na swej drodze trafi na obiekt dwójłomny, który zmieni polaryzację wiązki. Charakterystyczne obrazy „krzyża maltańskiego” dla sferulitów zostały zaobserwowane na przekrojach mózgu pacjentów cierpiących na jedną z odmian choroby Creutzfeldta-Jakoba [Manuelidis, 1997] oraz szczurów z rozwiniętą chorobą Alzheimera [Snow, 1994]. Motyw ten jest cechą rozpoznawczą ich obecności i świadczy o silnym uporządkowaniu fibryli budujących taką sferę.

3.7 Mikroskopia sił atomowych (AFM)

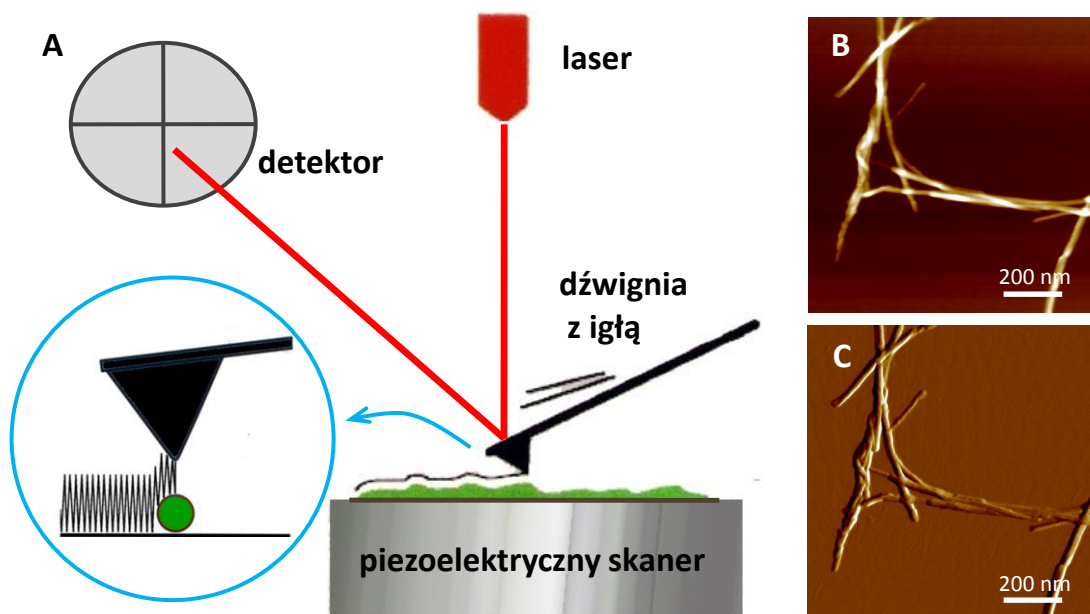
Mikroskopia sił atomowych jest jedną z technik obrazowania, wykorzystujących skanującą sondę (ang. *SPM* – *Scanning Probe Microscopy*). Powstała ona jako rozwinięcie techniki mikroskopii tunelowej z potrzeby badania nieprzewodzących próbek takich jak białka. Ideę AFM i pierwszy mikroskop przedstawili po raz pierwszy Binning i współpracownicy w 1986 roku [Binning, 1986]. W przypadku AFM w rejestracji obrazu powierzchni badane są oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy próbką a poruszającą się sondą. Jest ona zbudowana ze sprężystej dźwigni zakończonej ostrzem. Ostrze musi mieć jak najmniejsze, atomowe wymiary w celu uzyskania zadowalającej rozdzielczości. Ugięcie dźwigni pod wpływem oddziaływania igły z nierównościami powierzchni rejestrowane jest poprzez zmianę kąta odbicia wiązki lasera skierowanej na dźwignię i odbijającej się od jej powierzchni, rejestrowaną przez fotodiodę. Próbka nakropiona na gładką powierzchnię, np. mikę, jest umieszczona na piezoelektrycznym skanerze, który może zmieniać jej położenie w kierunkach x , y , z . Mikroskop AFM może pracować w różnych typach obrazowania, w zależności od rodzaju badanej próbki. Wynikają one z oddziaływań, które powodują ugięcie dźwigni. Siła oddziaływań międzycząsteczkowych (tak jak opisuje to uproszczony model – potencjał Lennarda-Jonesa – rys. 40) zwiększa się bardzo silnie wraz ze zmniejszaniem się odległości. Możliwe jest badanie sił krótkiego zasięgu (tryb kontaktowy AFM), kiedy to zachodzą bezpośrednie oddziaływania



Rys. 40 Model oddziaływań przyciągających i odpychających opisywany za pomocą potencjału Lennarda-Jonesa wraz z opisem różnych trybów pracy mikroskopu sił atomowych. Na podstawie [Maver, 2013].

pomiędzy atomami na czubku ostrza a atomami próbki i dźwignia jest odpychana oraz badanie sił dalekiego zasięgu (tryb bezkontaktowy AFM), w którym dźwignia jest przyciągana przez próbkę dzięki siłom van der Waalsa. Jednak w przy badaniu miękkich próbek biologicznych najczęściej jest wykorzystywany tryb *tapping mode* (kontaktu przerywanego), w którym na ruch dźwigni wpływ mają oba typy oddziaływań. W tej odmianie mikroskopii sił atomowych dźwignia drga z częstością zbliżoną

do swojej częstości rezonansowej. Amplituda oscylacji, wynosząca ok. 10-100 nm zmniejsza się wraz ze zbliżaniem się igły do powierzchni próbki, czyli w przypadku gdy obiekty na mice mają większe wymiary w osi z. W tym momencie elektroniczny mechanizm zwrotny dostosowuje położenie dźwigni w celu zachowania stałej amplitudy oscylacji. Taki tryb prowadzenia eksperymentu pozwala na obrazowanie miękkich próbek unikając ich niszczenia i zatapiania igły w próbce i dlatego jest najpopularniejszy w przypadku badań próbek biologicznych, warstw lipidowych czy polimerów [Zhong, 1993; Van Holde, 2005].



Rys. 41 Schemat mikroskopu AFM (A), obrazy AFM fibryli amyloidowych w trybie wysokościowym (B) oraz amplitudowym (C) (wyniki własne).

Stosuję się kilka sposobów obrazowania próbek w technice TM-AFM. Podstawowe obrazy wysokościowe (Rys. 41 B) przedstawiają topografię obiektów, jednak ich interpretacja jest utrudniona ze względu na dwuwymiarowość takiego obrazu kłopotliwą dla ludzkiego oka. W celu uwydatnienia kształtów obserwowanych obiektów rejestruje się obrazy amplitudowe (amplituda oscylacji dźwigni odpowiadająca nachyleniu powierzchni, rys. 41 C) bądź fazowe (faza oscylacji dźwigni wyrażająca wpływ oddziaływania dźwigni z powierzchnią). Należy pamiętać, że informacja w skali z takiego zdjęcia nie ma przełożenia na rzeczywistą topografię powierzchni.

Istotnymi cechami mikroskopii siła atomowych są:

- Możliwość badania miękkich, nieprzewodzących próbek bez napyłania metalu czy wybarwiania negatywowego
- Wysoka rozdzielczość – powiększenie do 10^6
- Obrazowanie w 3 wymiarach

3.8 Procedury pomiarowe

Widma FT-IR były rejestrowane na spektrofotometrze Nicolet Nexus zaopatrzone w detektor MCT chłodzony ciekłym azotem. Próbkę umieszczano pomiędzy szkiełkami z CaF_2 rozdzielonymi teflonową folią (ang. *spacer*) o grubości 25 μm . Pomiar odbywał się w komorze spektrofotometru w kontrolowanej atmosferze wolnej od CO_2 i pary wodnej, w temperaturze 25°C. Pojedyncze widmo rejestrowano poprzez akumulację 256 interferogramów o rozdzielczości 2 cm^{-1} . Pomiar FT-IR w laboratorium prof. Keiderlinga w Chicago wykonano na spektrofotometrze Vertex 80 (Bruker) wyposażonym w detektor DTGS z rozdzielczością 4 cm^{-1} , uśredniając 512 skanów. Ze względu na nakrywanie się pasma amid I oraz drgań zginających H_2O większość badanych próbek przygotowywano w wodzie ciężkiej. Niskie pD osiągnęto za pomocą rozcieńczonego DCl („pD” jest odczytem z pH-metru dla próbki rozpuszczonej w D_2O bez korekcji efektów izotopowych). Jeśli nie wskazano inaczej, pomiary wykonywano bezpośrednio na wyjściowej próbce. Obróbkę widm wykonano w programie GRAMS (ThermoNicolet, USA). Od zarejestrowanych widm odejmowano widmo buforu oraz tła komory pomiarowej.

Widma dichroizmu kołowego oraz liniowego w zakresie UV-Vis były rejestrowane przy pomocy spektropolarymetru Jasco CD Spectrometer J-815 w kuwetach kwarcowych. Pomiar ICD w laboratorium prof. Keiderlinga wykonano na spektrofotometrze J-810 (Jasco). Od widm odejmowano widmo rozpuszczalnika.

Widma VCD zmierzono na przyrządzie dyspersyjnym skonstruowanym w laboratorium prof. T. Keiderlinga (University of Illinois, Chicago) z rozdzielczością 12 cm^{-1} uśredniając 8 skanów, Aparatura ta została szczegółowo opisana w 2009 roku w pracy [Lakhani, 2009]. Próbkę do pomiarów VCD umieszczano pomiędzy szkiełkami z CaF_2 rozdzielonymi teflonową folią o grubości 25 μm . Od widm odejmowano widmo rozpuszczalnika.

Pomiary fluorescencji tioflawiny T prowadzono na spektrofluorymetrze luminescencyjnym Thermo Spectronic AMINCO Bowman Series 2. Widma emisyjne wzbudzano falą o długości 450 nm. Widma ekscytacyjne uzyskano dla emisji przy 482 nm. Pomiar przeprowadzono w temperaturze 25°C.

Pomiary kinetyczne fluorescencji wykonywano na czytniku fluorescencji Ascent FL fluorometer wyposażonym w parę filtrów λ_{ex} 440 nm / λ_{em} 485 nm w 96-dołkowych czarnych mikroplótkach.

Obrazy mikroskopowe uzyskano na mikroskopie optycznym w układzie odwróconym Nikon TE2000-E wyposażonym w kamerę CCD. Zastosowano 440-nm filtr do obrazów fluorescencyjnych oraz polaryzator i analizator do pomiarów w świetle spolaryzowanym. Analizowane próbki badano w roztworach wodnych po umieszczeniu kropli roztworu pomiędzy szkiełkami mikroskopowymi.

Obrazy AFM uzyskano za pomocą mikroskopu Nanoscope IIIa (Veeco) w trybie *tapping mode* z wykorzystaniem dźwigni TAP300-AI (BudgetSensors) o częstotliwości rezonansowej 300 kHz. Badane próbki amyloidów rozcieńczano 125-500-krotnie dejonizowaną wodą, po czym 8 μ l porcje roztworu nanoszono na świeżo-oddzieloną powierzchnię miki. Próbki pozostawiano na noc w celu wysuszenia. Dokonywano rejestracji obrazów wysokościowych i amplitudowych. W oparciu o ten pierwszy typ danych uzyskiwano przekroje fibryli oraz przeprowadzano pomiary odległości.

Wytrząsanie próbek odbywało się w przyrządzie Eppendorf Themomixer comfort wyposażonym w blok grzewczy.

3.9 Lista odczynników

1. DCI
2. D2O
3. Peptydy FFYTPKA oraz Ac-FFYTPKA – czystość >98%, zakupione w firmę Bachem S. A.
4. Insulina lispro – standard farmaceutyczny, zakupiona w LGC Standards
5. Insulina ludzka – udostępniona przez doktora Piotra Borowicza z Instytutu Badań Antybiotyków w Warszawie
6. Insulina wołowa – zakupiona w Sigma Aldrich
7. Insulina wieprzowa – standard farmaceutyczny, zakupiona w U.S. Pharmacopeial Convention
8. α -Laktoalbumina wołowa (typ I) - zakupiona w Sigma Aldrich
9. Lizozym z białka jaja kurzego – zakupiony w Sigma Aldrich
10. Peptyd LVEALYLV - czystość >98%, zakupiona w przez Bachem S. A.
11. Kwas poliglutaminowy (sole sodowe PLGA i PDGA) – $M_{cz.}$ 15-50 kDa, zakupiony w Sigma Aldrich

Stężenie roztworów białka jest podawane w pracy jako procent masowy (wt. %).

4. BADANIA WŁASNE I DYSKUSJA UZYSKANYCH WYNIKÓW

4.1 Dichroizm kołowy indukowany w sondach molekularnych jako źródło informacji o strukturze

Barwniki organiczne, w szczególności tioflawina T oraz czerwień Kongo są powszechnie wykorzystywane w badaniach amyloidów. W naszym przypadku przyczyniły się one do odkrycia chiralnych superstruktur amyloidowych insuliny. Zazwyczaj barwniki służą do wykrywania form zagregowanych białka oraz do badania kinetyki procesu tworzenia się takich struktur. Powszechnie stosuje się w tym celu spektroskopię i mikroskopię fluorescencyjną a także mikroskopię w świetle spolaryzowanym. Chociaż budowa kompleksów tioflawiny T oraz czerwieni Kongo z amyloidami nie została do końca wyjaśniona, wiadomo, że cząsteczki te interkalują w powierzchniowych bruzdach wzdłuż osi fibryli. Dodatkowo, istotną rolę w stabilizacji takich kompleksów odgrywają aromatyczne reszty boczne aminokwasów. Uważa się, że związana z amyloidem tioflawina T musi mieć konformację bliską planarnej ze względu na silnie wzmocnioną fluorescencję [Maskevich, 2007]. Jednak wiele kwestii pozostaje wciąż niejasnych, w tym nie istnieją szczegółowe dane krystaliczne kompleksów barwników ze strukturami β -karkowymi.

Uważa się, że tioflawina T i czerwień Kongo są specyficznymi ligandami dla struktur β -karkowych w przeciwieństwie do przeważnie α -helikalnych struktur natywnych białka. Dla czerwieni Kongo można znaleźć wiele wyjątków od selektywności – barwnik ten tworzy kompleksy z wieloma białkami natywnymi, między innymi z polimerazą RNA [Woody, 1981] czy z rozpuszczalną formą elastyny [Kagan, 1973]. Z kolei tioflawina T wiąże się z fibrylami bardziej wybiórczo i z oddziaływać z układami nieamyloidowymi opisano jak dotąd jedynie jej kompleks z α -helikalną acetylocholinoesterazą [Harel, 2008].

Badania spektroskopowe z wykorzystaniem barwników interkalujących w strukturach białkowych mogą być źródłem informacji o konformacji zarówno amyloidów jak i mniejszych oligomerów bądź form w pełni, lub częściowo natywnych. I tak, badania dichroizmu kołowego z wykorzystaniem czerwieni Kongo doprowadziły do wykrycia zdestabilizowanej formy ludzkiej fosfatazy kwaśnej [Kuciel, 1997]. Istnieje także wiele prac wykazujących wpływ tego barwnika na spowolnienie agregacji białek [Ingrosso, 1995; Khurana, 2001; Lendel, 2009]. Tioflawina T jak dotąd służyła głównie detekcji fibrylarnych agregatów [Duboisset, 2013; Krebs, 2005b]. Pomiar indukowanego dichroizmu kołowego tego barwnika jako metodę badania amyloidów zastosowano po raz pierwszy w pracach Dzwolaka i Pecul [Dzwolak, 2005] oraz Dzwolaka i Lokszejn [Dzwolak, 2007; Lokszejn, 2008].

Celem moich wstępnych badań kompleksów tioflawiny T z amyloidowymi oraz niezagregowanymi formami kwasu poliglutaminowego była weryfikacja istnienia deterministycznego transferu chiralnego pomiędzy kowalencyjną strukturą polipeptydu (w dwóch jego enancjomerycznych formach: kwas poli-L-glutaminowy i kwas poli-D-glutaminowy) a właściwościami chiralnoptycznymi

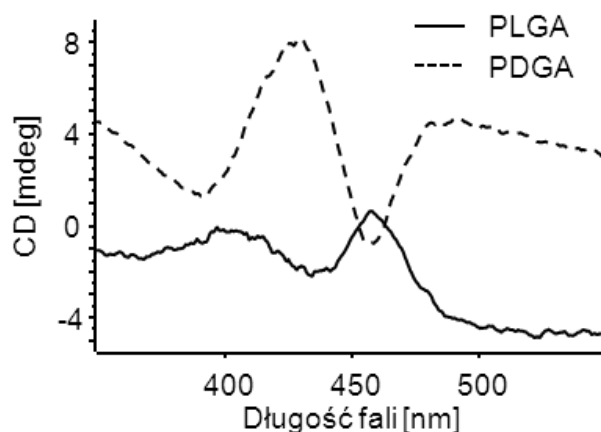
kompleksu w zakresie energii odpowiadającemu przejściom elektronowym w barwniku. Te początkowe badania doprowadziły nieoczekiwanie do wykrycia nieznanego wcześniej efektu dokowania molekuł ThT na nieamyloidowych formach kwasu poliglutaminowego.

4.1.1 Pomiar dichroizmu kołowego tioflawiny T interkalującej w β -kartkowych agregatach zbudowanych z kwasu pol-L- lub poli-D glutaminowego

Celem eksperymentu było porównanie intensywności oraz kształtu sygnału ICD uzyskanego dla struktury amyloidowej powstałej z polipeptydów zbudowanych wyłącznie z L, bądź D aminokwasów. Istotne było określenie, czy widma te będą miały przeciwstawne znaki, a więc czy można zaobserwować „intuicyjny” transfer chiralności pomiędzy atomową strukturą polipeptydu a konformacją tioflawiny T manifestujący się w widmie ICD.

Kwas poliglutaminowy posiada dodatkowe grupy karboksylowe przy resztach bocznych. Czyni to jego konformację niezwykle czułą na pH środowiska. W pH obojętnym i zasadowym PGA przybiera formę kłęбка statystycznego, w której odległości pomiędzy ujemnie naładowanymi resztami bocznymi są maksymalne. Obniżenie pH powoduje protonowanie grup karboksylowych i przejście do pozbawionej ładunku (z wyjątkiem N-końca) α -helikalnej. Inkubacja takiego roztworu w podwyższonej temperaturze skutkuje utworzeniem się β -kartkowych włókien amyloidowych, co czyni kwas poliglutaminowy użytecznym obiektem badań nad agregacją.

Amyloidy z kwasów poli-L oraz poli-D glutaminowego otrzymano poprzez inkubację w temperaturze 65°C przez 48 godzin roztworów polipeptydów w stężeniu 1 wt. % i pH 4,1. Takie warunki eksperymentu pozwalają na otrzymanie fibryli o tzw. strukturze β_2 [Fulara, 2010].



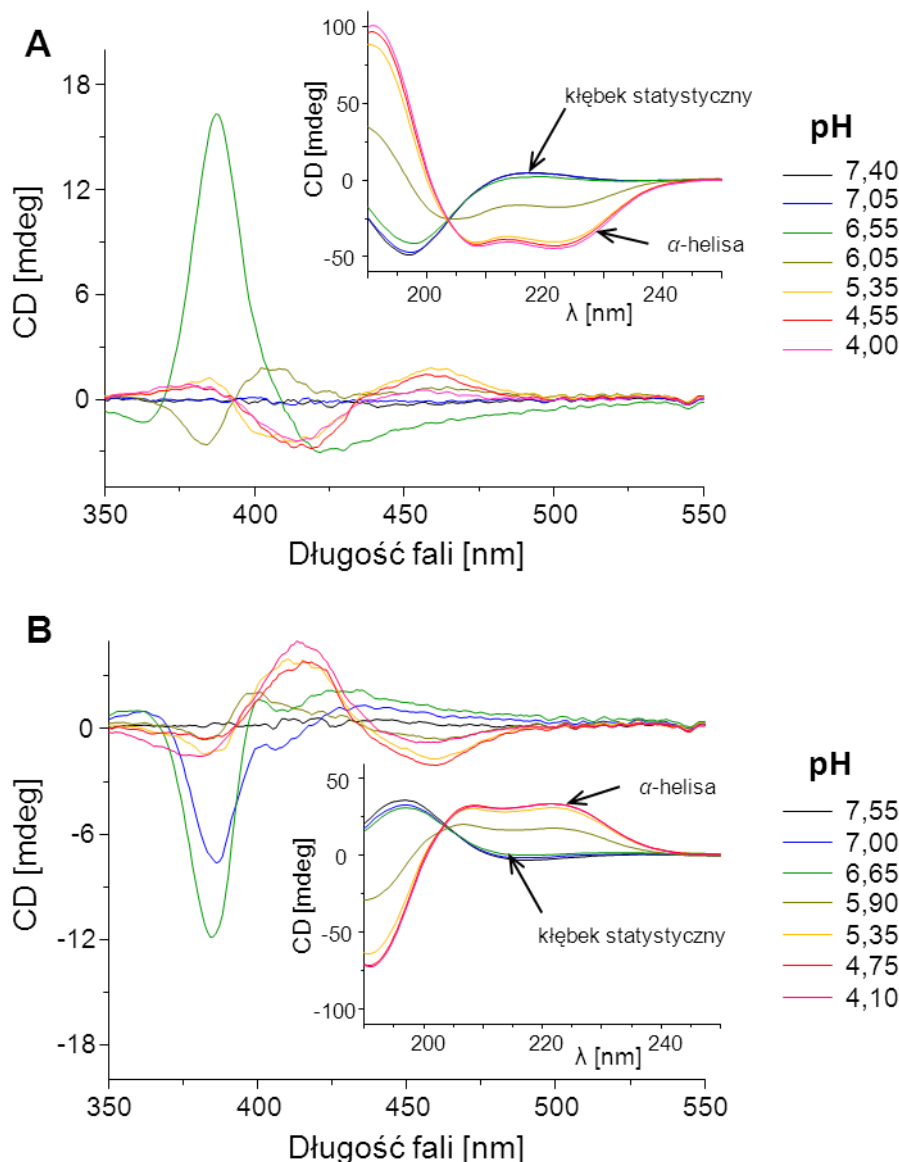
Rys. 42 Widma CD tioflawiny T związanej z β -kartkowymi strukturami zbudowanymi z PLGA oraz PDGA. Pomiary ICD wykonano przy stężeniu białka 0,02 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 4,1 z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 91 μ M. Zastosowano 10 mm kuwety kwarcowe.

Rysunek 42 przedstawia widma indukowanego dichroizmu kołowego tioflawiny T związanej z β -karkowymi fibrylami zbudowanych z kwasu poli-L oraz poli-D glutaminowego. Można zaobserwować, że sygnał ten ma umiarkowaną intensywność. Kształt widma – wyraźne minima i maksima w zakresie długości fali odpowiadającym absorpcji tioflawiny T sugerują konformacyjne pochodzenie sygnału, przy czym może zachodzić w tym przypadku także rozszczepienie poziomów energetycznych wywołane sprzężeniami ekscytonowymi pomiędzy indywidualnymi chromoforami. Dodatkowo polipeptydowe struktury typu β_2 różnią się od białkowych β -karków amyloidowych całkowitym brakiem aromatycznych reszt bocznych. Oznacza to, że pierścienie aromatyczne budujące tioflawinę T są skręcone względem siebie po związaniu się z kwasem poliglutaminowymi i rejestrowany sygnał jest wyłącznie skutkiem oddziaływań barwnika z rusztowaniem β -karkowym oraz alifatycznymi łańcuchami bocznymi. Zgodnie z przewidywaniami widma PLGA i PDGA mają przeciwny znak. Nie są one jednak idealnymi odbiciami lustrzanymi najprawdopodobniej ze względu na niejednakową masę cząsteczkową polipeptydów L i D, co może być przyczyną pewnych różnic w strukturze β -karków. Należy mieć na uwadze także rozpraszanie światła na silnie sedymentujących agregatach β_2 , które jest różne dla próbek o różnej masie cząsteczkowej.

4.1.2 Analiza dichroizmu kołowego indukowanego w tioflawinie T w trakcie przejścia kwasu poliglutaminowego ze struktury typu kłębek statystyczny w α -helisę

Dotychczasowe prace opisują tioflawinę T interkalującą w rusztowaniach β -karkowych bądź w otoczeniu grup aromatycznych. Badania ICD w obecności kwasu poliglutaminowego przy różnym pH wykonano w celu sprawdzenia czy tioflawina T może oddziaływać ze strukturami nie β -karkowymi.

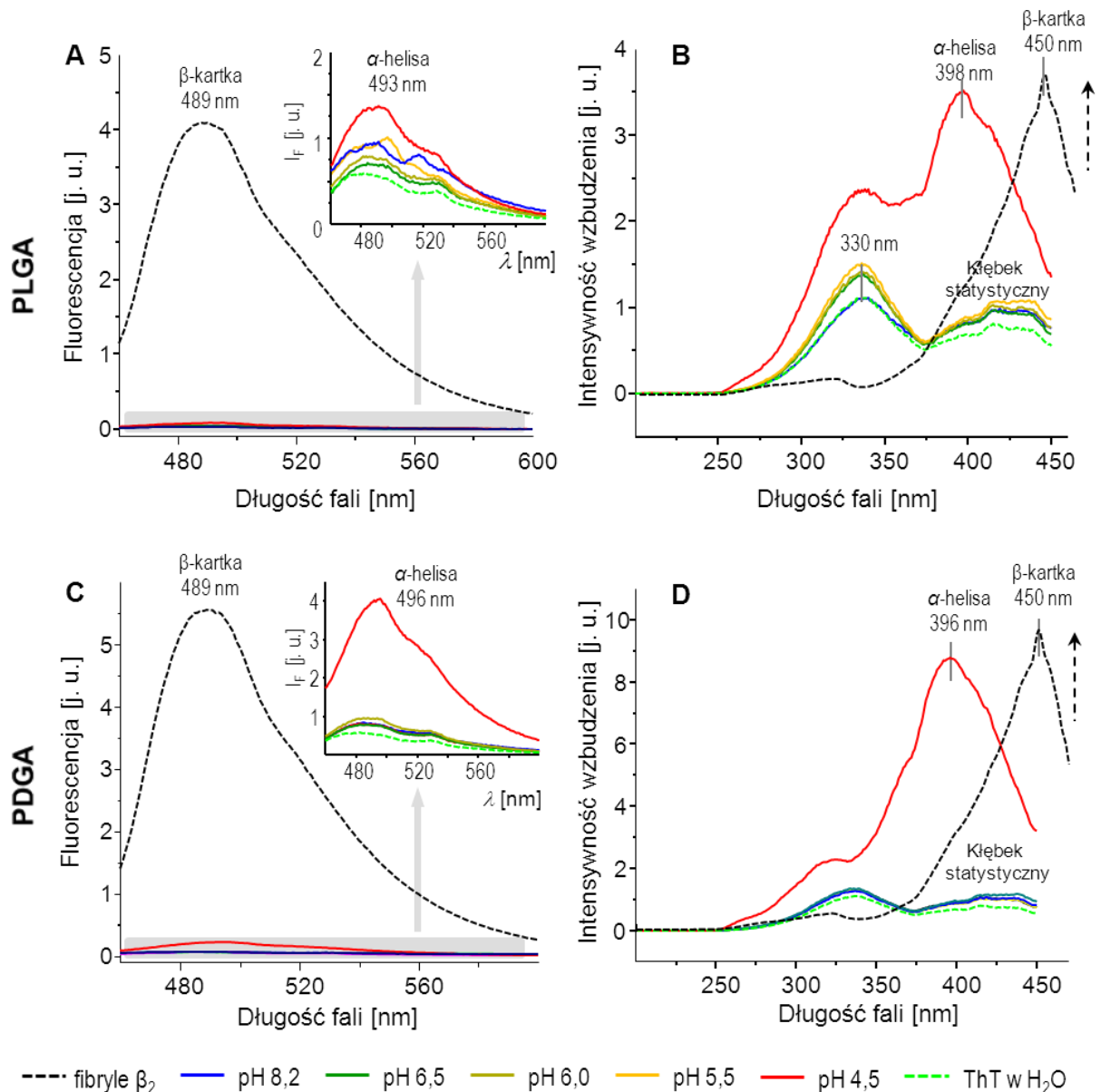
Zmierzono ICD po wybarwieniu tioflawiną T oraz CD w zakresie dalekiego nadfioletu roztworów wodnych PLGA i PDGA (Rys. 44). pH było sukcesywnie obniżane z początkowej wartości ok. 7,5 do końcowej 4,0 i jego wartość ustalano każdorazowo, po czym niezbędną ilość roztworu pobierano do pomiarów. W trakcie zakwaszania próbki kwasu poliglutaminowego zachodzi przemiana konformacyjna polipeptydu z kłębka statystycznego do α -helisy. Przejście to jest widoczne w widmach CD w zakresie dalekiego nadfioletu. Na odpowiadających im pod względem pH widmach ICD kompleksu PLGA (PDGA)-ThT widoczny jest niezerowy sygnał dla pewnego zakresu pH, który świadczy o oddziaływaniu tioflawiny T z kwasem poli-L- i poli-D-glutaminowym w formie nie- β -karkowej. Dla kłębka statystycznego widmo jest zupełnie płaskie. Zmiany zaczynają być widoczne przy pH 6,5-7, gdy konformacja ta zostaje zaburzona (mniej intensywne minimum dla peptydu w dalekim nadfiolecie). Pojawia się intensywny pik przy 387 nm, który bardzo szybko zanika wraz z obniżaniem pH. Dla pH ok. 6 w dalekim nadfiolecie widoczne są wkłady dichroizmu kołowego obu struktur – zarówno kłębka statystycznego jak i α -helisy. Odpowiadające im widmo ICD ma pośredni



Rys. 43 Widma ICD tioflawiny T dodanej do próbek kwasu poli-L-glutaminowego (A) oraz poli-D-glutaminowego (B). Wewnętrzne panele przedstawiają odpowiadające im widma dichroizmu kołowego polipeptydów w dalekim nadfiolecie w tym samym pH. Pomiar ICD polipeptydów w stężeniu 0,0225 wt. % wykonywano w kuwecie kwarcowej o grubości 1 cm po dodaniu tioflawiny T do stężenia 70 μ M. Pomiar CD peptydu w zakresie far-UV wykonywano dla tych samych roztworów w kuwecie kwarcowej o grubości 1 mm. Wartości pH wskazane w legendzie uwzględniają obniżenie pH o ok. 0,05 jednostki po dodaniu roztworu tioflawiny T.

kształt w przypadku PDGA oraz odwrotne położenie minimum i maksimum w przypadku PLGA. Następnie, wraz z dalszym obniżaniem pH i uzyskaniem przez polipeptydy konformacji α -helikalnej, stabilizuje się powtarzalny kształt widma ICD z minimum/maksimum przy 414 nm. W pH 6,5 kwas poliglutaminowy jest naładowany ujemnie, a zatem oddziaływanie polipeptydu z barwnikiem może mieć podłoże elektrostatyczne. Z kolei w pH ok. 4 wypadkowy ładunek na PGA jest bliski zera, a więc oddziaływania inne od elektrostatycznych muszą odgrywać główną rolę w asocjacji pary ThT-PGA. Z kolei w pH ok. 4 PGA jest znacznie słabiej naładowany, czyli kompleks z tioflawiną T ma inną naturę.

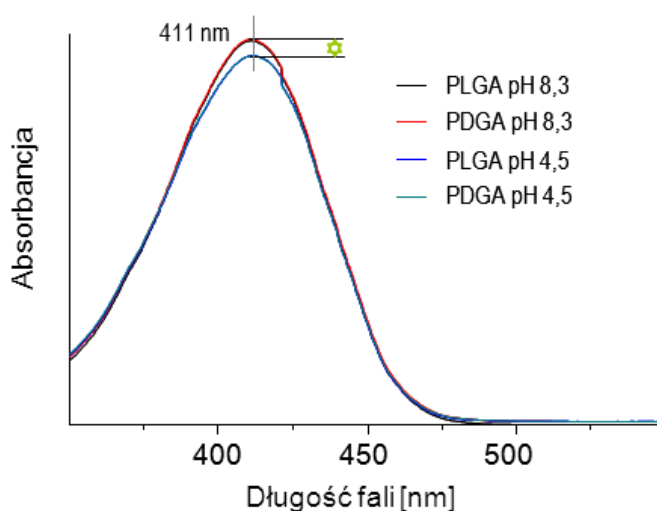
Tak więc te dwa typy widm ICD rejestrowane w trakcie przejścia kwasu poliglutaminowego ze struktury typu kłębek statystyczny w α -helikalną mogą mieć inny kształt zarówno ze względu na inną konformację próbkowanej struktury, o czym świadczy inny kształt pików CD dla polipeptydu w dalekim nadfiolecie jak i ze względu na inny sposób dokowania barwnika w polipeptydzie. W obydwu przypadkach położenie pików pochodzących od tioflawiny T jest przesunięte w kierunku krótszych fal w porównaniu z sygnałem rejestrowanym w obecności β_2 (Rys. 44). Przesunięcie ku fioletowi



Rys. 44 Widma emisji ($\lambda_{Ex}=482$ nm) i wzbudzenia ($\lambda_{Em}=482$ nm) fluorescencji dla kwasu poli-L-glutaminowego (A, B) oraz kwasu poli-D-glutaminowego (C, D) dla przejścia ze struktury kłębka statystycznego do α -helisy oraz dla formy amyloidowej β_2 . Widma ekscytacyjne dla β -kartki mają znacznie większą intensywność co zaznaczono strzałką. Roztwory wodne PLGA i PDGA miały stężenie 0,1 wt. %, tioflawinę T dodawano do stężenia 30 μ M. Widma dla próbek amyloidów typu β_2 zmierzono przy takim samym stężeniu białka i ThT po rozcieńczeniu próbki buforem o pH 4,30 i przy takim samym ustawieniu fotonowielacza. Pomiar wykonano w kuwecie plastikowej o grubości 1 cm.

świadczy o zaburzeniu π -elektronowego układu sprzężonego i sugeruje silne wzajemne skręcenie grup aromatycznych budujących cząsteczkę tioflawiny T, które zaczynają funkcjonować jako dwa odrębne chromofory [Maskevich, 2007].

Wnioski wynikające z analizy widm dichroizmu kołowego polipeptydu i indukowanego dichroizmu kołowego oddziałującej z nim tioflawiny T poparte są danymi fluorescencyjnymi. Na rysunkach 44 A i C widoczne są silne widma fluorescencyjne amyloidowej struktury β_2 z maksimum przy 489 nm, a więc w położeniu dość podobnym do tych obserwowanych dla białkowych struktur amyloidowych. Intensywność fluorescencji dla α -helikalnej formy kwasu poliglutaminowego jest o rząd wielkości mniejsza niż dla β_2 , choć i tak większa niż dla kłęбка statystycznego i konformacji pośrednich. Oddziaływanie tioflawiny T z α -helisą można odczytać także z widm wzbudzeniowych fluorescencji, gdyż maksimum ekscytacyjne jest przesunięte w kierunku krótszych fal do 396/398 nm w porównaniu z typowym maksimum dla amyloidów przy 450 nm, a jednocześnie znacznie różni się od krzywych zarejestrowanych dla struktur nieuporządkowanych. Co ciekawe, wyraźne rozbieżności w widmach ICD i fluorescencji dla tioflawiny T związanej z α -helikalną bądź β -kartkową formą kwasu poliglutaminowego nie idą w parze z równie dużymi zmianami w widmie absorpcyjnym (Rys. 45). Widoczne jest jedynie niewielki (jednakowy dla PLGA i PDGA) spadek absorpcji przy obniżeniu pH roztworu. Wyjaśnieniem tego jest prawdopodobnie znacznie niższa stała wiązania barwnika z peptydem α -helikalnym niż z β -kartkowym. O ile spektroskopia ICD i fluorescencyjna są czułe na sygnał pochodzący od tioflawiny T związanej z PGA to technika absorpcyjna rejestruje głównie dominujący sygnał od wolnych cząsteczek barwnika w roztworze.



Rys. 45 Absorbancja tioflawiny T związanej z PLGA/PDGA w pH 8,3 oraz 4,5. Widma zarejestrowano dla roztworów wykorzystanych w badaniach fluorescencyjnych.

Przeprowadzone badania na kwasie poliglutaminowym w formie amyloidowej wykazały zależność znaku ICD oddziałującej z nim tioflawiny T od molekularnej chiralności łańcucha polipeptydowego. Dodatkowo pomiary spektroskopowe dla przejścia PGA z kłęбка statystycznego do

α -helisy świadczą o możliwości wiązania się tioflawiny T z nie β -kartkowymi formami białek i nie zawierającymi grup aromatycznych, co jest istotne w kontekście selektywności tej sondy molekularnej.

4.2 Weryfikacja sygnałów dichroizmu kołowego próbek chiralnych agregatów

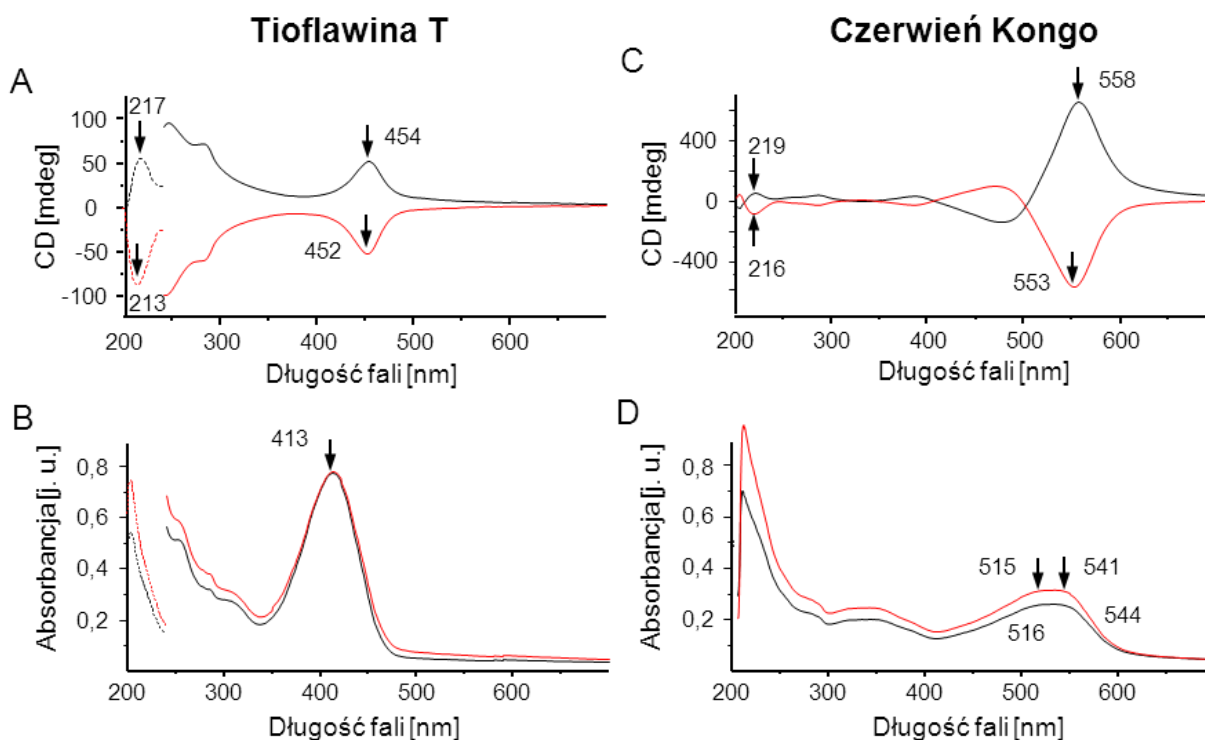
Amyloidy typu +ICD i –ICD są trójwymiarowymi, zwartymi skupiskami fibryli o znacznie większych rozmiarach i określonej orientacji. Te ich właściwości mogą utrudniać badanie „czystego” dichroizmu kołowego i prowadzić do powstania artefaktów pomiarowych wywołanych udziałem dichroizmu liniowego, dwójłomności oraz innych efektów optycznych w rejestrowanym widmie. Problem ten jest znany od lat i był wielokrotnie omawiany w literaturze, przy czym niekiedy wykazywano po czasie, że pierwotnie rejestrowane widma nie ukazywały rzeczywistych chiralnych właściwości próbki [Shindo, 1990]. Przez fachową literaturę przetoczyła się długa debata dotycząca pochodzenia sygnałów CD rejestrowanych dla zagregowanych porfiryńowych struktur powstałych pod wpływem mieszania (*J-aggregates*). [Tsuda, 2007; Wolffs, 2007; Arteaga, 2009; Sorrenti, 2012], której ostatecznym wnioskiem było potwierdzenie ich rzeczywistej chiralności. Innym zagrożeniem dla jakości pomiarów CD chiralnych superstruktur są duże rozmiary agregatów, na których zachodzi rozpraszanie światła. Jak wykazano w pracach Bustamante i współpracowników, w widmie dichroizmu kołowego może pojawić się znaczący wkład różnicowego rozpraszania światła spolaryzowanego kołowo (niejednakowego rozpraszania Rayleigha wiązek spolaryzowanych kołowo prawo- i lewoskrętnie) jeżeli wymiary badanych cząsteczek są większe niż 1/20 długości fali [Bustamante, 1983]. O ile rozmiar pojedynczej cząsteczki tioflawiny T jest znacznie poniżej tej granicy, o tyle możliwe efekty optyczne dla sprzężonego układu molekuł barwnika związanych z chiralnym agregatem są trudne do przewidzenia. Stąd celem moich wstępnych badań chiralnych superstruktur amyloidowych powstałych z insuliny była weryfikacja rzeczywistej natury rejestrowanych efektów CD i ICD.

4.2.1 Analiza porównawcza widm absorpcyjnych i dichroizmu kołowego w zakresie UV-Vis barwników interkalujących we włóknach amyloidowych

Celem badań było określenie relacji pomiędzy położeniem pasm w widmach absorpcyjnych i dichroizmu kołowego dla kompleksów tioflawiny T z próbkami amyloidów +ICD i –ICD. Agregację insuliny wołowej o stężeniu 1 wt. %, 0,1 M NaCl, przeprowadzono w ciągu 48 godzin w 40°C w pD 1,8, przy wytrząsaniu z prędkością 1400 rpm (warunki wywołujące chiralną bifurkację). Pomiarów CD i absorpcyjne dla danego barwnika wykonano na tych samych próbkach.

Na rysunku 46 widoczne są charakterystyczne widma CD agregatów chiralnych. Piki pochodzące od chromoforów amidowych w dalekim nadfiolecie (przejścia π - π^* i n - π) są położone

przy ok. 215 nm i mają kształt zbliżony do typowych widm dla β -kartki, lecz są niezwykle intensywne w porównaniu ze zwyczajowymi sygnałami uzyskiwanymi dla amyloidów. Dodatkowo widmo próbek +ICD ma znak dodatni, co jest zaskakującą właściwością chiralnych superstruktur – pasmo 216 nm w dichroizmie kołowym typowych β -kartkowych struktur białkowych cechuje się znakiem



Rys. 46 Widma dichroizmu kołowego oraz absorpcyjne próbek +ICD i -ICD wybarwionych tioflawiną T (A, B) oraz czerwiecią Kongo (C, D) w zakresie nadfioletu oraz światła widzialnego. Absorbpcję i CD amyloidów wybarwionych tioflawiną T zmierzono przy stężeniu białka 0,036 wt. % (rozcieńczenie buforem o pH 2, 0,1 M NaCl) z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 34 μ M w zakresie 240-700 nm, a następnie w zakresie 200-240 nm po czterokrotnym rozcieńczeniu tym samym buforem. W przypadku czerwieni Kongo odwirowano 100 μ l próbki amyloidu i przemyto dwukrotnie 100 μ l buforu fosforanowego (pH=7,4, 0,1 M Na_2HPO_4 , 0,1 M NaCl), następnie amyloid zawieszono w 100 μ l buforu. Widma zmierzono przy stężeniu białka 0,036 wt. % po rozcieńczeniu buforem fosforanowym z dodatkiem czerwieni Kongo w stężeniu 15 μ M. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

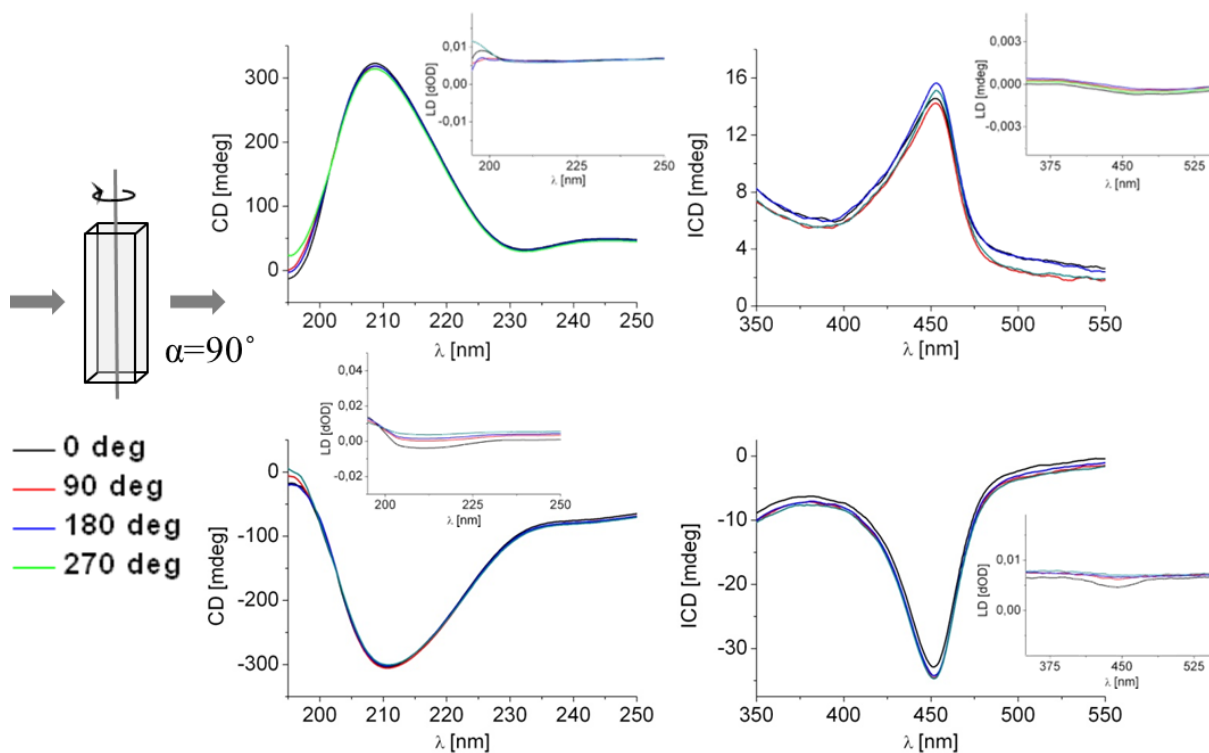
ujemnym ze względu na lewoskrętność aminokwasów. Obecność rozcieńczonej ThT w próbce nie ma wpływu na widma amyloidów w dalekim nadfiolecie. W zakresie widzialnym sygnały pochodzące od barwników, którymi oznakowano amyloid, mają znak dodatni i ujemny odpowiednio dla próbek +ICD i -ICD, położone są nieco powyżej 450 nm dla tioflawiny T oraz przy ok. 555 nm dla czerwieni Kongo. Uzyskane widma dla próbek +ICD oraz -ICD nie są idealnymi odbiciami lustrzanymi. Jest to konsekwencją lewoskrętności aminokwasów budujących zarówno superstruktury typu +ICD jak i -ICD, która ma wpływ także na wyższe poziomy organizacji struktur białkowych. Różnice w położeniach pików dodatnich i ujemnych są widoczne zarówno w dalekim nadfiolecie (sygnał pochodzący od

białka) jak i w zakresie widzialnym (sygnał pochodzący od barwnika), a więc pewne różnice w budowie struktury amyloidowej przenoszą się na geometrię tioflawiny T i czerwieni Kongo z nią związanych. Co istotne, widma ICD barwników mają znacząco inne kształty i położenie od widm absorpcyjnych im odpowiadających (Rys. 46 B, D). W przypadku tioflawiny T piki ICD są położone przy 454 i 452 nm, natomiast absorpcyjne przy 413 nm. Z kolei dla czerwieni Kongo w dichroizmie kołowym widoczny jest pojedynczy pik przy 558/553 nm, natomiast w widmie absorpcyjnym widoczne są dwa nakładające się pasma przy 515 i 544 nm. Podobnie sytuacja przedstawia się w przypadku widm absorpcyjnych i CD struktur chiralnych – w tym przypadku ekstrema sygnałów także są położone przy różnych długościach fali. Jest to pożądane, gdyż ze względu na różne reguły wyboru identyczność położenia i szerokości połówkowych widm absorpcyjnych i CD jest zwykle przesłanką występowania artefaktów optycznych wynikających z anizotropii optycznej, jako że nie można wyeliminować wkładów dichroizmu liniowego i dwójłomności z mierzonych widm [Shindo, 1990]. Warto zauważyć, że widma dichroizmu kołowego tioflawiny T zachowują stały znak w całym zakresie długości fal absorpcji barwnika, natomiast dla czerwieni Kongo obserwuje się także piki o znaku przeciwnym (przy ok. 475 nm). Pamiętając o podwójnym maksimum absorpcyjnym dla czerwieni Kongo można sądzić, że mamy tu do czynienia ze sprzężeniem ekscytonowym. Tak więc wzajemne oddziaływania dipolowych momentów przejścia cząsteczek barwnika interkalującego w superstrukturach amyloidowych są nieco inne w przypadku tioflawiny T oraz czerwieni Kongo.

4.2.2 Badania izotropowości optycznej superstruktur amyloidowych insuliny

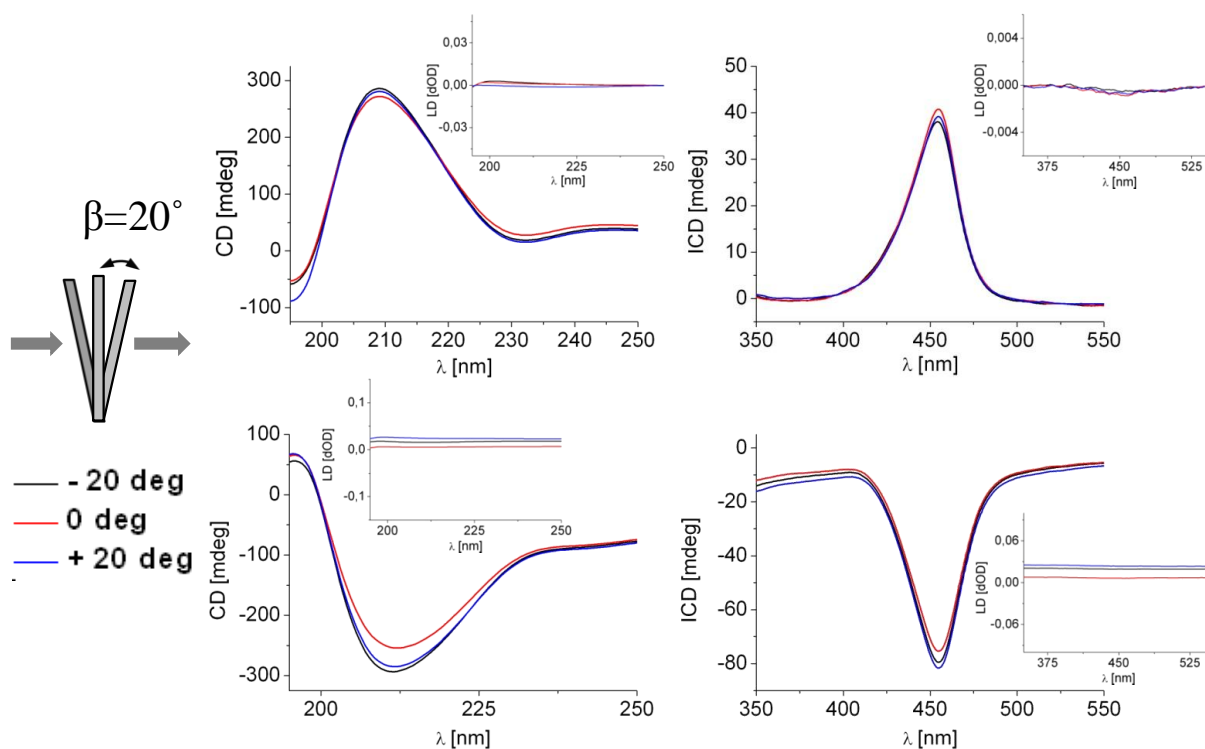
Typowa aparatura do pomiarów dichroizmu kołowego pozwala rejestrować widma jedynie w izotropowych ośrodkach. Widmo takie nie powinno zależeć od obrotów próbki względem osi drogi optycznej spektropolarymetru, ani osi do niej prostopadłych. Obecność makromolekuł i ich skupisk, które łatwo mogą prowadzić do anizotropii w skali makro jest przesłanką do przeprowadzenia weryfikacji otrzymywanych wyników. W niżej opisanych badaniach weryfikowano istotność wkładów dichroizmu liniowego i dwójłomności związanych z możliwą lokalną anizotropią próbki do rejestrowanych sygnałów CD i ICD.

Przygotowano agregaty +ICD oraz –ICD w warunkach wywołujących chiralną bifurkację (1 % insulina wołowa w 0,1 M NaCl, pD 1,9, 48-godzinne wytrząsanie przy 1400 rpm w temp. 40°C) oraz próbkę ZERO (1 % insulina wołowa w 0,1 M NaCl, pD 1,9, 48-godzinna inkubacja w temp. 65°C bez wytrząsania). Dla próbek o znaku „+” oraz „-” wykonano pomiary CD i ThT-ICD oraz odpowiadające im pomiary LD w roztworze obracając kuwety pomiarowe wokół trzech osi.

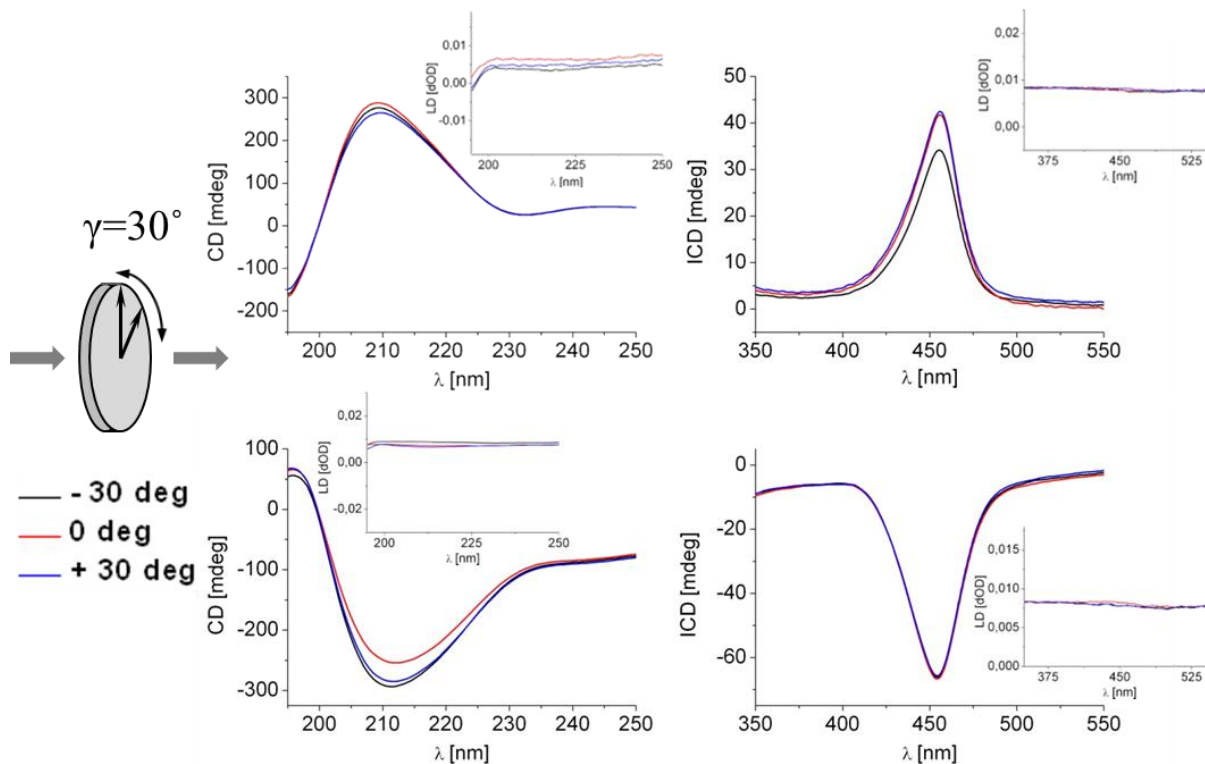


Rys. 47 Zmiana widm CD oraz LD (panele wewnętrzne) roztworów zawierających próbki agregatów +ICD oraz -ICD pod wpływem rotacji kuwety 1 cm wokół osi pionowej prostopadłej do ścieżki optycznej. Stężenie białka wynosiło 0,003 wt. %, natomiast stężenie tioflawiny T – 26,7 μ M. Próbki rozcieńczano buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl.

Na rysunku 47 przedstawiony jest wpływ obracania kuwety wokół osi pionowej prostopadłej do ścieżki optycznej na obserwowane efekty spektroskopowe. Zarówno w dalekim nadfiolecie, gdzie rejestruje się sygnał białkowy, jak i po wybarwieniu amyloidu tioflawiną T widoczne są typowe dodatnie i ujemne piki odpowiednio dla próbki +ICD oraz -ICD niezależnie od kąta obrotu kuwety. Obserwowane różnice intensywności są nieznaczne w porównaniu z całkowitą intensywnością sygnału i nie wpływają na znak CD sygnału białkowego bądź ICD tioflawiny T. Małe wewnętrzne panele na rysunku 47 przedstawiają widma dichroizmu liniowego odpowiadające takim samym ustawieniom kuwety. Sygnał LD próbek +ICD i -ICD (zarówno białkowy jak i pochodzący od związanej z amyloidem tioflawiny T) nie jest intensywny i nie ma wyraźnego znaku skorelowanego z fenotypem +ICD/-ICD.



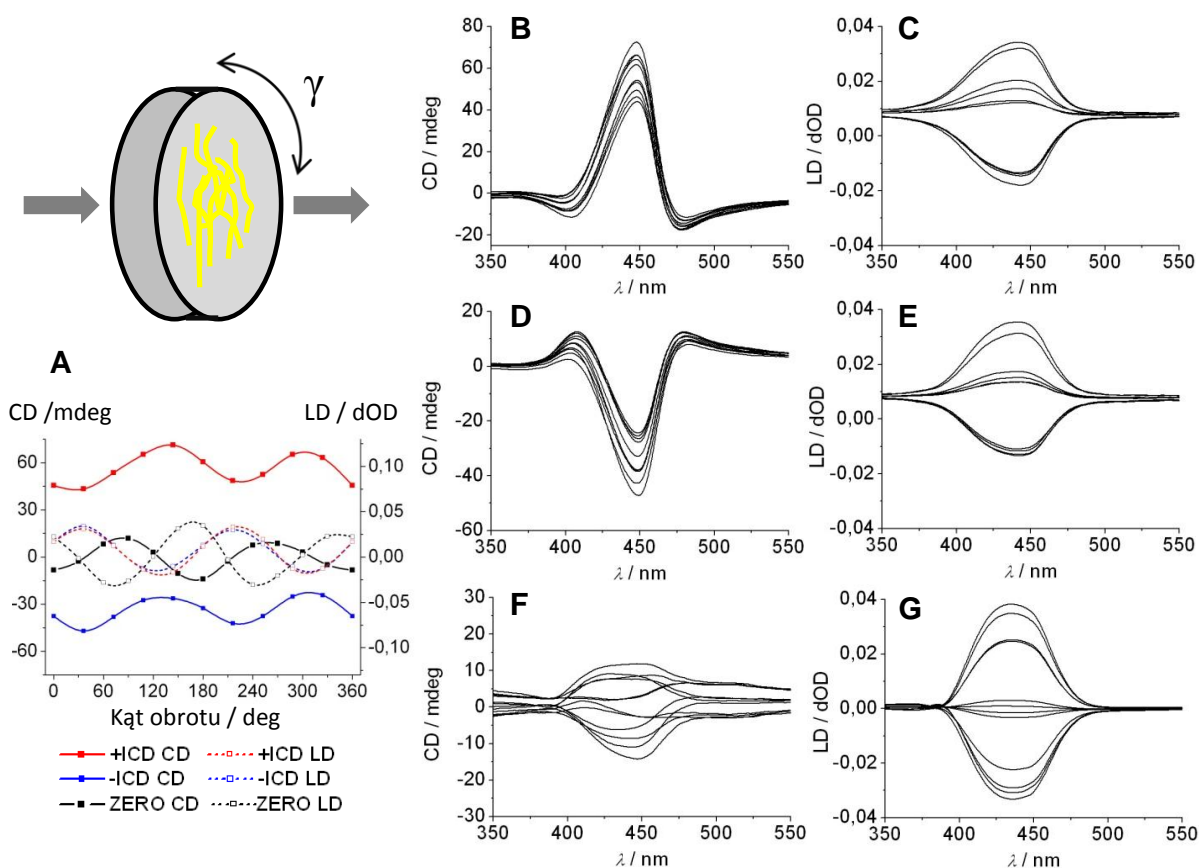
Rys. 48 Zmiana widm CD oraz LD (panele wewnętrzne) roztworów zawierających próbki agregatów +ICD oraz -ICD pod wpływem rotacji kjuwety 1 mm wokół osi poziomej prostopadłej do ścieżki optycznej. Stężenie białka wynosiło 0,037 wt. % oraz a tioflawiny T 0,35 mM. Próbkki rozcieńczano buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl.



Rys. 49 Zmiana widm CD oraz LD (panele wewnętrzne) roztworów zawierających próbki agregatów +ICD oraz -ICD pod wpływem rotacji kjuwety 1 mm wokół osi poziomej równoległej do ścieżki optycznej. Stężenie białka wynosiło 0,037 wt. % oraz a tioflawiny T 0,35 mM. Próbkki rozcieńczano buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl.

W przypadku obrotu kuwety wokół osi poziomej prostopadłej do ścieżki optycznej (Rys. 48) oraz osi równoległej do ścieżki optycznej (Rys. 49) sytuacja wygląda podobnie. Jako że we wszystkich tych przypadkach intensywności sygnału dichroizmu kołowego amyloidów +ICD i -ICD oraz barwnika z nimi związanego praktycznie nie zmieniają się pod wpływem obrotów kuwety a intensywność LD nie ma wyraźnego znaku zgodnego ze znakiem CD w dalekim nadfiolecie/ICD, można stwierdzić że efekty chiralooptyczne obserwowane w roztworze nie są obarczone istotnymi artefaktami związanymi z anizotropią próbki [Shindo, 1990; Kuroda, 2001].

W następnej kolejności przeanalizowano anizotropowość chiralnych agregatów po uprzednim nadaniu orientacji żelowi amyloidowemu. Próbki +ICD i -ICD porównano z próbką ZERO, niezawierającą chiralnych superstruktur.



Rys. 50 Wpływ rotacji wokół osi poziomej równoległej do ścieżki optycznej filmu amyloidowego próbek +ICD (B, C), -ICD (D, E) oraz ZERO (F, G) umieszczonych na CaF₂ i zabarwionych tioflawiną T na widma CD oraz LD oraz zmiana intensywności sygnału przy 450 nm (A). Próbki +ICD, -ICD oraz ZERO wymieszano z roztworem tioflawiny T w stosunku równomolowym (uwzględniając stężenie białka natywnego), po czym odwirowano przy 13600 rpm. Tak uzyskany żel rozsmarowano kierunkowo na szkiełku CaF₂. Po wysuszeniu wykonano serie pomiarów ICD i LD obracając szkiełko z krokiem 30° dla +ICD i -ICD oraz 36° dla ZERO.

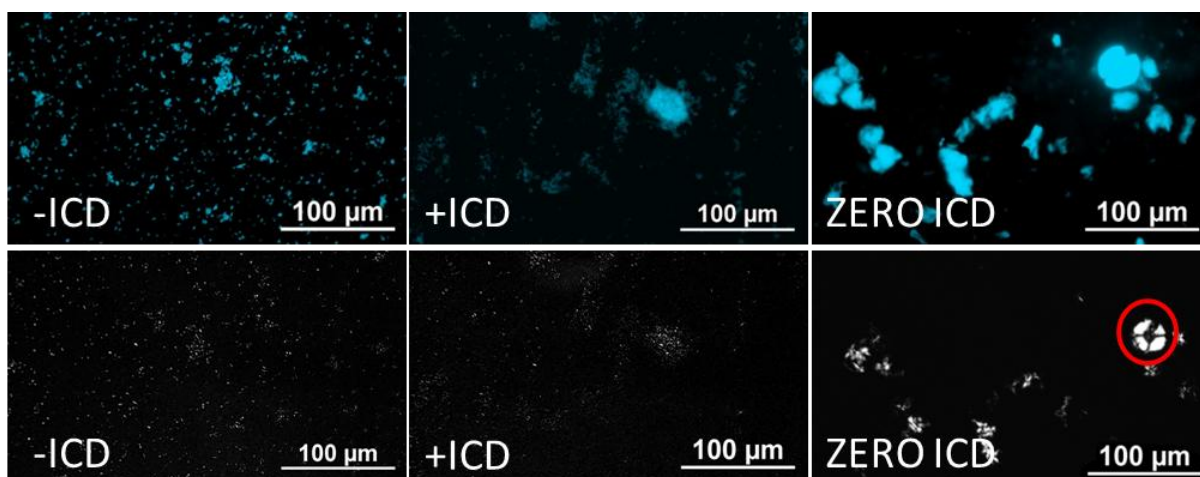
W przypadku filmów utworzonych kierunkowo na powierzchni fluorku wapnia agregaty są trwale zorientowane, a więc anizotropia optyczna i niezerowa intensywność sygnału LD są niejako wymuszone. W tym przypadku występują pewne zmiany intensywności sygnału ICD (Rys. 50 B, D)

wraz z obrotem szkiełka, jednak znak efektu Cottona niezależnie od kąta obrotu pozostaje ten sam. Dla porównania, w przypadku próbek ZERO znaki sygnałów ICD oraz LD są ze sobą skorelowane (Rys. 50 F, G). Można więc stwierdzić, że niezależnie od udziału dichroizmu liniowego rzeczywisty efekt Cottona dla próbek +ICD oraz -ICD stanowi podstawowy wkład w intensywność mierzonego sygnału dichroizmu kołowego.

Wykonane eksperymenty dowodzą, że w pomiarach dichroizmu kołowego amyloidów +ICD i -ICD oraz odpowiadających im widm indukowanego dichroizmu tioflawiny T roztworów udział dichroizmu liniowego jest nieznaczny i nawet zorientowanie próbki nie zmienia znaku obserwowanych widm.

4.2.3 Obrazowanie chiralnych superstruktur w świetle spolaryzowanym

Celem eksperymentu było sprawdzenie jak silną dwojłomność wykazują chiralne agregaty. Przygotowano próbki +ICD oraz -ICD w warunkach wywołujących chiralną bifurkację (1% insulina wołowa w 0,1 M NaCl, pD 1,9, 48-godzinne wytrząsanie przy 1400 rpm w temp. 40°C) oraz próbkę ZERO (1% insulina wołowa w 0,1 M NaCl, pD 1,9, 48-godzinna inkubacja w temp. 65°C). Wykonano obrazy próbek -ICD, +ICD oraz ZERO ICD zabarwionych tioflawiną T w dwóch trybach. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego uwidaczniają emisję ThT związanej z amyloidem, a zdjęcia w świetle spolaryzowanym przy polaryzatorze i analizatorze ustawionymi pod kątem prostym ukazują obiekty dwojłomne.



Rys. 51 Obrazy mikroskopowe tych samych fragmentów powierzchni w trybie fluorescencyjnym (górny pasek) oraz w świetle przechodzącym przy skrzyżowanych nikolach (dolny pasek) agregatów białkowych typu -ICD, +ICD oraz ZERO ICD. Na czerwono zaznaczono mikroskopowy obraz sferulitu.

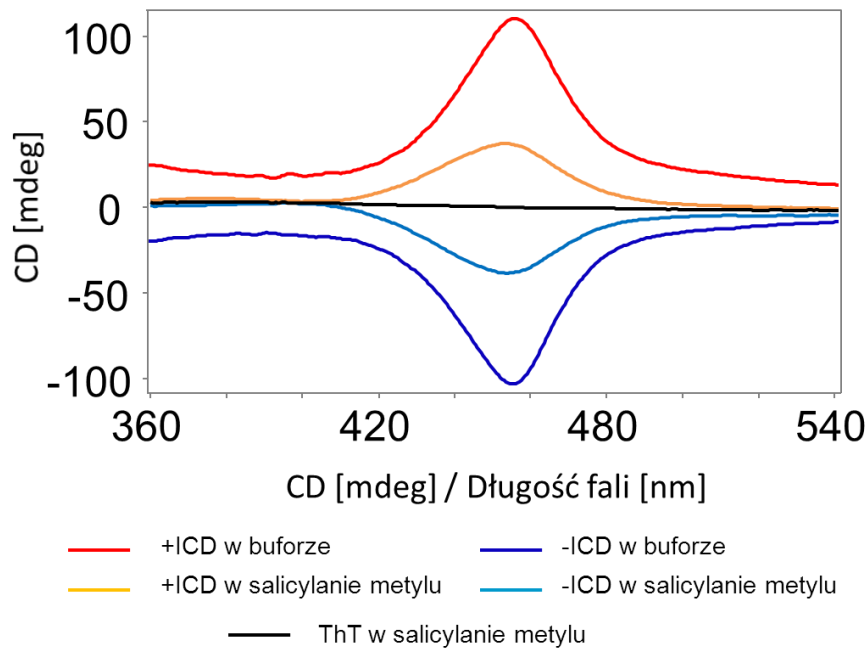
Mikroskopia fluorescencyjna uwidacznia położenie agregatów białkowych na szkiełku (Rys. 51, górny pasek). Widoczne są dość zwarte skupiska fibryli dla próbek -ICD oraz +ICD. Z kolei w przypadku próbki ZERO ICD widoczne są duże kuliste obiekty – są to częściowo rozbite sferulity. W przypadku sferulitów dwojłomność jest bardzo dobrze widoczna – m. in. zaznaczono na czerwono

intensywny jasny obraz krzyża maltańskiego [Krebs, 2005a]. W próbkach chiralnych agregatów takie domeny nie są obserwowane – do okulara dociera bardzo niewielka ilość światła. Nawet większe skupiska amyloidu, takie jak widoczne na obrazie fluorescencyjnym próbki +ICD, nie wykazują wyraźnej dwójłomności. W zgodzie z wcześniejszymi pomiarami dichroizmu kołowego i liniowego wyniki te wskazują na brak silnej anizotropii optycznej agregatów.

4.2.4 Badanie możliwej roli różnicowego rozpraszania światła w genezie sygnału ICD superstruktur amyloidu insuliny

Badania te miały na celu określenie wpływu załamania i rozproszenia światła na obserwowane efekty chiralnooptyczne dla chiralnych agregatów [Bustamante, 1983]. Problem ten był adresowany w znacznie wcześniejszych pracach i dotyczył pomiarów dichroizmu kołowego dużych biologicznych układów [Litman, 1972]. Współczynnik załamania światła amyloidu wynosi ok. 1,5 [Appel, 2005], natomiast wody – 1,33. Chcąc uniknąć zjawisk optycznych zachodzących na granicy dwóch ośrodków wykonano pomiary dichroizmu kołowego dla próbek typu +ICD oraz –ICD w rozpuszczalnikach o współczynnikach załamania zbliżonych do amyloidu. Idealnym kandydatem do tych badań był salicylanu metylu ($n=1,54$), jednak ze względu na jego silną absorpcję w zakresie dalekiego nadfioletu wykonano także pomiary w glicerolu ($n=1,47$). Przygotowano agregaty +ICD oraz –ICD w warunkach wywołujących chiralną bifurkację (1% insulina wołowa w 0,1 M NaCl, pD 1,9, 48-godzinne wytrząsanie przy 1400 rpm w temp. 40°C). Do pomiarów w salicylanie metylu próbki chiralnych agregatów zliofilizowano. Pomiary wykonano po 2 tygodniach od sporządzenia roztworów ze względu na początkowe wypadanie zabarwionych agregatów z roztworów w postaci dużych płatków. Dla porównania wykonano także widma chiralnych agregatów zmierzone w typowych warunkach.

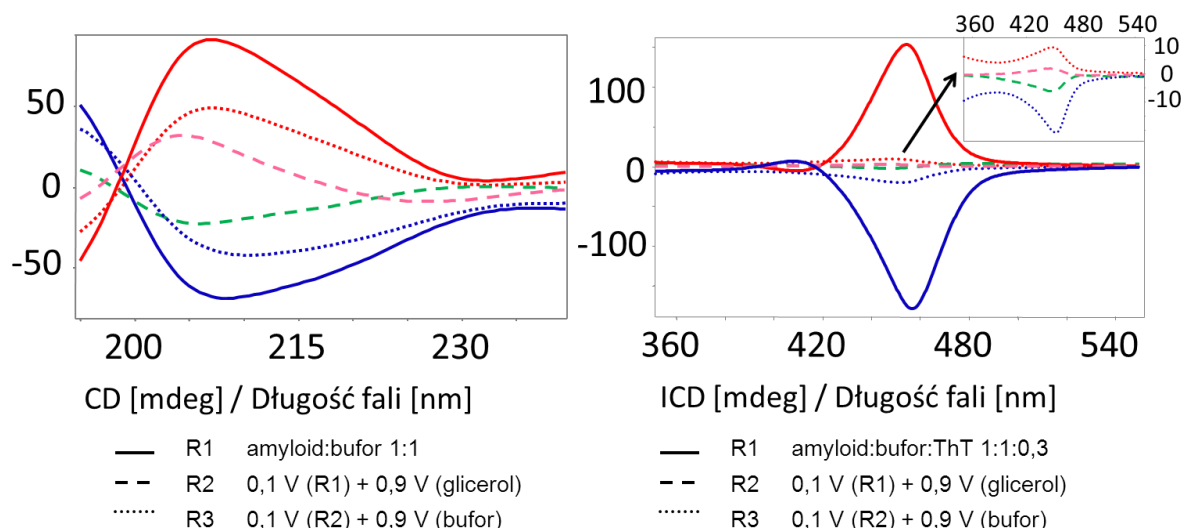
Znak oraz kształt widm dichroizmu kołowego próbek +ICD i –ICD w salicylanie metylu pozostają zachowane (Rys. 52). Sygnał ma mniejszą intensywność, choć nadal widoczne jest wzmocnienie typowe dla chiralnych superstruktur. Zmniejszenie się wysokości pików może mieć źródło w zmianie stałych wiązania ThT – białko: aromatyczne molekuly rozpuszczalnika najprawdopodobniej silnie solwują molekuly ThT poprzez oddziaływania π - π , usuwając w efekcie tioflawinę T z powierzchni amyloidu i prowadząc do osłabienia sygnału ICD. Także brak chlorków w roztworze salicylanu metylu może wpływać na stabilność chiralnych agregatów i wynikającą z tego intensywność sygnału ICD, jak również inna może być rozpuszczalność tioflawiny T. Sprawdzono dodatkowo czy salicylan metylu oddziałuje z czystą tioflawiną T indukując efekty chiralnooptyczne (możliwe chiralne kontaminacje rozpuszczalnika). Widmo to jest zupełnie płaskie, a więc potencjalny kompleks ThT-salicylan metylu nie ma wpływu na pomiary w obecności amyloidu.



Rys. 52 Widma ICD-ThT dla chiralnych agregatów w roztworze wodnym oraz w salicylanie metylu oraz kontrolne widmo tioflawiny T w salicylanie metylu. Pomiary wykonano przy stężeniu białka 0,0075 wt. % oraz 70 μM ThT w kuwecie kwarcowej o grubości 1 cm, próbki rozcieńczano salicylanem metylu bądź buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl. Widmo samej tioflawiny T w salicylanie metylu zmierzono przy stężeniu barwnika 70 μM .

Wykonano także pomiary z wykorzystaniem glicerolu dla trzech typów roztworów mierząc sygnał pochodzący od białka bądź od tioflawiny T. Widma zostały zmierzone w roztworze wodnym, następnie po przeniesieniu próbki do glicerolu, a na koniec z powrotem po rozcieńczeniu wodą. Taki schemat eksperymentu wybrano ze względu na dużą lepkość glicerolu i związaną z tym możliwą trudność dotarcia cząsteczek tioflawiny T do włókien w przypadku odwirowanego amyloidu przeniesionego do glicerolu.

W przypadku glicerolu absorbancja tego rozpuszczalnika pozwala na pomiary zarówno sygnału białkowego w dalekim nadfiolecie jak i ICD tioflawiny T oddziałującej z amyloidem (Rys. 53). Intensywność pików ICD zmniejsza się znacznie, a CD nieco mniej po przeniesieniu chiralnych superstruktur do glicerolu. Może to być po części związane z brakiem jonów Cl^- w roztworze lub potencjalnym kompetycyjnym w stosunku do tioflawiny T oddziaływaniem glicerolu z amyloidem. Następuje także przesunięcie położenia minimum/maksimum pików pochodzących od struktury β -karkowej w dalekim nadfiolecie w kierunku krótszych fal. W przypadku glicerolu dodatkową zmienną jest także rozpuszczalność tioflawiny T w tym rozpuszczalniku. Intensywność pików CD po części na powrót się zwiększa po ponownym wprowadzeniu buforu zawierającego 0,1 M NaCl w H_2O oraz położenie ekstremów w dalekim nadfiolecie powraca na pierwotną pozycję, natomiast intensywność ICD zwiększa się nieznacznie. Eksperyment ten wskazuje, że nie można całkowicie wykluczyć wpływu



Rys. 53 Sygnały CD w dalekim nadfiolecie i ICD tioflawiny T dla chiralnych agregatów w roztworze wodnym oraz w glicerolu. Pomiary wykonano dla pierwotnych rozcieńczonych próbek amyloidu (linia ciągła), roztworów o 90% stężeniu glicerolu (linia przerywana) oraz po ponownym wprowadzeniu środowiska wodnego (linia kropkowana). Zakres dalekiego nadfioletu: R1 – amyloid o stęż. 1 wt. % i bufor o pH 1,9, 0,1 M NaCl wymieszane w stosunku objętościowym 1:1, pomiar w kuwecie 0,01 mm. R2 – roztwór R1 wymieszany w stosunku 1:9 z glicerolem, pomiar w kuwecie 0,1 mm. R3 – roztwór R2 wymieszany w stosunku 1:9 z buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl, pomiar w kuwecie 1 mm. Pomiar w zakresie ICD-ThT: R1 – amyloid o stęż. 1 wt. % i bufor o pH 1,9, 0,1 M NaCl oraz tioflawina T o stęż. 0,3 % wymieszane w stosunku objętościowym 1:1:0,3, pomiar w kuwecie 0,1 mm. R2 – roztwór R1 wymieszany w stosunku 1:9 z glicerolem, pomiar w kuwecie 1 mm. R3 – roztwór R2 wymieszany w stosunku 1:9 z buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl, pomiar w kuwecie 10 mm. Zastosowanie coraz grubszych kuwet kompensuje rozcieńczanie próbki.

rozpraszania na intensywność obserwowanych sygnałów chiralnoptycznych, jednak znak efektu Cottona dla superstruktur chiralnych pozostaje niezmienny. Dodatkowo należy pamiętać, że zmiany intensywności pików mogą być związane nie tylko ze zmianą współczynnika rozpraszania roztworu, ale także z innymi zjawiskami fizykochemicznymi, m. in. zmianą przenikalności dielektrycznej próbki.

Celem powyższych badań było potwierdzenie autentyczności właściwości chiralnoptycznych badanych agregatów. Przeanalizowano kilka efektów optycznych, mogących wpływać na rejestrowany sygnał dichroizmu kołowego dla chiralnych superstruktur. Pomiary absorpcji barwników wiążących się z chiralnymi superstrukturami wskazują, że położenie pików absorpcyjnych i indukowanego dichroizmu kołowego jest różne. Określono, że orientacja kuwety nie wpływa nie tylko na sygnały CD i ICD w przypadku roztworów, ale także zmiana orientacji suchego filmu amyloidowego nie powoduje przełączenia znaku efektu Cottona w obserwowanych widmach. Pozwala to na zaniebanie wpływu dichroizmu liniowego. Z kolei wygląd chiralnych agregatów obserwowanych mikroskopowo w świetle spolaryzowanym przy prostopadle umieszczonych polaryzatorze i analizatorze sugeruje, iż dwójłomność próbek jest niewielka i znacznie mniejsza niż w przypadku

uporządkowanych obiektów fibrylarnych – sferulitów. Kolejnym czynnikiem mogącym wywoływać artefakty pomiarowe było rozpraszanie światła na nierozpuszczalnych agregatach białkowych (mleczna barwa próbek amyloidu). Wpływ tego efektu wyeliminowano poprzez zastosowanie roztworów o współczynnikach załamania światła zbliżonych do wartości dla amyloidu. Wykazano, że także w takich warunkach znak sygnałów CD w dalekim nadfiolecie oraz ICD tioflawiny T się nie zmieniają, co potwierdza autentyczność obserwowanych efektów chiralnoptycznych dla agregatów. Dodatkowo, w ramach współpracy z grupą prof. Reiko Kurody, zostały wykonane pomiary na spektrofotometrze UCS-1, pozwalającym na rejestrację bezartefaktowych widm dichroizmu kołowego oraz niezależnych sygnałów dichroizmu liniowego oraz liniowej i kołowej dwójłomności w oparciu o analizę macierzową według formalizmu Muellera-Stokesa [Babenko, 2011]. W tym przypadku także uzyskano sygnały dichroizmu kołowego o kształtach typowych dla agregatów typu +ICD oraz -ICD. Inne efekty optyczne miały różną intensywność i zależały od rozpraszania poszczególnych próbek i ich właściwości sedymentacyjnych, nie miały jednak decydującego wpływu na rejestrowany dichroizm kołowy. Ostatecznie można stwierdzić, że nietypowe widma obserwowane dla chiralnych agregatów w zakresie dalekiego nadfioletu oraz dla tioflawiny T z nimi związanej są pochodną rzeczywistej chiralności tych próbek.

4.3 Wpływ warunków fizykochemicznych na agregację insuliny i asocjację w chiralne superstruktury

Powstawanie chiralnych superstruktur amyloidu insuliny obserwowano tylko w określonych warunkach. Wykazano konieczność mieszania próbki w trakcie ich formowania się [Dzwolak, 2007] oraz spadek intensywności sygnału dichroizmu kołowego wraz z wymywaniem jonów chlorkowych [Loksztejn, 2008]. Szczegółowe badania wpływu czynników fizykochemicznych na przebieg agregacji ma na celu dokładne wyjaśnienia ich roli.

Proces agregacji białek jest modyfikowany przez obecność soli na różnych etapach. Jony w roztworze wpływają na stabilność białek natywnych, szybkość nukleacji oraz stabilność agregatów decydującą o ich morfologii. Oddziaływania te zależą od temperatury i ładunku białka w roztworze, który w przypadku badanej insuliny wołowej w pH ok. 2 jest dodatni.

Stabilność białek natywnych nawet pod nieobecność specyficznych oddziaływań jon-białko jest zależna od siły jonowej roztworu. Przy niskich stężeniach soli dominuje efekt „wsalania”, a więc zazwyczaj nieznaczne zwiększanie się rozpuszczalności białka w roztworze. Na drugiej stronie osi stężeń występuje efekt „wysalania”, czyli precypitacji białka. Wpływ poszczególnych kationów i anionów na rozpuszczalność i stabilność białek jest określony w tzw. szeregach Hofmeistera. Chlorek sodu jest najczęściej wybieraną solą w badaniach agregacji białek ze m. in. względu na brak silnych oddziaływań specyficznych Na^+ i Cl^- z większością białek. Wpływ siły jonowej na agregację białek jest

przewidziany teorią Debye'a-Huckle'a, która opisuje asocjację naładowanych cząsteczek. Wpływ siły jonowej przekłada się więc na szybkość nukleacji oraz tworzenia się większych skupisk fibryli. Efekt ten opiera się na ekranowaniu odpychających oddziaływań kulombowskich pomiędzy jednakowo naładowanymi molekułami białka a następnie włóknami. Jednakże w układach biologicznych na te procesy ma wpływ wiele innych czynników i proste teorie dotyczące oddziaływań elektrostatycznych nie są wystarczające. Dla przykładu wyższe stężenia przeciwjonów (od ok. 20 mM NaCl) mają nieliniowy wpływ na wydajność ekranowania ładunku w trakcie agregacji zasiewanej insuliny wołowej [Buell, 2013]. Z kolei bardzo wysokie stężenia anionów Cl⁻ mogą prowadzić do powstawania agregatów amorficznych, kiedy to amyloidogeneza konkuruje z wysalaniem białka [Yoshimura, 2012]. Dodatkowo w kontekście chiralnych superstruktur należy pamiętać o zależności morfologii fibryli od obecności jonów roztworze, przejawiającej się np. zmianą skrętności fibryli wraz ze wzrostem stężenia NaCl, tak jak w przypadku β-laktoglobuliny [Adamcik, 2011]. Trzeba podkreślić, że wpływ jonów na przebieg agregacji silnie zależy od stabilności, hydrofobowości i ładunku białka w danym roztworze.

Drugim czynnikiem mającym wpływ na efekt chiralnej agregacji białka są siły hydrodynamiczne. Powodują one podłużne sklejanie i splatanie powstających fibryli, a przypuszczalnie także umożliwiają lateralną agregację. Asocjacja cząstek w roztworze pod wpływem sił hydrodynamicznych jest obserwowana także w innych układach, takich jak koloidy [Osuji, 2008] bądź zawiesiny nanorurek [Ma A. W. K., 2007].

Dodatkowo agregacja białek i asocjacja w struktury wyższego rzędu może być zależna od pH oraz stężenia białka. Jak wspomniano wcześniej, nawet niewielkie różnice w pH roztworu mogą zmieniać stabilność protofibryli i wywoływać zmianę ich skrętności [Kurouki, 2012a], jako że ładunek białka zmienia się w zależności od pH. Z kolei agregacja białek w wyższym stężeniu cechuje się skróceniem fazy opóźnionej, gdyż prawdopodobieństwo utworzenia się zarodka agregacji jest wyższe [Fodera, 2008]. W niżej opisanych badaniach szereg czynników fizykochemicznych został przeanalizowany pod kątem wpływu na agregację insuliny i powstawanie chiralnych superstruktur.

4.3.1 Analiza wpływu stężenia NaCl na agregację insuliny

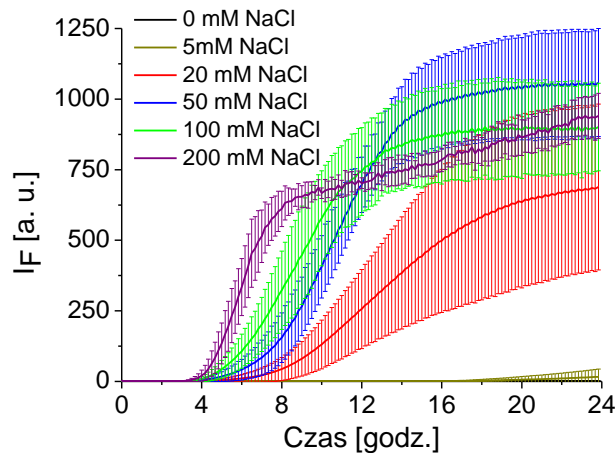
Obecność anionów w roztworach agregującego, dodatnio naładowanego białka jest jednym z kluczowych parametrów wpływających na przebieg tego procesu. W poniższych badaniach określono w jaki sposób NaCl, a w szczególności jony chlorkowe modyfikują agregację insuliny.

4.3.1.1 Kinetyczny pomiar wpływu NaCl na szybkość agregacji insuliny

Eksperyment ten miał na celu pokazanie, że jony o przeciwnym znaku ładunku niż białko przyspieszają agregację insuliny wołowej. Agregacja zbadano przy sześciu różnych stężeniach NaCl z zakresie 0-200 mM. Każda krzywa kinetyczna jest wyliczona na podstawie pomiaru w 6 dołkach

zawierających identyczne roztwory. Rozrzut (odchylenie standardowe) zaznaczono na wykresie (Rys. 54).

Pod nieobecność chlorków w ciągu 24 godzin agregacja nie jest obserwowana a niewielki dodatek soli (5 mM) nadal nie wpływa znacząco na ten proces. Dopiero przy stężeniu NaCl 20 mM (ok. 60-molowy nadmiar NaCl) nukleacja jest znacząco przyspieszona i po czasie 4-8 godzin obserwuje się wzmocnienie fluorescencji ThT wywołane powstaniem fibryli amyloidowych. Szybkość elongacji włókien amyloidowych wyraża się w nachyleniu krzywych kinetycznych. Ten proces także jest szybszy



Rys. 54 Kinetyka agregacji inuliny wołowej w 45°C w obecności różnych stężeń NaCl monitorowana poprzez pomiar fluorescencji tioflawiny T. Próbkę 0,2 wt. % insuliny wołowej w pD 1,9 z dodatkiem tioflawiny T do stężenia 20 μ M zawierały stężenia NaCl w zakresie 0-200 mM. Agregacja była monitorowana przez 24 godziny w temperaturze 45°C przy lekkim wytrząsaniu – 300 rpm.

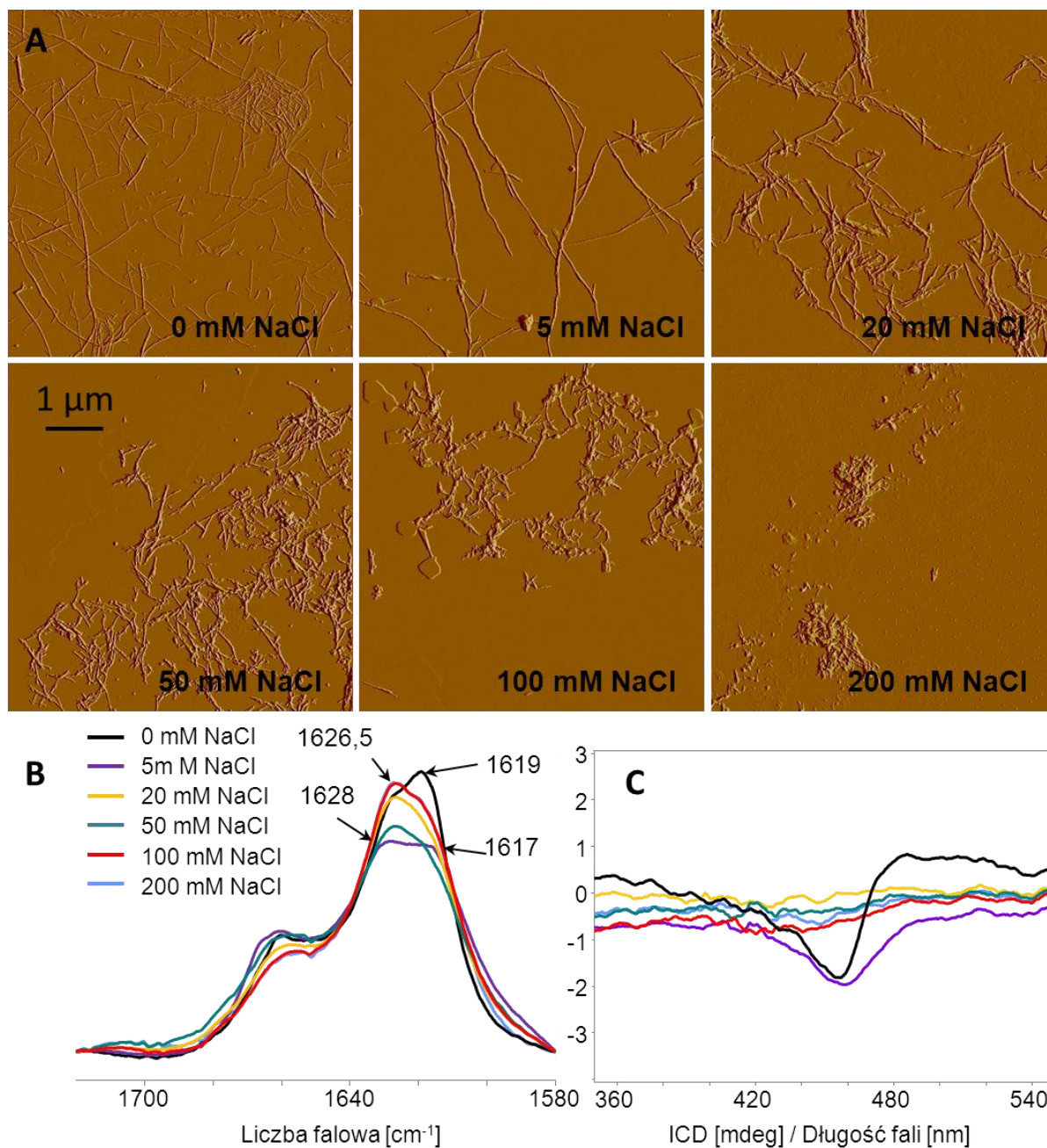
w obecności jonów Cl^- . Dla coraz wyższych stężeń chlorków nachylenie krzywych jest coraz większe. Rozrzut przebiegu krzywych kinetycznych jest największy w pośrednich stężeniach NaCl, przy 200 mM NaCl kinetyka agregacji w poszczególnych dołkach jest praktycznie jednakowa. Położenie *plateau* krzywych kinetycznych jest różne ze względu na niejednakową tendencję poszczególnych agregatów do opadania oraz przyklejania się do ścianek płytki pomiarowej a także potencjalnie różną wydajność fluorescencji poszczególnych wariantów amyloidu.

4.3.1.2 Agregacja insuliny wołowej przy różnych stężeniach NaCl pod nieobecność mieszania

Założeniem tych badań jest określenie wpływu stężenia NaCl na agregację insuliny i asocjację włókien przy braku wpływu czynników hydrodynamicznych. Przeprowadzono dwa typy eksperymentów: agregację insuliny wołowej *de novo* przy różnych stężeniach NaCl oraz inkubację już utworzonych pojedynczych włókien amyloidowych w obecności różnych stężeń NaCl.

Agregację insuliny wołowej w stężeniu 0,2 wt. % przeprowadzono w pD 1,9 w 60°C przy różnych stężeniach NaCl. Temperatura ta (przy braku mieszania) zapewniała skrócenia fazy

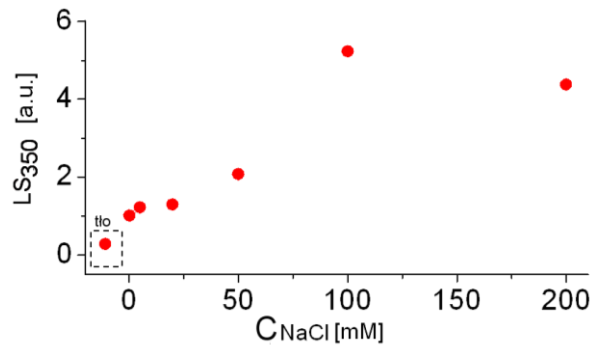
opóźnionej w trakcie której białko jest narażone na modyfikacje kowalencyjne. Inkubacja próbek trwała 4 dni.



Rys. 55 Amplitudowe obrazy AFM agregatów insuliny powstałych przy różnych stężeniach NaCl (A), widma FTIR tych próbek (B) oraz widma ICD po wybarwieniu tioflawiną T (C). Pomiary ICD wykonano przy stężeniu białka 0,00 wt. 7% po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 67 μM. Pomiary wykonano w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

Dane pomiarowe uzyskane dla serii amyloidów insuliny powstałych przy różnych stężeniach NaCl wyraźnie ukazują dwa typy agregatów (Rys. 55). Przy braku lub niewielkiej ilości chlorków powstają pojedyncze, długie fibryle. Indukują one słaby sygnał ICD tioflawiny T. Jest on najprawdopodobniej wywołany skręceniem cząsteczki ThT związanej z włóknem amyloidowym, tak

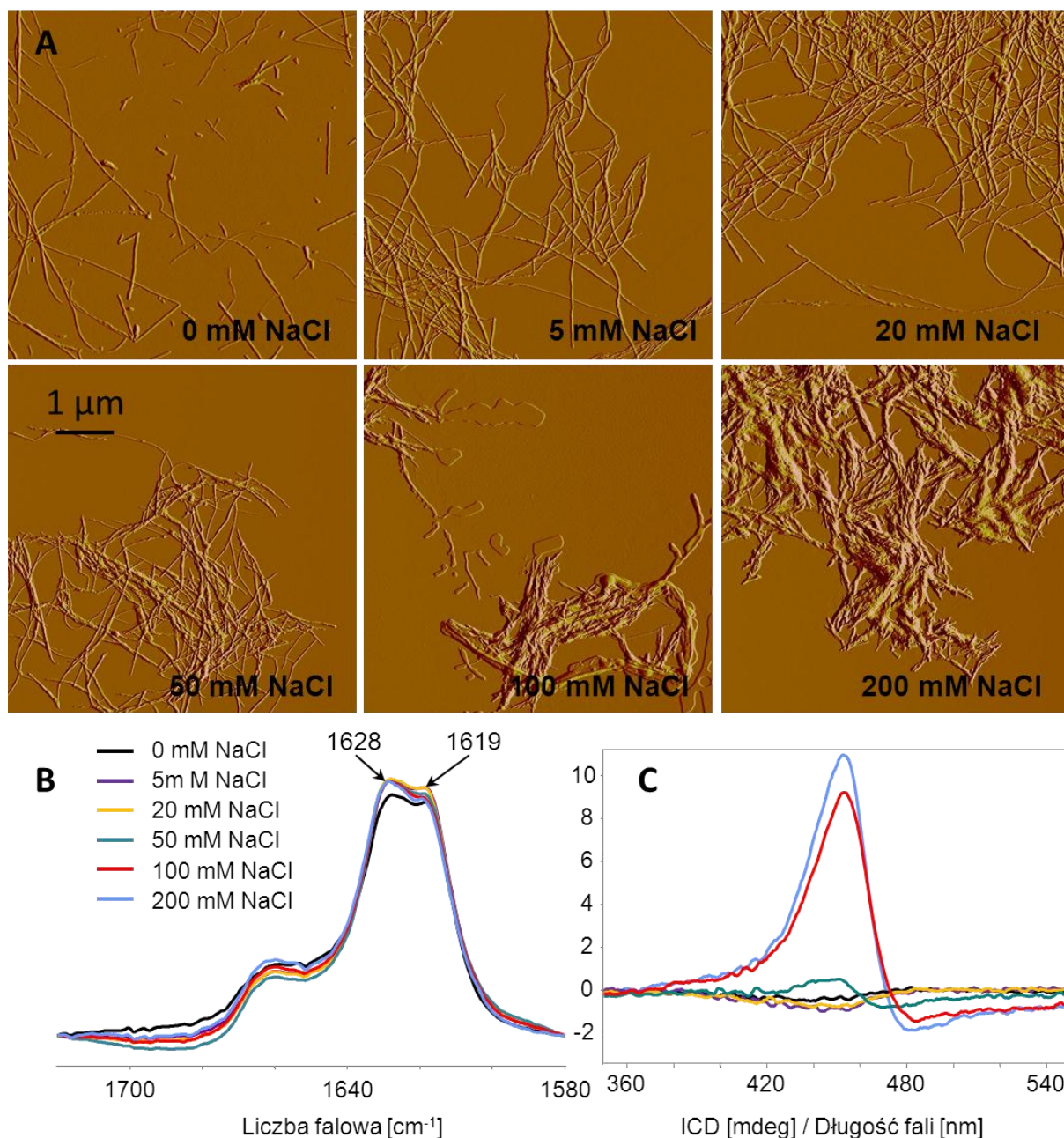
jak miało to miejsce w przypadku kwasu poliglutaminowego (Rozdz. 4.1). Przy większej sile jonowej roztworu można zauważyć, że włókna zaczynają się ze sobą sklejać. Jest to możliwe dzięki ekranowaniu przez Cl^- dodatnio naładowanej w warunkach eksperymentu insuliny. Proces ten można obserwować nie tylko na obrazach AFM, ale także badając rozpraszanie światła (Rys. 56). Dla większych skupisk fibryli rozpraszanie światła jest silniejsze. Taki wzrost jest widoczny wyraźnie dla stężeń NaCl 100 oraz 200 mM, co jest zgodne z obserwacjami przeprowadzonymi za pomocą AFM. Jak widać, na intensywność rozpraszania wpływ ma przede wszystkim stopień asocjacji włókien a nie ich długość. Dla badanych agregatów zmienia się widmo FT-IR – widoczny jest większy udział komponentów pasma amid I' przy większych liczbach falowych, co sugeruje zmniejszanie się siły wiązań wodorowych (Rys. 55 B). Zmiana w obrębie struktury równoległej β -kartki budującej fibryle jest skorelowana z zanikiem konformacyjnego sygnału ICD tioflawiny T związanej amyloidem powstałym przy wyższych stężeniach NaCl (Rys. 55 C). Włókna powstałe przy stężeniach NaCl



Rys. 56 Intensywność rozpraszania światła przy 350 nm przez próbki amyloidu powstałe w obecności coraz wyższych stężeń NaCl . Pomiary rozpraszania światła wykonano przy stężeniu białka 0,12 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl . Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 4 mm.

powyżej 20 mM są wyraźnie krótsze. Podobny efekt – zmniejszanie się długości fibryli oraz ich asocjacja był obserwowany także we wcześniejszych pracach ukazujących wpływ soli na agregację różnych białek, m. in. w przypadku insuliny [Nielsen, 2001a] i β_2 -mikroglobuliny [Yoshimura, 2012]. Tak więc dodatek soli powoduje przyspieszenie dwóch potencjalnie konkurencyjnych procesów rekrutujących monomery: nukleacji i elongacji. W przypadku wysokich stężeń NaCl wytwarzana jest duża ilość zarodków i w konsekwencji powstają krótkie fibryle. Jednocześnie ekranowanie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy włóknami umożliwiającą ich asocjację. Dodatkowo istnieją badania opisujące wpływ soli na zmianę natywnej molekuly insuliny, powodujące większą ruchliwość N- i C-końców łańcucha B i skutkujące ekspozycją hydrofobowego rdzenia białka a przez to sklejeniem się z hydrofobowymi fragmentami innych monomerów [Muzaffar, 2011]. Jest to istotne w kontekście „uwolnienia” fragmentu łańcucha odpowiadającego za tworzenie się dimerów i mogącego tworzyć kontakt hydrofobowy z analogicznymi fragmentami innych cząsteczek insuliny.

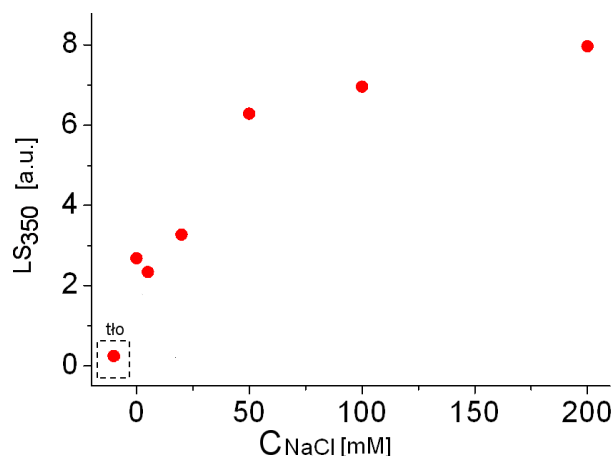
W drugim typie eksperymentów z wykorzystaniem NaCl analizowano asocjację dojrzałych fibryli. W tym celu przygotowano próbkę amyloidu zawierającego pojedyncze włókna (typ ZERO). W tym celu agregację insuliny wołowej przeprowadzono w stężeniu 0,2 wt. % w pD 1,9 w 60°C, przy czasie inkubacji 4 dni. Do próbki dodano zsonikowany amyloid w stosunku 1:100 aby natychmiast zainicjować agregację niezbędną do uzyskania rozdzielonych fibryli i uniknięcia modyfikacji kowalencyjnych białka związanych z długim czasem inkubacji. „Matkę” do zasiewania przygotowano



Rys. 57 Amplitudowe obrazy AFM agregatów insuliny powstałych bez udziału NaCl, a następnie poddanych działaniu różnych ilości soli (A), widma FTIR tych próbek (B) oraz widma ICD po wybarwieniu tioflawiną T (C). Pomiary ICD wykonano przy stężeniu białka 0,007 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 67 μM. Pomiary wykonano w kwekach kwarcowych o grubości 10 mm.

poprzez agregację insuliny wołowej w stężeniu 0,2 wt. % w 0,1 M NaCl, pD 1,9, w 60°C przez 4 dni. Utworzony w takich warunkach amyloid podzielono na 6 porcji, do których dodano różne ilości odważonego chlorku sodu. Próbkę wymieszano w celu rozpuszczenia NaCl a następnie pozostawiono na 4 dni w temperaturze pokojowej.

Pojedyncze włókna amyloidowe przygotowane do tego eksperymentu uległy sklejeniu po dodaniu NaCl – tym silniej, im większe było stężenie soli. Wyrażna asocjacja jest widoczna na obrazach AFM od stężenia 100 mM NaCl (Rys. 57 A). Wiąże się ona z bardzo ciekawym zjawiskiem – dla tioflawiny T związanej z tymi próbkami pojawiają się dichroizm kołowego o znaku „+”. Jest on wyraźny, choć nieco słabszy w porównaniu z typowymi agregatami typu +ICD. Można przypuszczać, że jest on pochodzenia superstrukturalnego ze względu na wyraźne sklejenie się fibryli pod wpływem NaCl, jednak nie da się wykluczyć prostego konformacyjnego pochodzenia sygnału. Widma FTIR ukazują, że struktura β -kartki budującej fibryle nie uległa zmianie – we wszystkich przypadkach widoczne jest pasmo amid I' z podwójnym maksimum przy 1619 i 1628 cm^{-1} , choć składowa przy niższych energiach obniża się nieco od stężenia 50 mM NaCl. Właściwości chiralooptyczne uzyskanych agregatów są więc najprawdopodobniej skutkiem określonego splecenia fibryli a nie zmiany ich wewnętrznej struktury. Dodatkowo można stwierdzić, że temperatura i brak lub obecność wytrząsania próbki nie są jednoznacznym determinantem określającym przebieg chiralnej asocjacji – fibryle wyjściowe wykorzystane w tym eksperymencie powstały w temperaturze 60°C faworyzującej tworzenie się struktur typu –ICD, a więc o znaku przeciwnym niż skupiska powstałe przy 100 i 200 mM stężeniu NaCl. Warto podkreślić, iż metoda ICD jest w stanie rozróżnić agregaty o jednakowej strukturze drugorzędowej i jedynie innej morfologii wywołanej niejednakowym stopniem splecenia fibryli.



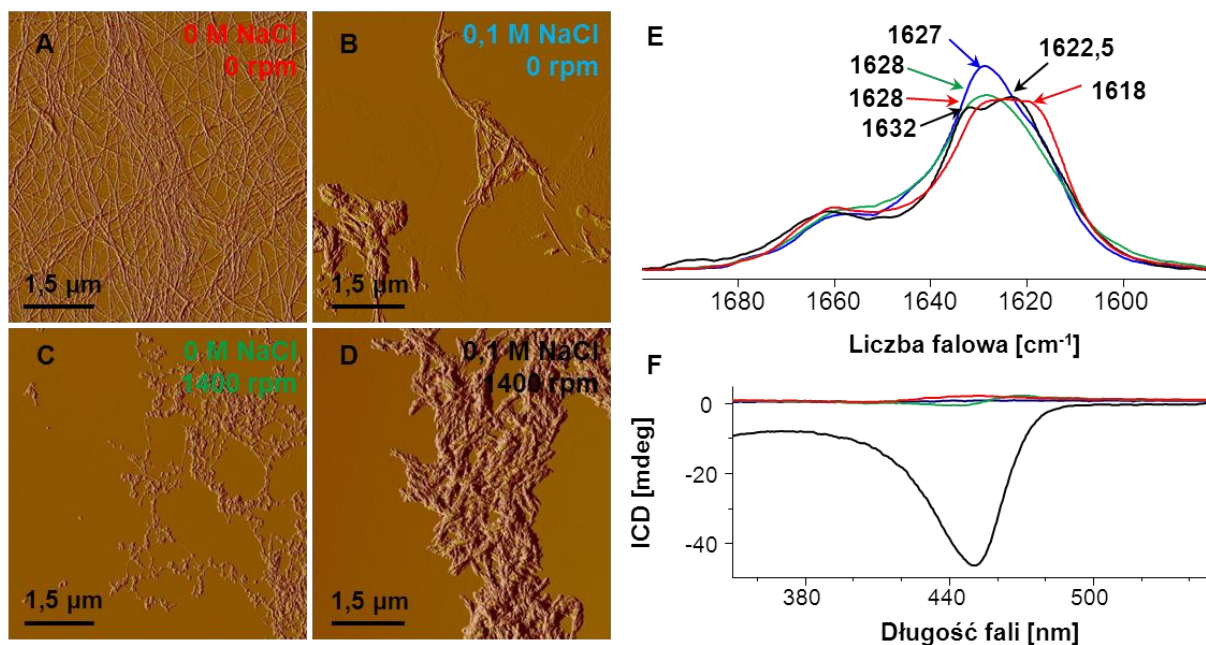
Rys. 58 Zmiana intensywności rozpraszania światła przez fibryle przy 350 nm oraz pod wpływem asocjacji fibryli przy coraz większych stężeniach NaCl. Pomiary rozpraszania światła wykonano przy stężeniu białka 0,12 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 4 mm.

Tworzenie się skupisk fibryli, podobnie jak w przypadku amyloidów powstających *de novo* w obecności soli (Rys. 56), przejawia się silniejszym rozpraszaniem światła przez próbkę (Rys. 58). Intensywność sygnału jest zbliżona dla pojedynczych fibryli i wzrasta wraz ze wzrostem stężenia NaCl. Oznacza to, iż asocjaty widoczne na obrazach AFM obecne są także w roztworze a nie powstają na powierzchni miki.

4.3.2 Rola mieszania i anionów chlorkowych w chiralnej ścieżce agregacji

Eksperyment ten pokazuje wpływ dwóch czynników: obecności NaCl i mieszania próbki na powstawanie chiralnych superstruktur amyloidowych. Przeanalizowano amyloidy insuliny wołowej w stężeniu 0,2 wt. % powstałe w ciągu 48 godzin w pD 1,9, 60°C (warunki wywołujące tworzenie się struktur typu β -ICD), przy czterech kombinacjach obecności/braku NaCl w stęż. 0,1 M i obecności/braku wytrząsania z prędkością 1400 rpm.

Niskie pD, w jakim prowadzona jest agregacja powoduje silne odpychanie się dodatnio naładowanych cząsteczek białka i w konsekwencji powstają pojedyncze fibryle (Rys. 59 A). Dodanie soli do agregującego białka pozwala na zbliżanie się fibryli do siebie, lecz utworzone włókna są krótkie i chaotycznie uporządkowane (Rys. 59 B). Z kolei wytrząsanie próbki nie zawierającej NaCl nie daje możliwości splecenia się fibryli i przyczynia się do ich łamania, co skutkuje mnogością bardzo



Rys. 59 Amplitudowe obrazy AFM (A), widma FTIR w zakresie pasma amid I' (B) oraz widma ICD po wybarwieniu próbek tioflawiną T. Agregaty powstały przy braku mieszania oraz soli (czerwony), przy braku mieszania oraz w 0,1 M roztworze NaCl (niebieski), z mieszaniem 1400 rpm oraz bez soli (zielony) oraz z mieszaniem 1400 rpm i przy 0,1 M NaCl (czarny). Pomiary ICD wykonano przy stężeniu białka 0,007 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 67 μM. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

krótkich włókien (Rys. 59 C). Dopiero obecność obu czynników – intensywnego mieszania i soli – pozwala na utworzenie się uporządkowanych splecionych struktur wywołujących niezerowe efekty ICD (Rys. 59 D, F). W ich przypadku charakterystyczna jest zwarta morfologia amyloidu w miejsce pojedynczych włókien bądź drobnych skupisk. Poszczególne typy agregatów cechują się różnymi położeniem pasma amid I' (Rys. 59 E), co oznacza nie tylko różną morfologię fibryli, ale także inną budowę β -kartki. Jest ona najbardziej rozseparowana w przypadku długich pojedynczych fibryli, co objawia się położeniem pasma amid I' przy mniejszych liczbach falowych. Z kolei dla chiralnej superstruktury typu –ICD charakterystyczne jest podwójne maksimum we FT-IR z intensywniejszym komponentem przy ok. 1622 cm^{-1} .

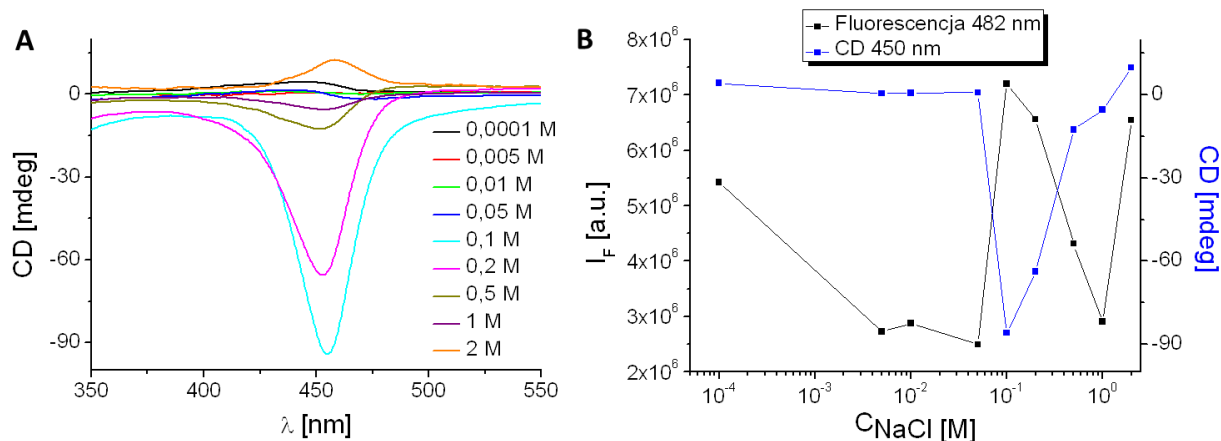
4.3.3. Analiza zmiana w przebiegu chiralnej agregacji pod wpływem różnego doboru parametrów fizykochemicznych

Powstawanie chiralnych agregatów z natywnej insuliny zaobserwowano tylko w określonych warunkach. W opisanych badaniach przeanalizowana została rola poszczególnych czynników fizykochemicznych w tworzeniu się chiralnych superstruktur oraz zmiany zachodzące pod wpływem różnego ich doboru odbiegającego od warunków typowych. Przeanalizowano zmiany charakterystycznych efektów chiralnooptycznych wykazywanych przez uzyskane amyloidy.

4.3.3.1 Przebieg chiralnej agregacji przy różnych stężeniach NaCl

Przeanalizowano amyloidy insuliny wołowej w stężeniu 0,2 wt. % powstałe w ciągu 48 godzin w pD 1,8, 60°C , przy wytrząsaniu z prędkością 1400 rpm (warunki wywołujące tworzenie się struktur typu –ICD) i przy 9 różnych stężeniach soli w zakresie 0,0001-2 M.

Dla całego zakresu stężeń NaCl powstały fibrylarne agregaty wywołujące wzmocnienie fluorescencji tioflawiny T (Rys. 60 B). Superstruktury amyloidowe charakteryzujące się silnymi właściwościami chiralnooptycznymi powstają tylko w określonym zakresie stężeń – jedynie próbki z 0,1 oraz 0,2 M stężeniem NaCl indukują wyraźny ujemny sygnał ICD (Rys. 60 A). Przy braku lub zbyt małej ilości soli, jak pokazano już wcześniej (Rys. 59 C), fibryle nie są stabilne. Przy intensywnym mieszaniu tak powstałe próbki nie wykazują superstrukturalnej chiralności. Z kolei zbyt wysoka siła jonowa powoduje zmianę stabilności rozpuszczalnych form białka w roztworze [Stigter, 1991], a więc wysalanie natywnego białka – już przy 0,5 M NaCl widoczne jest wypadanie białka z roztworu. *De facto* agregacja zachodzi więc przy niższym stężeniu białka niż 0,2 wt. %, gdyż agreguje jedynie białko, które jest w danym momencie w roztworze. Taki przebieg agregacji uniemożliwia powstanie odpowiedniego chiralnego splotu charakteryzującego się intensywnym ICD. Co ciekawe, występuje pozytywna korelacja pomiędzy intensywnością fluorescencji związanej z amyloidami tioflawiny T przy 482 nm a intensywnością sygnału ICD przy 450 nm – chiralne superstruktury charakteryzują się znacznie wyższą fluorescencją.

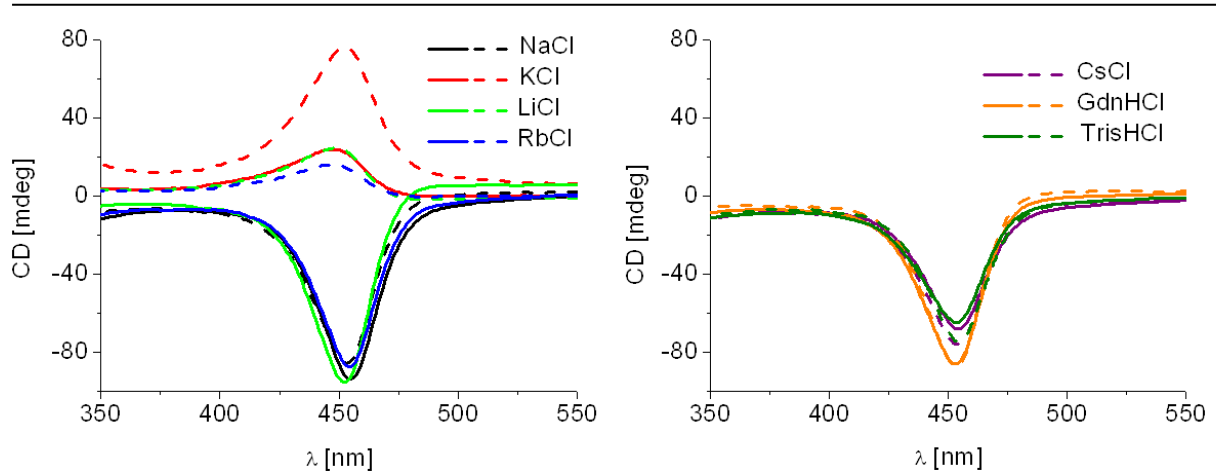


Rys. 60 Widma ICD po wybarwieniu tioflawiną T agregatów powstałych przy różnych stężeniach NaCl (A), intensywność fluorescencji przy 482 nm oraz sygnału ICD przy 450 nm w funkcji stężenia NaCl dla tych samych agregatów (B). Pomiary ICD wykonano przy stężeniu białka 0,007 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 67 μ M. Pomiary fluorescencji wykonano przy stężeniu białka 0,033 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 15 μ M. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

4.3.3.2 Przebieg chiralnej agregacji przy udziale różnych soli chlorkowych

Chiralna agregacja jest możliwa dzięki obecności anionów chlorkowych, które ekranują ładunek białka. Zweryfikowano czy kation w solach chlorkowych ma wpływ na przebieg tego procesu. Agregację insuliny wołowej o stężeniu 0,2 wt. % w pD 1,8 przeprowadzono w ciągu 48 godzin w 60°C, przy wytrząsaniu z prędkością 1400 rpm (warunki wywołujące tworzenie się struktur typu -ICD) w obecności różnych chlorków w stężeniu 0,1 M. Kationy wykorzystanych soli charakteryzowały się różnymi promieniami jonowymi ($Li^+ < Na^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+ < GdnH^+ < TrisH^+$) oraz inną pozycją w szeregu Hofmeistera ($Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ > TrisH^+ > GdnH^+$, gdzie Cs^+ najsilniej wysala białka, natomiast $GdnHCl$ jest najmocniejszym czynnikiem chaotropowym, a więc denaturującym białka).

Wszystkie zastosowane sole chlorkowe umożliwiają chiralną agregację (Rys. 61). W kilku przypadkach wystąpiła zmiana znaku sygnału ICD w stosunku do typowych ujemnych widm obserwowanych w tych warunkach dla NaCl. Można więc uznać, że najistotniejsza jest obecność anionów zapewniających ekranowanie ładunku białka i odpowiednia siła jonowa roztworu, natomiast wraz ze zmianą kationu nie następują żadne znaczące zmiany strukturalne blokujące możliwość tworzenia się chiralnych superstruktur. Nawet dodatek silnie chaotropowego $GdnHCl$ nie redukuje zdolności agregacji insuliny w chiralne superstruktury, jednakże kationy mogą zmieniać sposób asocjacji włókien w strukturę -ICD bądź +ICD.



Rys. 61 Widma ICD agregatów insuliny wołowej powstałych przy udziale różnych chlorków w warunkach wywołujących powstawanie struktur typu –ICD. Dla każdego z typów soli przygotowano po 2 próby. Widma dla przejrzystości podzielono na 2 plansze. Pomiary ICD wykonano przy stężeniu białka 0,007 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 67 μ M. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

4.3.3.3 Przebieg chiralnej agregacji w roztworach elektrolitów pozbawionych jonów chlorkowych

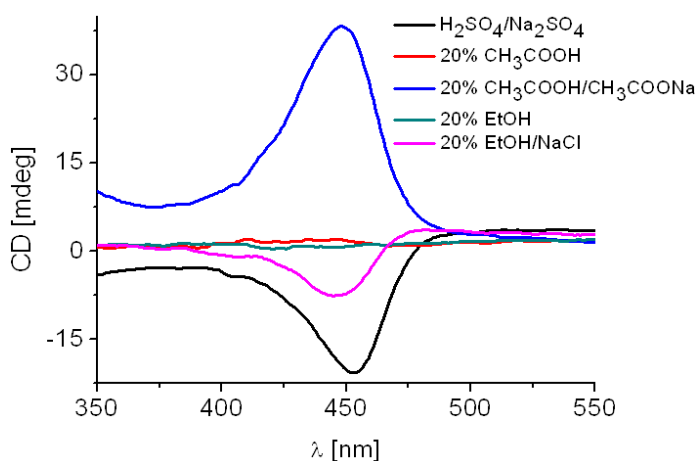
Dotychczas chiralną agregację insuliny zaobserwowano w roztworach wodnych i w obecności jednowartościowych soli chlorkowych. Poniższy eksperyment miał na celu sprawdzenie czy ten proces może zajść w innych roztworach bądź w obecności innego typu soli. Agregację insuliny wołowej o stężeniu 0,2 wt. % przeprowadzono w ciągu 48 godzin w 60°C, przy wytrząsaniu z prędkością 1400 rpm (warunki wywołujące tworzenie się struktur typu –ICD) w 5 różnych roztworach:

- 1) pH=1,8 (H_2SO_4), 0,1 M Na_2SO_4
- 2) pH=2, 20% CH_3COOH
- 3) pH=3, 20% CH_3COOH , 0,1 M CH_3COONa
- 4) pH=1,8 (HCl), 20% EtOH
- 5) pH=1,8 (HCl), 20% EtOH, 0,1 M NaCl

Dobór roztworów podyktowany był różnym wpływem zastosowanych odczynników na białko. Pamiętając o istotnej roli anionów w ekranowaniu ładunku białka przeanalizowano skuteczność soli zawierających inne aniony niż zwyczajowo stosowany Cl^- . Agregację przeprowadzono także przy udziale etanolu, który ma ciekawy wpływ na ten proces w warunkach niesprzyjających tworzeniu się chiralnych superstruktur.

Jon siarczanowy plasuje się bardzo wysoko w szeregu Hofmeistera [Collins, 1985], a więc najsilniej stabilizuje białko jednocześnie obniżając jego rozpuszczalność [Whittingham, 2002; Jain,

2010]. Kwas octowy już w 20% stężeniu wymusza monomeryzację dimerów insuliny [Weiss, 1989] a jednocześnie inaczej przyspiesza agregację insuliny w wysokich i niskich temperaturach w porównaniu z HCl: w temperaturze 25°C agregacja w CH₃COOH jest szybsza niż w HCl, natomiast w temperaturze 50°C jest odwrotnie [Nielsen, 2001a]. Można to wytłumaczyć w ten sposób, że insulina w postaci monomerycznej w CH₃COOH jest dość stabilna i mało podatna na agregację, jednak w niskich temperaturach prawdopodobieństwo zajścia tego procesu jest większe niż dla układu dimer-monomer w kwasie solnym [Whittingham, 2002]. Należy pamiętać, że kwas octowy w niskim pH jest niezdysoncjowany i nie wnosi znaczącego wkładu w ekranowanie dodatnio naładowanych cząsteczek białka. Zastosowano stężenie 20% CH₃COOH i odpowiadające mu pH 3, gdyż są to standardowe warunki, w jakich jest przeprowadzana agregacja przy użyciu kwasu octowego. Jon octanowy znajduje się w szeregu Hofmeistera pomiędzy jonem siarczanowym (IV) a chlorkowym ma znacznie większy promień jonowy niż anion Cl⁻. Etanol w 20% stężeniu także powoduje monomeryzację



Rys. 62 Widma ICD agregatów insuliny wołowej powstałych w różnych roztworach w temperaturze 60°C i przy udziale mieszania. Pomiary ICD wykonano przy stężeniu białka 0,007% po rozcieńczeniu buforem o pH 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 67 μM. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

insuliny [Brems, 1990], spowalnia nieco agregację w wysokich temperaturach, a jednocześnie przyczynia się do tworzenia się silniejszych wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami w β-kartce [Dzwolak, 2005c]. Agregaty powstałe w obecności etanolu bez mieszania w obniżonym pH i w wysokiej temperaturze mają strukturę po części fibrylną, a po części są amorficzne [Dzwolak, 2005a].

W próbkach zawierających 20% dodatek kwasu octowego bądź etanolu przy braku soli chiralne superstruktury nie tworzą się, nawet pomimo obecności jonów octanowych w stężeniu ok. 5 mM w tym pierwszym przypadku dzięki dysocjacji kwasu octowego. Natomiast po dodaniu dowolnej soli dla powstałych amyloidów rejestrowane są wyraźne sygnały ICD. Duże wymiary anionu (CH₃COO⁻) nie ograniczają procesu chiralnej agregacji, choć mogą wpływać na strukturę powstających

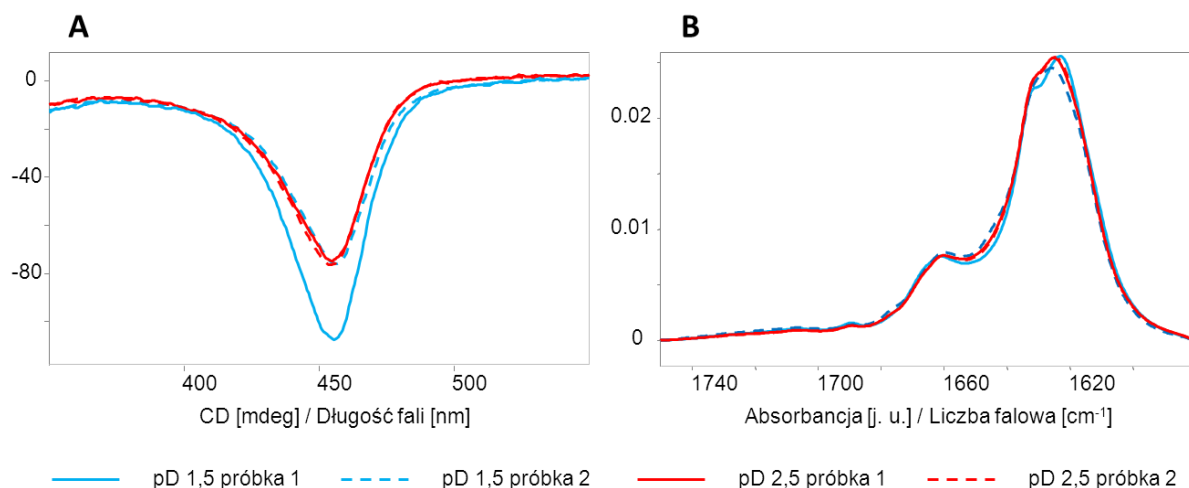
amyloidów wywołując zmianę znaku w widmach ICD, tak jak miało to miejsce w przypadku różnych kationów w solach chlorkowych. Z drugiej strony zjawisko to może być wywołane także inną stabilnością białka w formie natywnej w takim roztworze i możliwą inną konformacją stanu pośredniego w agregacji. Należy też pamiętać, że amyloidy powstałe w różnych rozpuszczalnikach mogą mieć różną wydajność wiązania tioflawiny T [Dzwolak, 2005a], a więc intensywność pików ICD nie jest kluczowym kryterium w charakteryzowaniu struktur amyloidowych. Tak więc w powstawaniu chiralnych agregatów ważny jest anion i nie tylko Cl^- umożliwia ten proces, natomiast rodzaj anionu może modyfikować chiralną samoorganizację fibryli w superstruktury.

4.3.3.4 Wpływ pD na przebieg chiralnej agregacji

Pytanie o wpływ pD na wynik procesu agregacji było istotne w kontekście prac grupy badawczej Ledneva gdzie obserwowano chiralność amyloidów insuliny wołowej zależną od pH agregacji przy braku mieszania, co rejestrowano przy pomocy spektroskopii VCD [Kurouski, 2012a]. W temperaturze 70°C otrzymywali oni dwa typy amyloidów charakteryzujących się pojedynczymi fibrylami – NF powstające w pH 2,4-3,2 i RF powstające w pH 1,1-2,1, które indukowały zerowy bądź słaby ujemny sygnał ICD w tioflawinie T. Powstało pytanie: czy dla próbek mieszanych występuje podobna zależność od pD? Poniższe badania weryfikują wpływ pD na agregację superstruktur powstających w obecności mieszania.

Agregację insuliny wołowej o stężeniu 1 wt. %, 0,1 M NaCl przeprowadzono w ciągu 48 godzin w 60°C , przy wytrząsaniu z prędkością 1400 rpm (warunki wywołujące tworzenie się struktur typu –ICD) w pD 1,5 oraz pD 2,5. Zastosowane pD było poniżej wartości zapewniającej rozpuszczenie się insuliny wołowej.

Agregacja w pD 1,5 i pD 2,5 ma bardzo zbliżony przebieg i skutkuje powstaniem chiralnych superstruktur o znaku „-” (Rys. 63 A). Także pasmo amid I' ma w przypadku tych agregatów zbliżony kształt i położenie (Rys. 63 B). Co ciekawe, próbki indukujące identyczny co do wartości i kształtu sygnał ICD (powstałe przy pD 2,5) charakteryzują się także identyczną absorpcją w podczerwieni. Można więc stwierdzić, że o ile pH ma wpływ na powolną elongację i splatanie się protofibryli [Kurouski, 2012a] to nie odgrywa już tak kluczowej roli w obecności mieszania i inne, szybciej przebiegające procesy mają tu decydujący wpływ. Należy pamiętać, że równowaga pomiędzy różnymi oligomerami bądź konformerami insuliny, zależna od pD, może być znacząco przesunięta w obecności mieszania. Porównania otrzymanych próbek z chiralnymi strukturami badanymi przez Kurouskiego nie można dokonać wprost, gdyż pracowali oni w H_2O , natomiast wyżej opisane próbki powstały w D_2O . Odczyt wartości pH/pD jest różny ze względu na efekty izotopowe, dodatkowo nie można wykluczyć innego przebiegu agregacji białka w H_2O i D_2O . Jednak otrzymane wyniki pozwalają sądzić, że pD w agregacji z udziałem mieszania nie ma decydującego wpływu na tworzenie się chiralnych superstruktur.

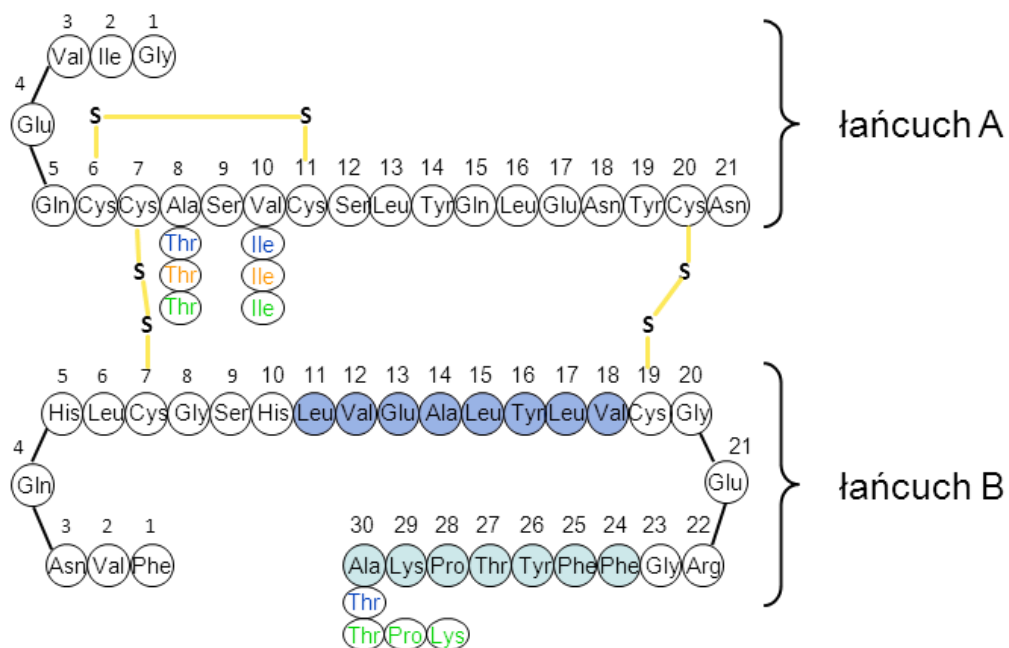


Rys. 63 Agregacja 1 wt. % insuliny wołowej w 0,1 M NaCl, przy 1400 rpm, 60°C, 48 godz. w pD 1,5 oraz pD 2,5. Widma ICD po wybarwieniu tioflawiną T (A) oraz widma FT-IR (B). Pomiary ICD wykonano przy stężeniu białka 0,012 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pH 2, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 46 μM. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm. Pomiary FT-IR wykonano bezpośrednio na wyjściowych próbkach.

Spośród przeanalizowanych czynników fizykochemicznych kluczowa w chiralnej asocjacji włókien jest obecność soli. Tylko w odpowiednim stężeniu NaCl powstają w trakcie mieszania chiralne superstruktury amyloidowe. Można to wytłumaczyć koniecznością ekranowania ładunku białka dodatnio naładowanego w pH eksperymentu. Zdolność anionów chlorkowych do sklejanja włókien amyloidowych jest na tyle silna, że powoduje asocjację już utworzonych, dojrzałych fibryli w skupiska przypominające chiralne superstruktury i charakteryzujące się dość mocnym sygnałem ICD nawet pod nieobecność mieszania. Zmiana hydratacji białka zależna od położenia danego jonu w serii Hofmeistera i skutkująca modyfikacją stabilności białka natywnego nie ma kluczowego wpływu na ścieżkę amyloidogenezy, dlatego też chiralną agregację obserwuje się w obecności innych anionów niż monowalentny Cl⁻. Z drugiej strony zmiana środowiska agregacji może skutkować delikatnymi różnicami w strukturze i stabilności insuliny i wpływać na znak ICD otrzymanych amyloidów. Drugim czynnikiem, który jest niezbędny w tworzeniu się chiralnych agregatów *de novo* z natywnego białka jest przepływ hydrodynamiczny, gdyż włókna powstałe pod jego nieobecność są zasocjowane, lecz w sposób nieuporządkowany. Dodatkowy parametr – pD – nie decyduje o przebiegu chiralnej agregacji w prosty sposób, gdyż inne czynniki mają tu kluczowy wpływ. Amyloidy powstałe w obniżonym pD o różnych wartościach indukują wzmocniony sygnał ICD w tioflawinie T o tym samym znaku.

4.4 Uwarunkowania struktury pierwszorzędowej pozwalające na tworzenie się chiralnych agregatów typu +ICD i –ICD

Superstruktury amyloidowe, charakteryzujące się wyraźnymi właściwościami chiralnooptycznymi zostały jak dotąd zaobserwowane jedynie w przypadku agregacji insuliny wołowej. Widma ICD amyloidów wybarwionych tioflawiną T zaprezentowane dotychczas przez inne grupy badawcze charakteryzowały się znacznie mniejszą intensywnością i brakiem efektu wzmocnienia, a więc także nie reprezentowały chiralnych superstruktur, lecz najprawdopodobniej skrętność pojedynczych protofilamentów [Kurouski, 2012b, Biancalana, 2009; Sabate, 2008]. Jedną z istotnych kwestii, postawionych w ramach mojej pracy doktorskiej było rola struktury I-rzędowej insuliny w



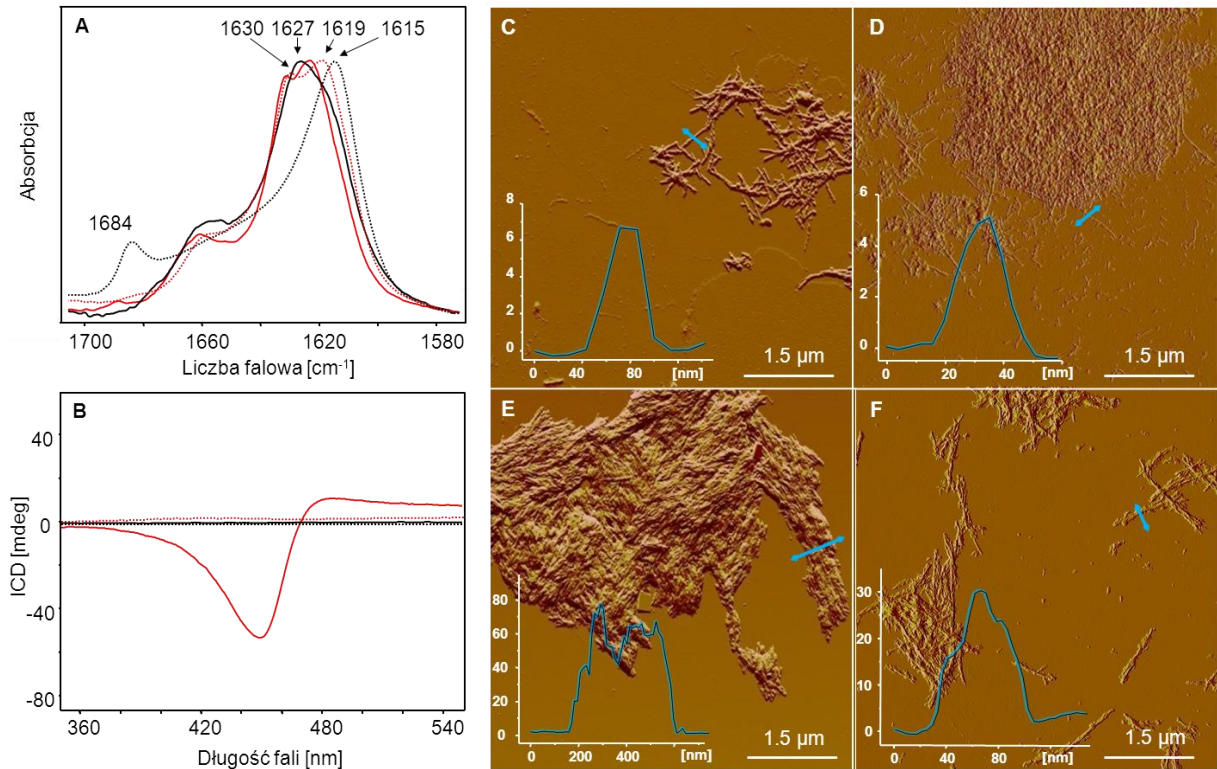
Rys. 64 Sekwencja aminokwasowa różnych wariantów insuliny: czarny – wołowa, kolory odpowiadają podstawieniom aminokwasowym względem wołowej insuliny prowadzącym do insulin innych ssaków: niebieski – ludzka, pomarańczowy – wieprzowa, zielony – analog lispro, fragment LVEALYLV – ciemny niebieski (eksperyment 3.2), fragment FFYTPKA – jasny niebieski.

tworzeniu się struktur typu +ICD i –ICD. W tej części pracy eksperymentalnej postawiono pytanie, czy zdolność do tworzenia chiralnych superstruktur typu +/-ICD jest unikalną cechą insuliny, a jeśli tak, to jakie cechy struktury kowalencyjnej peptydu umożliwiają powstawanie tego rodzaju form. W celu odpowiedzi na to pytanie zbadano szereg różnych amyloidogennych białek i peptydów i przeanalizowano ich zdolność do chiralnej agregacji. Zbadano także warianty insuliny o nieco innej sekwencji aminokwasowej oraz pojedyncze łańcuchy A i B (Rys. 64).

4.4.1 Agregacja pojedynczych łańcuchów A i B insuliny wołowej z udziałem wytrząsania oraz przy jego braku

Celem tego eksperymentu było sprawdzenie jakie są różnice w agregacji łańcucha A oraz łańcucha B. Pozwoliło to na określenie czy oba łańcuchy mają tendencję do tworzenia chiralnych superstruktur. Przeprowadzono agregację pojedynczych łańcuchów insuliny wołowej a także ich mieszaniny w różnych warunkach fizykochemicznych. Wykorzystano zredukowane łańcuchy A i B z niezabezpieczonymi grupami –SH (jak to ma miejsce w przypadku utleniania grup –SH do –SO₃⁻ [Devlin, 2006]). Brak modyfikacji kowalencyjnych reszt bocznych cystein pozwolił na śledzenie agregacji tych peptydów bez zmiany ich wypadkowego ładunku bądź potencjalnych przeszkód sterycznych [Hong, 2006], które mogłyby wpływać na przebieg procesu. Metoda wydajnego rozdzielania łańcuchów A i B została szczegółowo opisana w publikacji [Babenko, 2013]. Przygotowano agregaty insuliny wołowej, łańcucha A, łańcucha B oraz równomolowej mieszaniny łańcuchów A i B w następujący sposób: 0,25 % białko w 0,1 M NaCl, pD 1,9, agregacja w temperaturze 60°C, w trakcie 4 dni z wytrząsaniem z prędkością 1400 rpm (warunki wywołujące powstawanie struktur typu –ICD z insuliny) bądź podczas 7-dniowej inkubacji bez mieszania. W przypadku mieszaniny łańcuchów A i B 0,25 wt. % było sumarycznym stężeniem obu peptydów zmieszanych w równomolowym stosunku. Roztwory znajdowały się w zakręcanych probówkach Eppendorf w celu uniknięcia ponownego utlenienia przy udziale tlenu atmosferycznego. Do części próbek przed rozpoczęciem agregacji dodano środek redukujący TCEP (tris(2-chloroetylo)fosforan) w stężeniu 20 mM w celu zapobieżenia spontanicznemu tworzeniu się przypadkowych, nienatywnych mostków dwusiarczkowych. Związek ten jest skutecznym reduktorem białkowych mostków dwusiarczkowych w niskim pH [Getz, 1999].

Rys. 65 przedstawia agregaty niezmodyfikowanej insuliny, co stanowi wyjściowy obraz dla dalszej analizy rozdzielonych łańcuchów A i B. Niewytrząsana próbka (czarna linia ciągła) charakteryzuje się typowym dla równoległej β-kartki położeniem piku amid I' (1627 cm⁻¹). Fibryle powstające w obecności 0,1 M NaCl są dość krótkie i występują w grupach ze względu na silną hydrofobowość insuliny (Rys. 65 C). W przypadku próbki chiralnej utworzonej w trakcie mieszania widzimy widmo dichroizmu kołowego ThT o znaku ujemnym i charakterystyczne zwarte agregaty na zdjęciach AFM (Rys. 65 E), natomiast pasmo amid I' w widmie w podczerwieni rozszczepia się na dwa komponenty (1624 i 1630 cm⁻¹), co jest najprawdopodobniej wywołane lokalnym skręceniem β-kartki w trakcie powstawania próbek typu –ICD [Zandomeneghi, 2004]. Z kolei w obecności TCEP w podczerwieni pojawiają się dwa piki – przy 1615 i 1684 cm⁻¹, co świadczy o obecności antyrównoległej β-kartki charakterystycznej dla amyloidów amorficznych zaobserwowanych także w trakcie innych badań zredukowanej insuliny [Zako, 2009]. Na zarejestrowanym obrazie AFM agregaty te są w większości amorficzne i widoczne są tylko pojedyncze włókna o średnicy ok. 5 nm (Rys. XD).

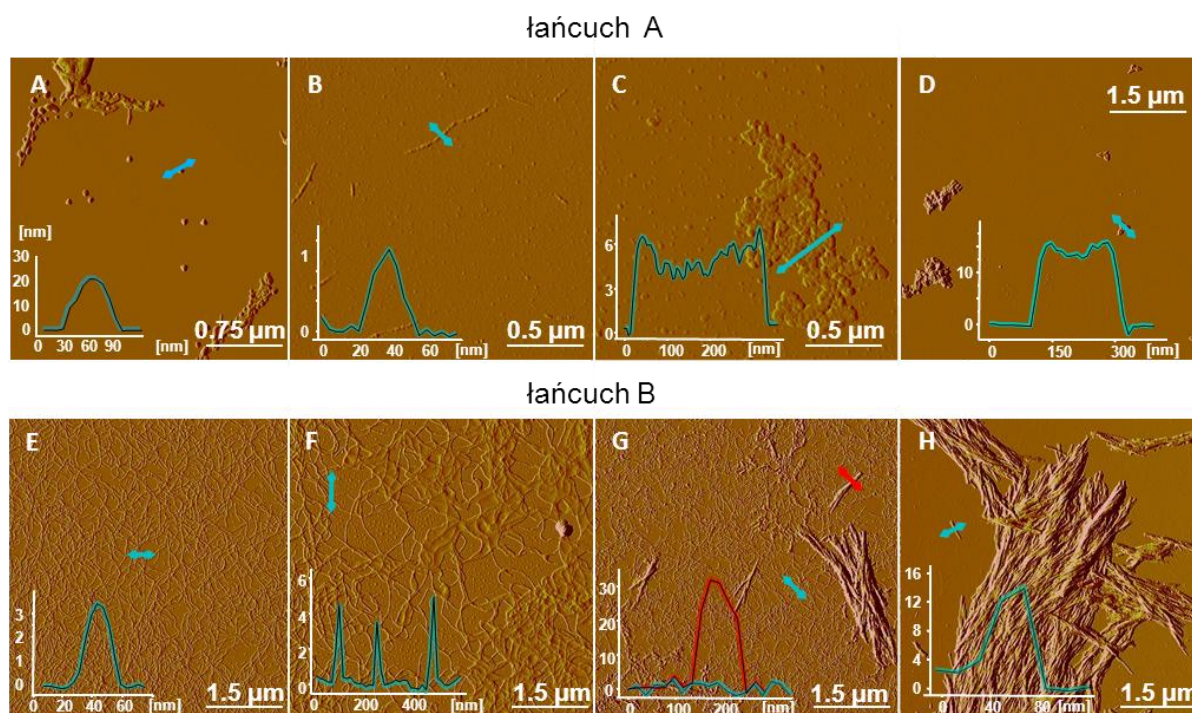


Rys. 65 (A) Pasma amid I' amyloidów utworzonych w trakcie inkubacji w 60°C przy braku (czarny) oraz w obecności TCEP (czarny przerywany), z wytrząsaniem z prędkością 1400 rpm w 60°C przy braku (czerwony) oraz w obecności TCEP (czerwony przerywany); (B) widma ICD tych próbek po wybarwieniu próbek tioflawiną T; (kolejno C, D, E, F) odpowiadające im amplitudowe obrazy AFM. Na wewnętrznych wykresach zaprezentowane są przekroje przeprowadzone wzdłuż niebieskich linii. Pomiary ICD wykonano po 20-krotnym rozcieńczeniu próbek buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T do stężenia końcowego 45 μM. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

Jest to najprawdopodobniej skutkiem redukcji mostków dwusiarczkowych przez TCEP możliwej ze względu na długi czas procesu zachodzącego bez mieszania, kiedy to powstają pośrednie formy konformacyjne z trudnością tworzące fibryle. Przyspieszona agregacja z wytrząsaniem w obecności reduktora pozwala na zachowanie pierwotnej ścieżki agregacji, prowadzącej do powstania równoległej β-kartki widocznej w spektroskopii FT-IR, jednak w trakcie fazy opóźnionej w obecności TCEP może dochodzić do częściowej redukcji natywnych mostków dwusiarczkowych. Ze względu na wywołane w ten sposób nieidealne pakowanie się łańcuchów chiralne superstruktury nie powstają, a włókna, choć zbliżają się do siebie, nie tworzą bardzo dużych, skręconych skupisk (Rys. 65 F).

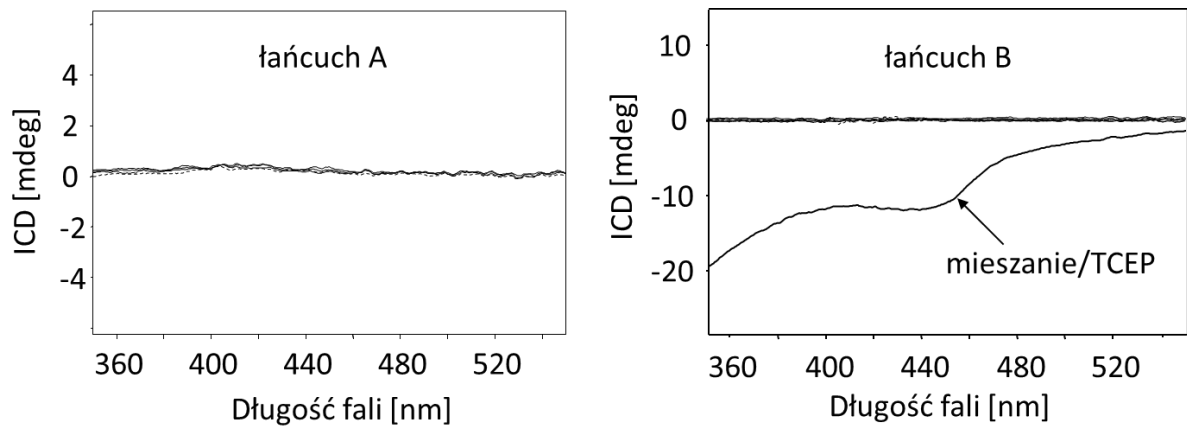
Znając właściwości amyloidów insuliny wołowej powstałych w wyżej opisanych warunkach fizykochemicznych, przeprowadzono agregację rozseparowanych łańcuchów A i B. Na górnym panelu rysunku 66 widoczne są obrazy AFM agregatów łańcucha A. Na pierwszy rzut oka widać, że są one w znacznej części amorficzne, a więc niezależnie od obecności bądź braku reduktora i szybkości procesu modyfikowanej przez obecność mieszania, peptyd ten z trudnością tworzy struktury fibrylarne bez natywnych mostków dwusiarczkowych oraz bez pomocy łańcucha B. Jedynie przy braku wytrząsania i

w obecności TCEP (Rys. 66 B) tworzą się bardzo cienkie (ok. 1 nm), delikatne struktury fibrylarne, które łatwo się łamią na krótsze fragmenty pod wpływem sił hydrodynamicznych (Rys. 66 D). W łańcuchu A, ze względu na obecność aż czterech cystein istnieje istotne prawdopodobieństwo tworzenia się nienatywnych wewnątrzcząsteczkowych wiązań disulfidowych. Dopiero zabezpieczenie reszt bocznych cystein poprzez utlenienie grupy tiolowej do sulfonowej chroni łańcuch A przed utlenianiem pod wpływem tlenu atmosferycznego i tworzeniem się przypadkowych mostków dwusiarczkowych, pozwalając na powstanie dojrzałych włókien amyloidowych [Devlin, 2006].



Rys. 66 Amplitudowe obrazy AFM agregatów łańcuchów A (A-D) i B (E-F) powstałych w trakcie inkubacji w 60°C przy braku (A, E) oraz w obecności TCEP (B, F), z wytrząsaniem z prędkością 1400 rpm w 60°C przy braku (C, G) oraz w obecności TCEP (D, H).

Agregacja zredukowanego łańcucha B zachodzi w odmienny sposób. Ten fragment sekwencji aminokwasowej zawiera dwukrotnie mniej cystein, na dodatek bardziej od siebie oddalonych. Dzięki temu jest mniej narażony na zaplątanie wywołane powstaniem nienatywnych mostków dwusiarczkowych. Bez mieszania, niezależnie od obecności TCEP, tworzą się cienkie elastyczne fibryle o średnicy 3-4 nm (Rys. 66 E, F). Wytworzone włókna są długie, a więc w porównaniu z kompletnym białkiem w przebiegu agregacji dominuje elongacja a nie tworzenie się nowych zarodków agregacji bądź splatanie się cieńszych protofilamentów w grubsze fibryle. Co ciekawe, rozrzut ich grubości jest bardzo niewielki. Agregaty powstałe z łańcucha B ze zredukowanymi grupami -SH są znacznie mniej wykształcone niż przy zabezpieczaniu cystein poprzez tworzenie grupy sulfonowej [Devlin, 2006]. Jednak najważniejszą obserwacją są skupiska fibryli powstałych z łańcucha B w trakcie wytrząsania



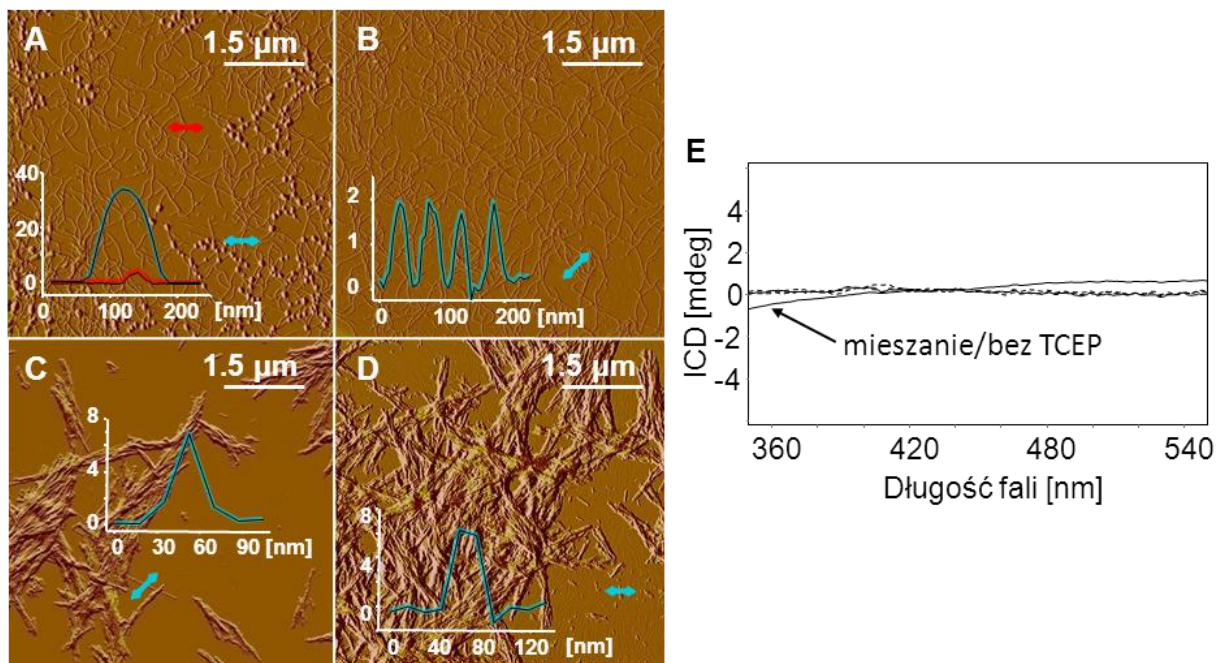
Rys. 67 Widma ICD próbek łańcucha A oraz łańcucha B zabarwionych tioflawiną T powstałych w trakcie inkubacji w 60°C przy braku oraz w obecności TCEP, z wytrząsaniem z prędkością 1400 rpm w 60°C przy braku oraz w obecności TCEP. Pomiary ICD wykonano po 20-krotnym rozcieńczeniu próbek buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T do stężenia końcowego 45 μ M. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

(Rys. 66 G i H). W przypadku braku reduktora są one niewielkie, natomiast w obecności TCEP przypominają z wyglądu chiralne superstruktury amyloidowe. Istotnie, cecha ta przejawia się także w widmach ICD tioflawiny T – widoczne jest rozmyte minimum z pikem przy 450 nm (Rys. 67). W przypadku wszystkich innych próbek amyloidu powstałych z łańcucha A oraz z łańcucha B sygnał indukowanego dichroizmu kołowego był zerowy. Na podstawie tych obserwacji można powiedzieć, że właściwości strukturalne łańcucha B odpowiadają za tworzenie się chiralnych superstruktur amyloidowych przez insulinę, gdyż tylko ten fragment sekwencji jest w stanie wytworzyć skupiska fibryli o właściwościach typowych dla chiralnych superstruktur.

Wiedząc o zerowym sygnale ICD obserwowanym dla amyloidów otrzymanych z insuliny wołowej w trakcie mieszania i w obecności reduktora, zbadano dodatkowo także agregację równomolowej mieszaniny rozdzielonych łańcuchów A i B. W ten sposób sprawdzono zdolność łańcuchów do odtwarzania pierwotnej struktury insuliny z natywnymi mostkami dwusiarczkowymi.

Na rysunku 68 A widoczne są dwa różne kształty agregatów: charakterystyczne dla łańcucha A (kulki o średnicy ok. 30 nm) oraz dla łańcucha B (elastyczne fibryle o średnicy ok. 4 nm). Wydaje się, że są one jedynie lateralnie sklejone i w trakcie agregacji nie tworzą wspólnych struktur. Zablokowanie za pomocą TCEP możliwości tworzenia przypadkowych mostków dwusiarczkowych pozwala na wykształcenie się cienkich struktur fibrylarnych (Rys. 68 B) i przede wszystkim wspomaga tworzenie włókien amyloidowych przez łańcuch A. Oba typy amyloidów powstałe bez mieszania nie indukują dichroizmu kołowego tioflawiny T (Rys. 68 E). Z kolei w trakcie mieszania powstają dość zwarte agregaty o wyglądzie przypominającym chiralne superstruktury (Rys. 68 C i D) lecz włókna nie są ułożone w jednym kierunku w pęczku lecz przecinają się pod różnymi kątami. Najwyraźniej są one niedostatecznie uporządkowane, gdyż sygnał indukowanego dichroizmu kołowego jest bardzo słaby

pod nieobecność reduktora a dla próbki z TCEP - zerowy (Rys. 68 E), a więc niejako obecność oddzielnego łańcucha A przeszkadza łańcuchowi B w wykształceniu chiralnych superstruktur.

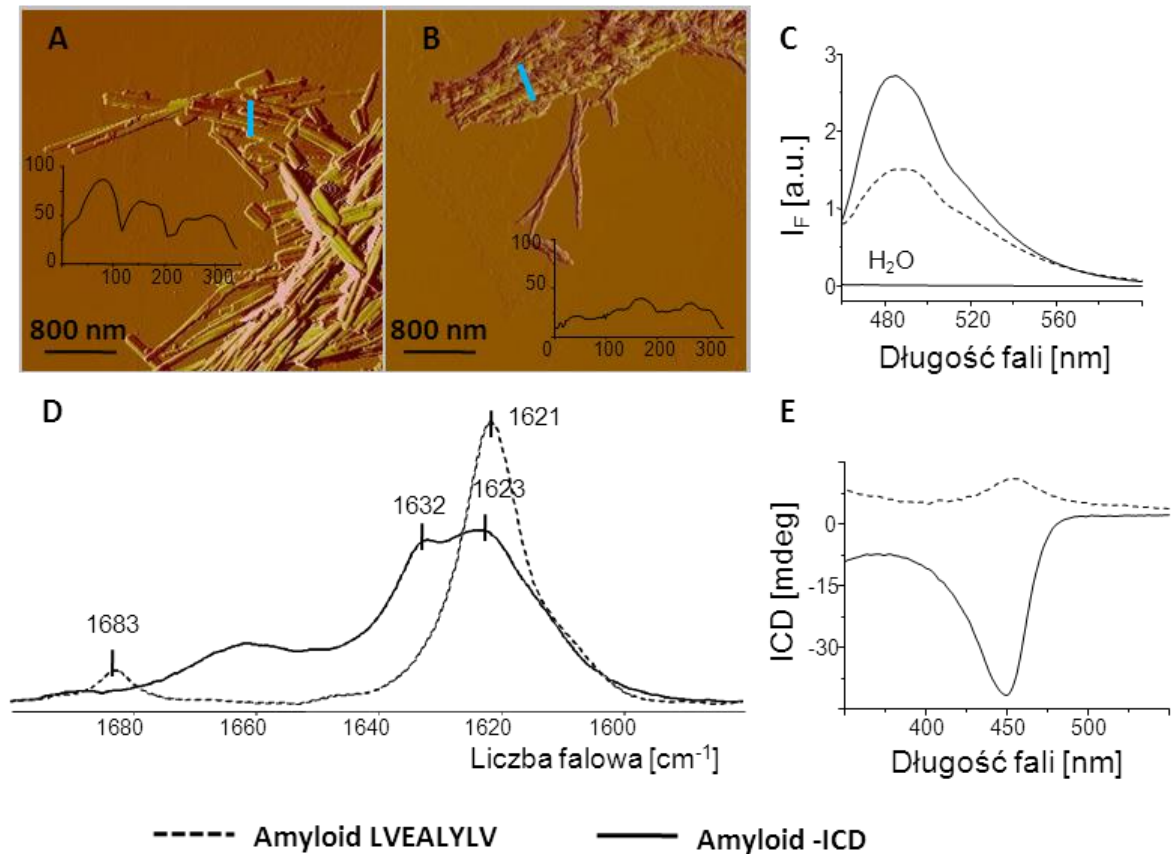


Rys. 68 Amplitudowe obraz AFM amyloidów, powstałych z równomolowej mieszaniny łańcuchów A i B insuliny w trakcie inkubacji w 60°C przy braku (A) oraz w obecności TCEP (B), z wytrząsaniem z prędkością 1400 rpm w 60°C przy braku (C) oraz w obecności TCEP (D) oraz widma ICD tych próbek po wybarwieniu tioflawiną T (E). Pomiary ICD wykonano po 20-krotnym rozcieńczeniu próbek buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T do stężenia końcowego 45 μM. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

4.4.2 Agregacja peptydu LVEALYLV kluczowego w tworzeniu się fibryli insulinowych w warunkach prowadzących do powstania chiralnych superstruktur

Mając na uwadze decydującą rolę łańcucha B insuliny w chiralnej agregacji sprawdzono zdolności do tworzenia superstruktur przez peptyd LVEALYLV, będący krótkim fragmentem łańcucha B zdolnym do tworzenia fibryli amyloidowych i zdolnym do zasiewania insuliny. Określa się go jako peptyd rdzeniowy i na podstawie jego struktury krystalicznej utworzono model włókna amyloidowego insuliny [Ivanova, 2009]. Peptyd LVEALYLV w stężeniu 0,25 wt. % oraz porównawczo próbka insuliny wołowej agregowały w trakcie 4-dniowego wytrząsania z prędkością 1400 rpm w 60°C, w pH=1,9 oraz w obecności 0,1 M NaCl.

W przypadku peptydu LVEALYLV warunki agregacji sprzyjające tworzeniu się chiralnych superstruktur typu -ICD powodowały powstanie innego typu agregatów – grubszych struktur o kształcie prostopadłościanów przypominających kryształy (Rys. 69 A). Podobne obiekty były



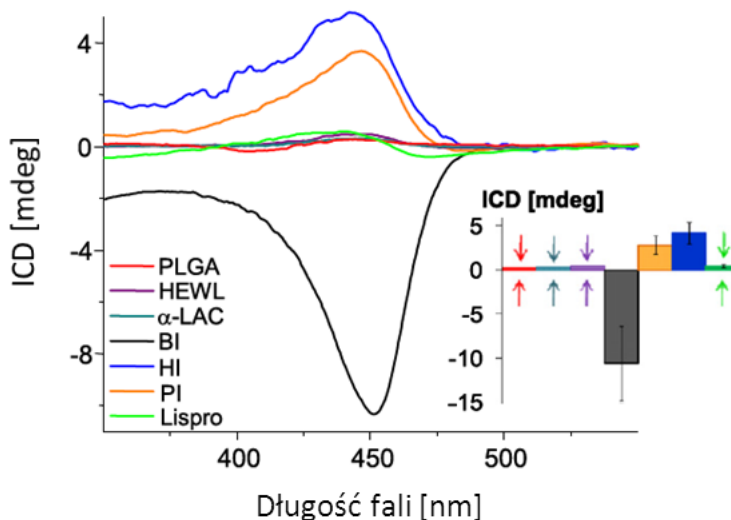
Rys. 69 Amplitudowe obrazy AFM agregatów utworzonych przez peptyd LVEALYLV (A) oraz przez insulinę wołową (B) w warunkach sprzyjających powstawaniu struktur typu -ICD. Na wewnętrznych wykresach zaprezentowane są przekroje przeprowadzone wzdłuż niebieskich linii. Obok przedstawione są widma fluorescencji ThT (C), FT-IR (D) oraz ICD ThT (E) tych próbek. Pomiary fluorescencji wykonano przy stężeniu próbek 0,029 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 40 μ M w kuwecie kwarcowej o grubości 4 mm. Pomiary ICD wykonano przy stężeniu próbek 0,012 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 45 μ M w kuwecie kwarcowej o grubości 10 mm.

obserwowane w przypadku krótkich peptydów w grupie Davida Eisenberga, gdzie nazywano je krystalitami [Ivanova, 2009]. Jednocześnie można w ich przypadku zaobserwować intensywną fluorescencję po wybarwieniu tioflawiną T (Rys. 69 C), a więc cechą typową dla amyloidów. Istotnie, widma FT-IR potwierdziły strukturę antyrównoległej β -kartki z dwoma pikami przy 1621 cm^{-1} i 1683 cm^{-1} , jednak jest to odmienna struktura od równoległej β -kartki tworzonej w tych warunkach przez insulinę wołową (Rys. 69 D). Z kolei w widmach ICD widoczny jest pik o znaku dodatnim i niskiej intensywności w porównaniu z insuliną wołową, nieco przesunięty w kierunku dłuższych fal z typowej pozycji 450 nm do ok. 460 nm (Rys. 69 E). Ma on najprawdopodobniej pochodzenie konformacyjne, lecz jest dość intensywny ze względu na duży stopień uporządkowania krystalitów peptydowych. Można więc stwierdzić, że pomimo silnej tendencji do agregacji w warunkach sprzyjających powstawaniu struktur typu -ICD, peptyd LVEALYLV, kluczowy w tworzeniu się włókien insulinowych, nie tworzy chiralnych superstruktur.

4.4.3 Agregacja różnych białek prekursorowych oraz wariantów insuliny w warunkach prowadzących do powstania chiralnych superstruktur

Chiralne superstruktury amyloidowe otrzymywano dotychczas jedynie dla insuliny i nie było jasne czy to jest unikalna cecha jedynie tego białka. W tej części badań określono zdolność do tworzenia takich agregatów przez inne niż insulina białka bądź peptydy w warunkach sprzyjających temu procesowi. Dodatkowo sprawdzono wpływ modyfikacji sekwencji aminokwasowej insuliny na przebieg chiralnej amyloidogenezy.

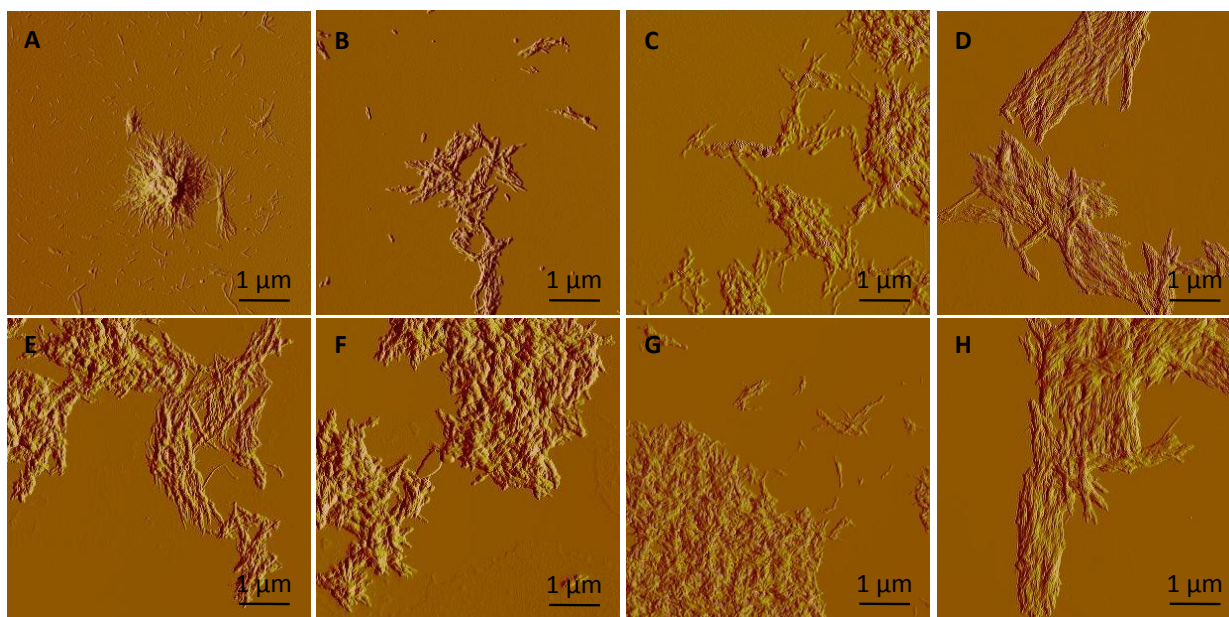
Z insuliny wołowej, wieprzowej, ludzkiej, analogu lispro, lizozymu z białka jaja kurzego i α -laktoalbuminy w stężeniu 0,2 wt. % przygotowano po 4 próbki amyloidów w warunkach sprzyjających tworzeniu się agregatów typu –ICD: przy 48-godzinnym wytrząsaniu z prędkością 1400 rpm w 60°C w pH 1,9 oraz w obecności 0,1 M NaCl. Wszystkie te białka w stanie natywnym są w dominującym stopniu α -helikalne. Zbadano także agregację z wytrząsaniem kwasu poli-L-glutaminowego. W jego przypadku pD wynosiło 4,3 a do roztworu nie dodawano soli, co odpowiada typowym warunkom amyloidogenezy PGA [Fulara, 2010]. Ze względu na zmniejszenie jonizacji reszt bocznych zbyt silne obniżenie pH skutkowałoby natychmiastowym przejściem kwasu poliglutaminowego z formy kłębaka statystycznego do β -karkowej, czego konsekwencją jest niepożądana szybka precipitacja amorficznych agregatów [Spek, 1995].



Rys. 70 Uśrednione dla 4 próbek widma ICD agregatów powstałych z kwasu poli-L-glutaminowego (PLGA), lizozymu (HEWL), α -laktoalbuminy (α -LAC), insuliny wołowej (BI), ludzkiej (HI), wieprzowej (PI) oraz analogu lispro. Panel wewnętrzny przedstawia średnie wartości intensywności piku przy 450 nm dla tych próbek z zaznaczonymi odchyleniami standardowymi. Pomiary ICD wykonano przy stężeniu próbek 0,0024% po rozcieńczeniu buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl bądź buforem o pH 4,3 w przypadku PLGA oraz dodano tioflawinę T w stężeniu 70 μ M. Eksperymenty przeprowadzono w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm.

Pomimo wprowadzenia warunków sprzyjających powstawaniu chiralnych agregatów (mieszanie, obecność przeciwjonów), agregaty żadnego z nieinsulinowych prekursorów nie wykazują intensywnych widm indukowanego dichroizmu kołowego (Rys. 70). Z drugiej strony wszystkie amyloidy powstały z naturalnie występujących insulin – wołowej, ludzkiej oraz wieprzowej mają wyraźne sygnały ICD. Co ciekawe, znak efektu Cottona jest w przypadku insuliny ludzkiej i wieprzowej odwrócony (+ICD). Wydają się za to być odpowiedzialne aminokwasy treonina oraz izoleucyna w pozycjach A8 oraz A10, a więc we fragmencie zamkniętym przez wewnętrzny mostek dwusiarczkowy łańcucha A, gdyż sekwencja C-końcowego fragmentu łańcucha B jest w przypadku insuliny wołowej i wieprzowej identyczna. Uwzględniając, że mostki dwusiarczkowe są zachowywane w trakcie agregacji [Kurouki, 2012c], można sądzić, że wygięcie tej pętli wpływa na chiralność zasocjowanych skupisk fibryli wyższego rzędu. Tak więc niewielkie różnice w sekwencji aminokwasowej w przypadku insuliny ludzkiej i wołowej nie wyłączają chiralnej ścieżki agregacji, lecz są wystarczające do zmiany jej przebiegu. Najciekawszy efekt ma miejsce w przypadku analogu lispro. Jest to komercyjnie dostępna zmodyfikowana wersja insuliny ludzkiej z zamienionymi kolejnością aminokwasami Pro^{B28} i Lys^{B29}. Podstawienie to znajduje się w sąsiedztwie fragmentu łańcucha odpowiedzialnego za tworzenie się dimerów. Jego skutkiem jest osłabienie oddziaływań hydrofobowych pomiędzy aminokwasami B24-B26 redukujące tendencję insuliny do dimeryzacji, dzięki czemu analog lispro jest wykorzystywany w farmacji jako szybko działająca insulina [Howey, 1994]. Sygnał ICD tych próbek jest znacznie niższy niż dla insuliny ludzkiej, choć zachowuje znak dodatni o intensywności porównywalnej z widmami lizozymu, α -laktoalbuminy oraz PLGA. Można więc sądzić, że ma on pochodzenie konformacyjne (skręcenie cząsteczek ThT) a nie superstrukturalne (długozasięgowe sprzężenie cząsteczek ThT związanych z chiralnym rusztowaniem amyloidowym). Oznacza to, że zmniejszenie zdolności do hydrofobowych oddziaływań C-końcowych fragmentów łańcucha B insuliny wyłącza ścieżkę chiralnej agregacji. Z kolei wcześniejsze badania wykazały, że jedynie łańcuch B ma zdolność do tworzenia chiralnych superstruktur. Wyniki z obu tych eksperymentów są ze sobą zgodne i można na ich podstawie stwierdzić, że w przypadku insuliny C-końcowa część łańcucha B jest kluczowa w tworzeniu się chiralnych superstruktur.

Uzyskano także obrazy AFM analizowanych agregatów (Rys. 71). Wszystkie typy fibryli są dość silnie zasocjowane, co jest możliwe dzięki obecności chlorków bądź przy odpowiednim ładunku polipeptydu w przypadku PLGA. Z drugiej strony włókna powstałe z różnych białek są w różnym stopniu uporządkowane w określonym kierunku. Intensywność sygnału ICD wydaje się korelować ze stopniem ich liniowego uporządkowania.

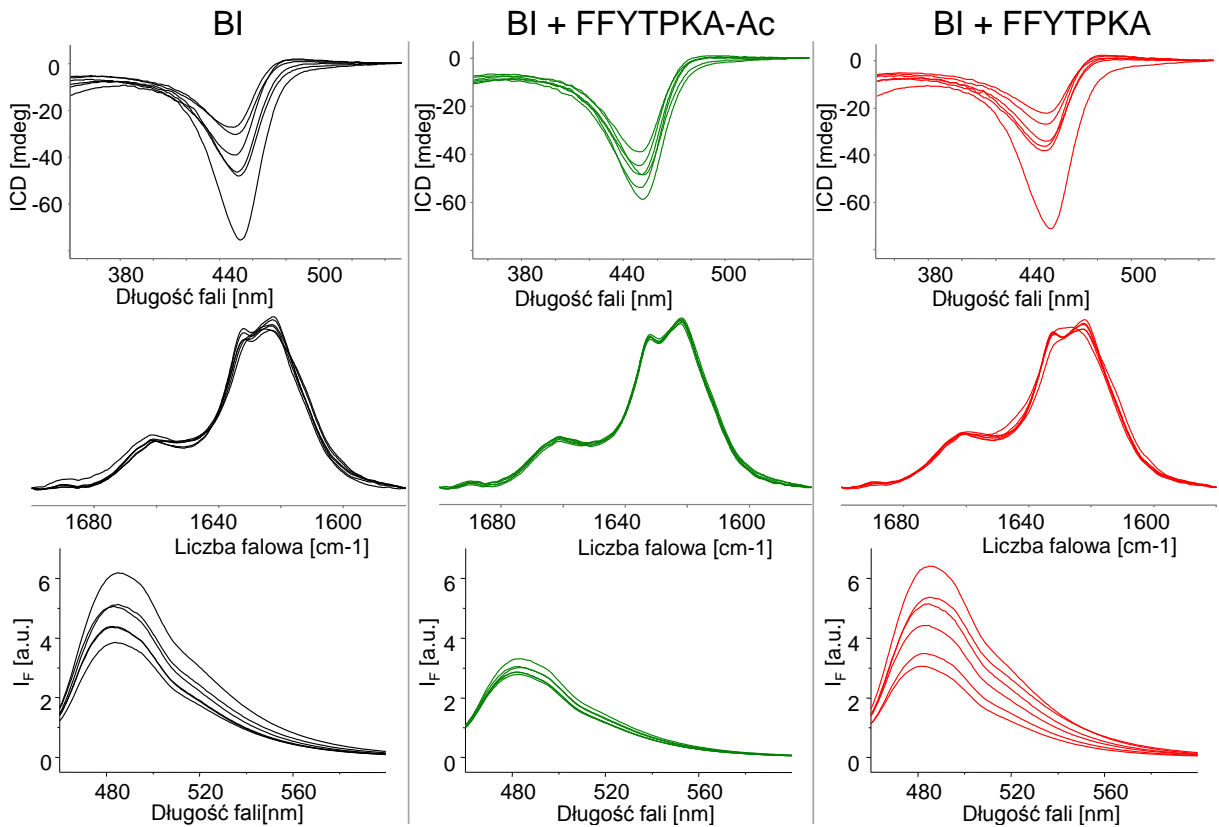


Rys. 71 Amplitudowe obrazy AFM agregatów powstałych w warunkach sprzyjających powstawaniu chiralnych superstruktur. Białko-prekursor: kwas poli-L-glutaminowy (A), lizozym z białka jaja kurzego (B), α -laktoalbumina typu I (C), insulina wołowa (D, H), insulina ludzka (E), insulina wieprzowa (F), analog lispro (G).

4.4.4 Wpływ peptydów C-końcowych na przebieg chiralnej agregacji

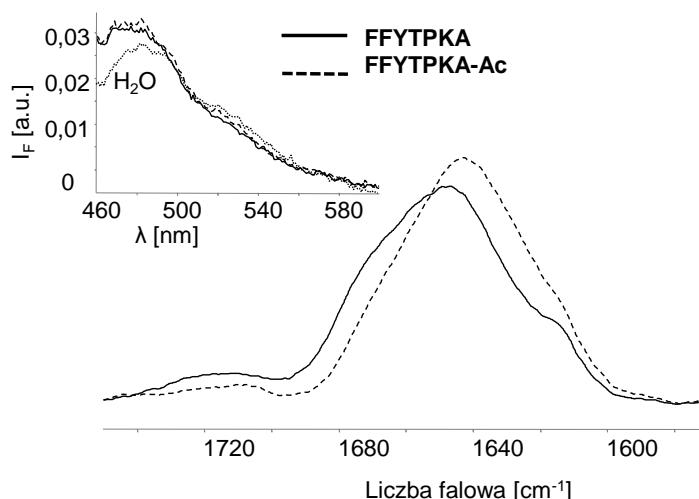
Opierając się na wynikach eksperymentu 4.3, świadczących o decydującym wpływie C-końcowego fragmentu łańcucha B na powstawanie chiralnych superstruktur zbadano, czy obecność w roztworze agregującej insuliny wołowej C-końcowych peptydów łańcucha B będzie skutkowało zablokowaniem fragmentów sekwencji odpowiedzialnych za tworzenie się chiralnych superstruktur. Przeprowadzono agregację insuliny wołowej w stężeniu 0,2 wt. % w obecności równomolowej ilości 7-aminokwasowego peptydu FFYTPKA w dwóch wersjach: niezabezpieczonej oraz z acylowaną terminalną grupą aminową. Agregacja przebiegała przez 48 godzin z wytrząsaniem z prędkością 1400 rpm w temperaturze 60°C, w pH 1,9, 0,1 M NaCl. W celach porównawczych przeprowadzono także agregację samej insuliny wołowej w identycznych warunkach. Eksperyment wykonano w 6 powtórzeniach dla każdego z typów roztworów.

C-końcowe fragmenty łańcucha B insuliny wołowej nie inhibują chiralnej agregacji, a więc nie „zalepiają” analogicznych sekwencji w natywnych cząsteczkach insuliny. Wszystkie typy powstałych agregatów charakteryzują się wzmocnionym indukowanym dichroizmem kołowym tioflawiny T z nimi związanej, pasmem amid I' we FT-IR o podwójnym maksimum oraz wzmacniają fluorescencję tioflawiny T. Na wynik agregacji widoczny jest pewien wpływ tylko jednego z peptydów – FFYTPKA-Ac. W przypadku tej serii próbek zastosowane metody spektroskopowe ukazują bardzo zbliżone kształtem i intensywnością widma dla wszystkich 6 powtórzeń (Rys. 72). Dotyczy to zarówno pasma



Rys. 72 Widma ICD-ThT, FTIR oraz fluorescencji po wybarwieniu ThT próbek otrzymanych w trakcie agregacji insuliny wołowej, insuliny wołowej z równomolowym dodatkiem acylowanego peptydu FFYTPKA oraz insuliny wołowej z równomolowym dodatkiem niezabezpieczonego peptydu FFYTPKA. Pomiary ICD wykonano przy stężeniu próbek 0,007 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 70 μ M w kuwecie kwarcowej o grubości 10 mm. Pomiary fluorescencji wykonano przy stężeniu próbek 0,029 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 40 μ M w kuwecie kwarcowej o grubości 4 mm.

amid I' we FT-IR jak i intensywności sygnału ICD i fluorescencji związanej z amyloidami tioflawiny T. Obecność peptydu Ac-FFYTPKA w roztworze wydaje się więc porządkować przebieg agregacji prowadząc do powstania jednorodnych chiralnych superstruktur we wszystkich próbach. Warto zaznaczyć, że te krótkie fragmenty insuliny nie tworzą wydajnie niezależnych agregatów. Po inkubacji w identycznych warunkach sprzyjających agregacji dla peptydów FFYTPKA oraz FFYTPKA-Ac zaobserwowano w podczerwieni pasma amid I' położone przy ok. 1645-1650 cm^{-1} , w pozycji charakteryzującej najprawdopodobniej struktury niezagregowane i tylko z niewielkim wkładem od β -kardki przy 1620 cm^{-1} w przypadku FFYTPKA (Rys. 73). Także fluorescencja tioflawiny T dla tych próbek jest bardzo słaba.



Rys. 73 Widma FTIR pasma amid I' oraz fluorescencji po wybarwieniu tioflawiną T (wewnętrzny panel) peptydów FFYTPKA oraz FFYTPKA-Ac. Pomiary fluorescencji wykonano przy stężeniu próbek 0,029 wt. % po rozcieńczeniu buforem o pD 1,9, 0,1 M NaCl z dodatkiem tioflawiny T w stężeniu 40 μ M w kuwecie kwarcowej o grubości 4 mm.

Na podstawie eksperymentów opisanych w rozdziale 4 można uznać, że pomimo iż obydwa łańcuchy A i B insuliny wołowej są zdolne do agregacji to łańcuch B odpowiada za tworzenie się chiralnych superstruktur. Łańcuch A ze względu na dwukrotnie większą ilość grup tiolowych, do tego blisko położonych, ma tendencję do tworzenia amorficznych struktur β -karkowych. 8-aminokwasowy peptyd położony w rejonie sekwencji odpowiadającym za tworzenie się „rdzenia amyloidowego” insuliny nie tworzył chiralnych superstruktur, a więc to nie on odpowiada za taką możliwość konformacyjną. Z kolei przy sprawdzeniu szeregu białek i peptydów pod kątem chiralnej agregacji zostało określone, że taki proces jest obserwowany tylko dla różnych wariantów insuliny. Natomiast w przypadku niebiologicznego analogu lispro o zamienionej kolejności aminokwasów B28 i B29 intensywne właściwości chiralnoptyczne nie były obserwowane. Jako że w białku tym zakłócona jest zdolność do tworzenia dimerów w przeciwieństwie do naturalnie występujących insulin, uznaliśmy że za proces lateralnej asocjacji w struktury chiralne odpowiada C-końcowy fragment łańcucha B zawierający hydrofobowe aminokwasy chętnie tworzące antyrównoległą β -karkę.

4.5 Badania stabilności chiralnych superstruktur w dimetylosulfotlenku jako sposób wnioskowania o poziomie strukturalnym amyloidu, na którym pojawia się chiralny polimorfizm

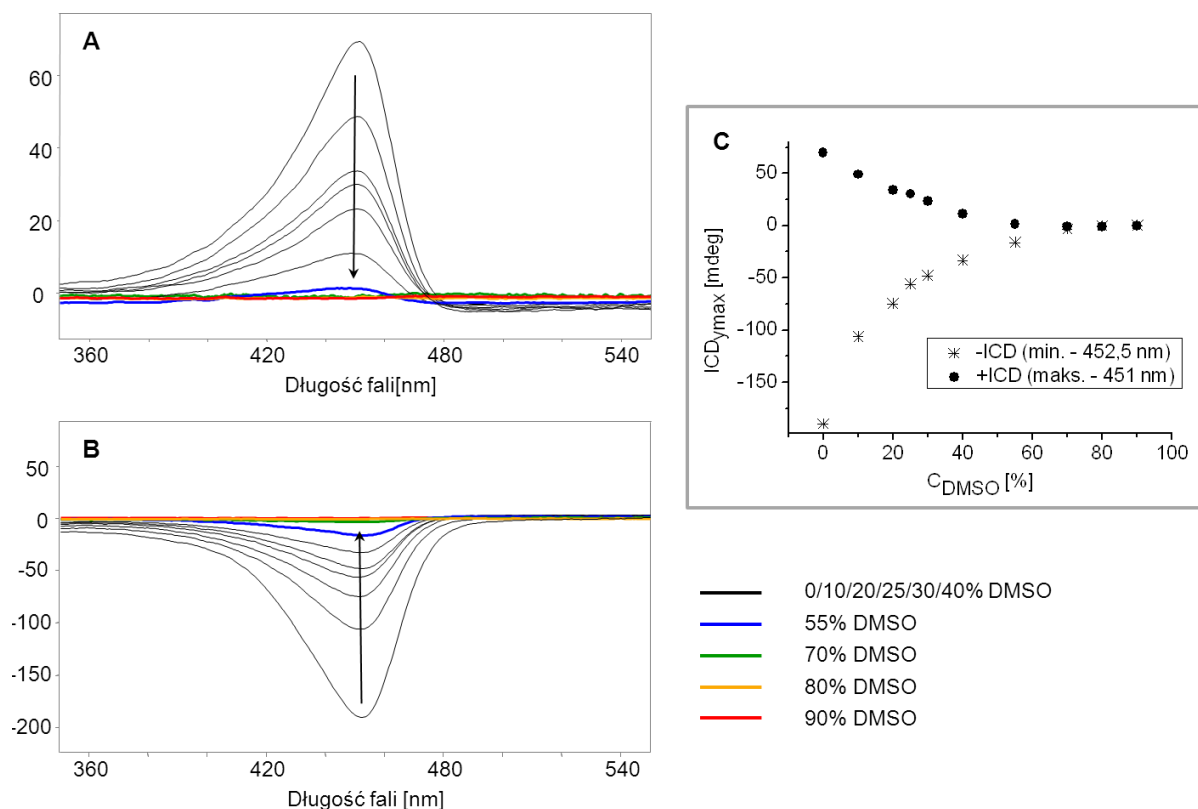
Dimetylosulfotlenek jest silnym denaturantem agregatów białkowych, powodującym rozplecenie struktury β -karkowej do rozpuszczalnej konformacji kłęбка statystycznego [Osserman, 1976]. Dzięki takim właściwościom związek ten jest z powodzeniem stosowany do usuwania złogów amyloidu A w przypadku amyloidozy układowej, szczególnie w przypadku skrobawicy żołądkowo-

jelitowej oraz na wczesnych stadiach niewydolności nerek [Amemori, 2006]. Jest on także wykorzystywany w badaniach białek za pomocą spektroskopii w podczerwieni ze względu na nienakrywanie się pasm pochodzących od DMSO z pasmem amid I/I'. Białkowa struktura zdenaturowana solwatowana przez DMSO charakteryzuje się pasmem amid I' przesuniętym do 1663 cm^{-1} [Jackson, 1991]. Z drugiej strony silna absorpcja w dalekim nadfiolecie uniemożliwia analizę dichroizmu kołowego próbek białkowych potraktowanych DMSO. Rozpuszczalnik ten destabilizuje strukturę białka już w niewielkich stężeniach – 5-25% dodatek DMSO przyspiesza agregację zasiewanej insuliny, natomiast w dużej ilości – przy 75% stężeniu DMSO – agregacja nie zachodzi. Pomiary spektroskopowe amyloidów insuliny rozpuszczanych w DMSO pokazują powstawanie rozpuszczalnych oligomerycznych form β -karkowych przy 75% stężeniu tego rozpuszczalnika – następuje wówczas wyraźny spadek rozpraszania próbki, natomiast pasmo amid I' nadal jest widziane w położeniu charakterystycznym dla β -karkki. Struktury te zachowują zdolność do zasiewania agregacji a po odmyciu DMSO amyloidowa struktura fibrylarna jest w znacznym stopniu odbudowywana. Całkowite rozpuszczenie agregatów zachodzi dopiero przy 90% stężeniu DMSO [Loksztejn, 2009]. Dotychczasowe badania wpływu DMSO na chiralne agregaty ukazują niekooperatywne zmiany charakterystycznych sygnałów spektroskopowych, co sugeruje sukcesywną utratę cech chiralnoptycznych, fibrylarnych oraz struktury β -karkowej [Loksztejn, 2008]. Zastosowanie spektroskopii wibracyjnego dichroizmu kołowego pozwala na przyjrzenie się bezpośredniej chiralności amyloidu, bez tioflawiny T pośredniczącej w uzyskaniu informacji o konformacji próbek.

4.5.1 Dysocjacja chiralnych superstruktur w DMSO

Celem tego eksperymentu jest zbadanie na jakim etapie denaturacji superstruktur zanikają właściwości chiralnoptyczne próbek +ICD/-ICD obserwowane za pomocą spektroskopii VCD i określenie relacji pomiędzy chiralnością amyloidów rejestrowaną jako sygnały VCD oraz jako ICD zewnętrznego znacznika - tioflawiny T.

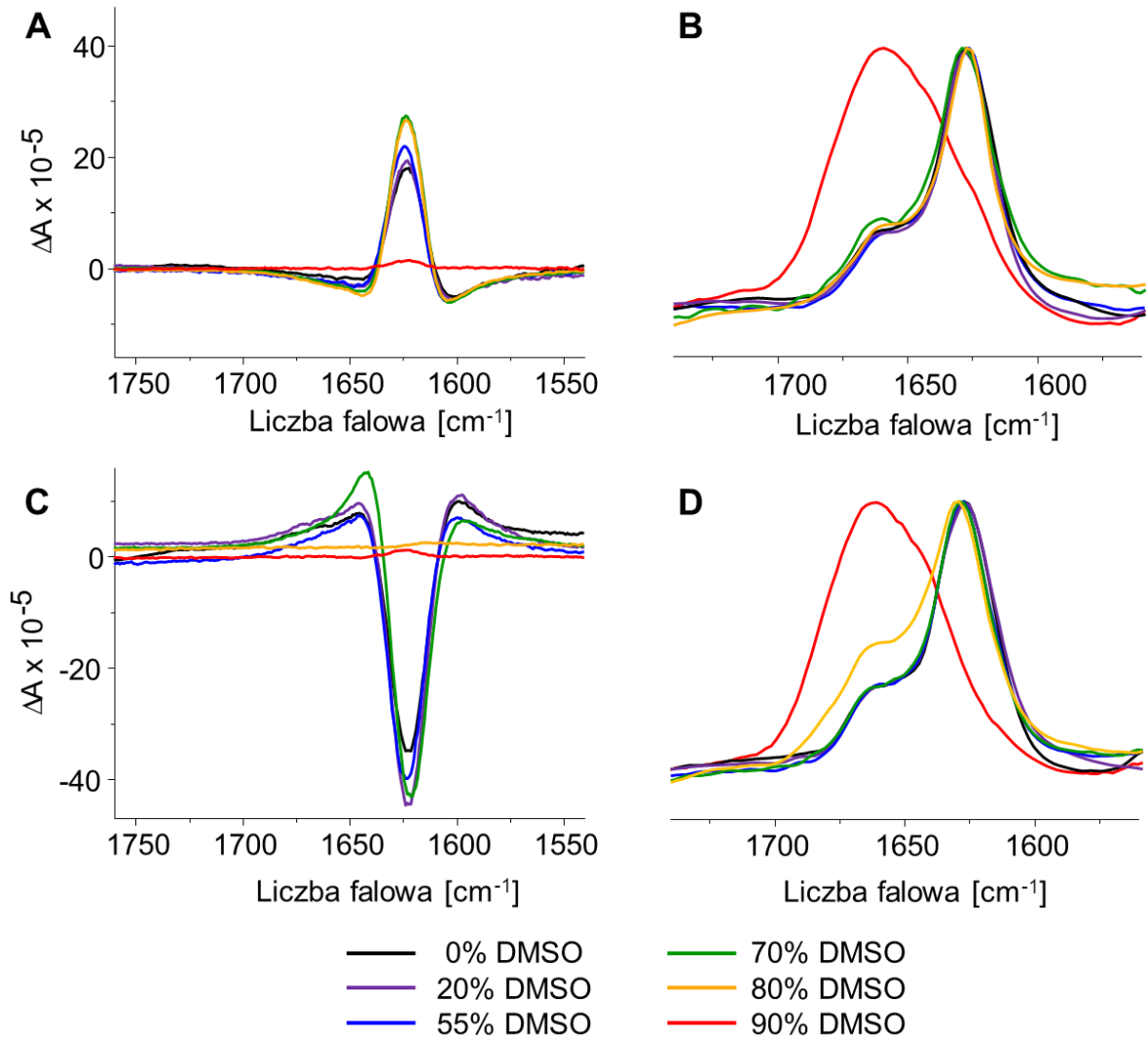
Przygotowano agregaty +ICD oraz -ICD w warunkach wywołujących chiralną bifurkację (1 % insulina wołowa w 0,1 M NaCl, pD 1,9, 48-godzinne wytrząsanie z prędkością 1400 rpm w temp. 40°C). Znak próbek określono za pomocą metody ICD z użyciem tioflawiny T. Przygotowano po 10 roztworów próbek +ICD oraz -ICD o różnych stężeniach DMSO rozcieńczając przy tym białko do stężenia 0,2 wt. %. Aby uniknąć wpływu zmniejszania się siły jonowej roztworu ze względu na coraz większy udział DMSO, niedobór NaCl rekompensowano dodatkiem soli w buforze, a więc stężenie NaCl pozostawało stałe – 0,1 M. Próbki termostatowano w temperaturze 25°C przez 3 dni ze względu na powolne dochodzenie do stanu równowagi w przypadku wysokich stężeń DMSO.



Rys. 74 Zmiana widm ICD po wybarwieniu tioflawiną T próbek typu +ICD (A) i -ICD (B) po dodaniu DMSO w różnych stężeniach. Panel C obrazuje porównanie zmian intensywności sygnału ICD w ekstremum widma dla próbek „+” oraz „-”. Pomiary ICD wykonano bez rozcieńczania (stężenie białka 0,2 wt. %) w kuwecie o grubości 1 mm po dodaniu niewielkiej ilości ThT do stężenia 0,27 mM.

Na rysunku 74 widoczna jest zmiana intensywności sygnałów ICD po wpływie wprowadzania do próbki amyloidu coraz większych ilości DMSO. Początkowo intensywność sygnału zmniejsza się sukcesywnie, przy czym spadek jest widoczny już przy 10% stężeniu DMSO. W 55% DMSO widma tioflawiny T interkalującej zarówno w próbkach typu +ICD jak i -ICD są praktycznie płaskie. Tempo zmian sygnału jest podobne dla próbek „+” oraz „-” (Rys. 74 C). Niezależnie od kompensacji ubytku soli następującego pod wpływem zastąpienia pierwotnego buforu DMSO, tak jak to przeprowadzono w tym eksperymencie, obserwowane jest bardzo podobny przebieg spadku sygnału ICD jak we wcześniej opisanych pomiarach [Loksztejn, 2008].

Spektroskopia VCD, która określa właściwości chiralnoptyczne analizowanego białka na poziomie struktury II-rzędowej, także rejestruje chiralność badanych próbek z analogicznym podziałem na agregaty typu „+” oraz typu „-” (Rys. 75 A i C). Dla próbki +ICD widoczne jest słabe minimum przy 1605 cm^{-1} , intensywne maksimum przy 1624 cm^{-1} oraz kolejne ramię ujemne przy 1645 cm^{-1} . Widmo próbki -ICD jest dość dokładnym odbiciem lustrzanym, łącznie ze wzajemną względną intensywnością poszczególnych ekstremów. Wraz ze zwiększaniem się stężenia DMSO w pomiarach VCD obserwowana jest zupełnie inna dynamika zmian intensywności pików niż w

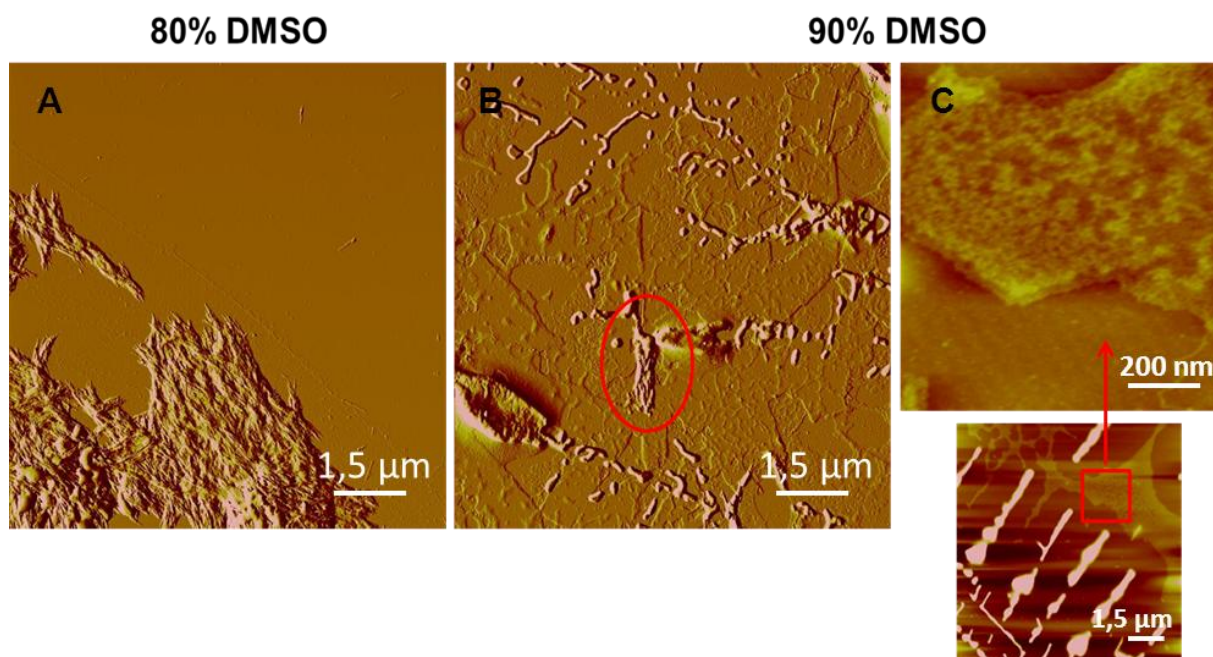


Rys. 75 Zmiana widm VCD i FT-IR próbki typu +ICD (A, B) oraz typu -ICD (C, D) po dodaniu DMSO w różnych stężeniach. Pomiary VCD i FT-IR wykonano bez rozcieńczania (stężenie białka 0,2 wt. %).

przypadku dichroizmu kołowego indukowanego w tioflawinie T. Początkowo, aż do stężenia 55% DMSO nie obserwowane są praktycznie żadne różnice w widmach. Dla próbki -ICD przy 70% DMSO następuje delikatna zmiana wzajemnego stosunku intensywności wszystkich trzech pików. Następnie, przy 90% DMSO dla próbki „+” i 80% dla próbki „-”, zachodzi gwałtowny spadek intensywności sygnału VCD. Oba „końcowe” widma przy 90% stężeniu DMSO charakteryzują się pojedynczym dodatnim pikiem niezależnie od wyjściowego znaku próbki, położonym przy 1625 cm⁻¹ i o niskiej intensywności typowej dla białek globularnych. Można więc sądzić, że dochodzimy do podobnych konformacji końcowych w przypadku obu typów zdenaturowanych chiralnych superstruktur. W podczerwieni dla obu typów agregatów widoczne jest pasmo amid I' z maksimum typowym dla β-kartki – 1624 cm⁻¹. Zmiany w jego położeniu następują dopiero wraz ze spadkiem intensywności sygnału VCD, przy czym dla 80% DMSO w przypadku próbki -ICD widoczne jest widmo „pośrednie”, z wkładami zarówno komponentu od β-kartki jak i charakterystycznego dla konformacji

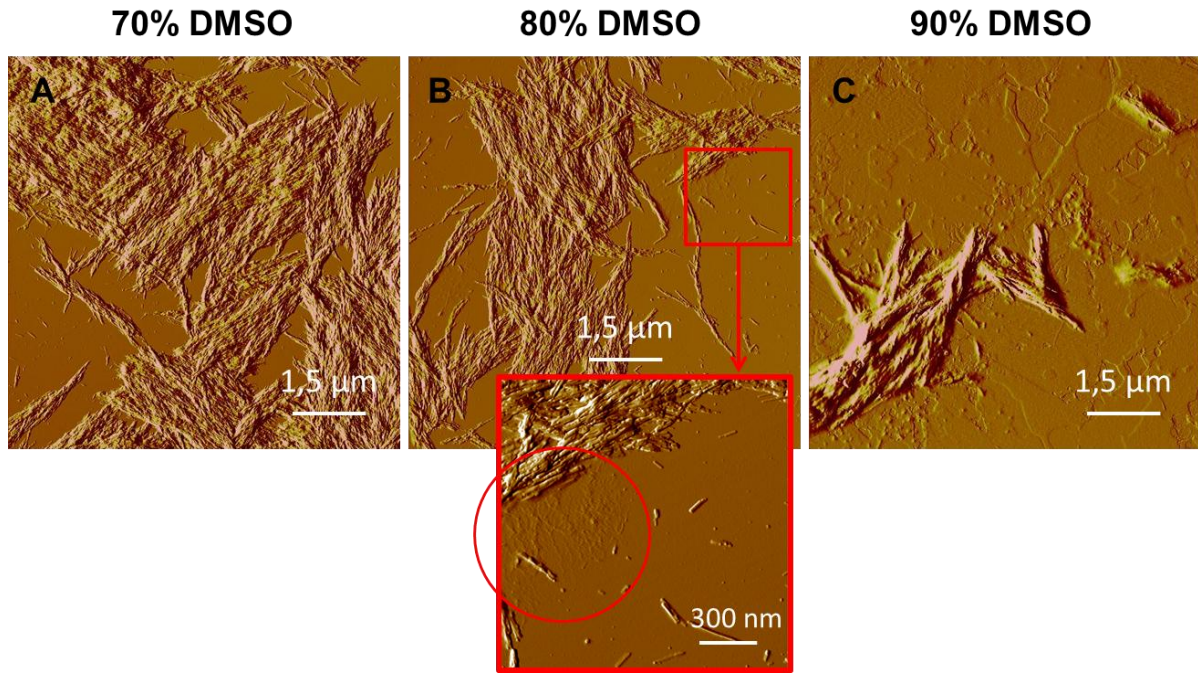
zdenaturowanej. Przy maksymalnym stężeniu DMSO obie próbki charakteryzują się widmami IR typowymi dla kłęбка statystycznego w DMSO z maksimum przy ok. 1663 cm^{-1} [Jackson, 1991]. Rejestrowane dane znacząco różnią się od sygnałów pochodzących od β -karktowych białek globularnych [Keiderling, 2002], natomiast przypominają intensywne widma amyloidów przedstawione przez grupę Nafiego z centralnym intensywnym pikiem położonym w okolicach maksimum absorpcyjnego w IR i mało intensywnymi pikami wokół [Ma S., 2007]. Obserwowany sygnał jest o 1-2 rzędy wielkości intensywniejszy niż w przypadku białek natywnych, ale także niż dla fibryli amyloidowych powstałych z kwasu poliglutaminowego [Fulara, 2011].

Rozpad chiralnych superstruktur zobrazowany został także za pomocą mikroskopii AFM. W przypadku próbki +ICD zwarte skupiska amyloidu są widoczne dopóki sygnał VCD próbki jest intensywny. Przy 90% DMSO można znaleźć już tylko pojedyncze niewielkie zlepki włókien, natomiast powierzchnia miki jest w znacznej mierze pokryta filmem, który najprawdopodobniej zawiera zdysocjowany amyloid (Rys. 76 C). W przypadku próbki -ICD to przy 80% DMSO, gdy następuje już



Rys. 76 Amplitudowe obrazy AFM amyloidu +ICD w obecności 80% DMSO (A) i 90% DMSO (B). Pojedyncze skupisko fibryli na obraz B zaznaczone jest czerwonym okręgiem. Panel C przedstawia wysokościowe obrazy AFM amyloidu zdysocjowanego w 90% DMSO.

spadek sygnału ICD, nadal widoczne są duże skupiska fibryli (Rys. 77 B). Nie są one tak zwarte jak typowe chiralne superstruktury a w ich otoczeniu jest wiele pojedynczych włókien oraz zdenaturowane oligomery insuliny (powiększenie). Dopiero w 90% DMSO, podobnie jak w przypadku +ICD, z rzadka widoczne są skupiska fibryli o powierzchni oklejonej zdenaturowaną insuliną, natomiast powierzchnia miki jest w głównej mierze pokryta amorficznym białkowym filmem.



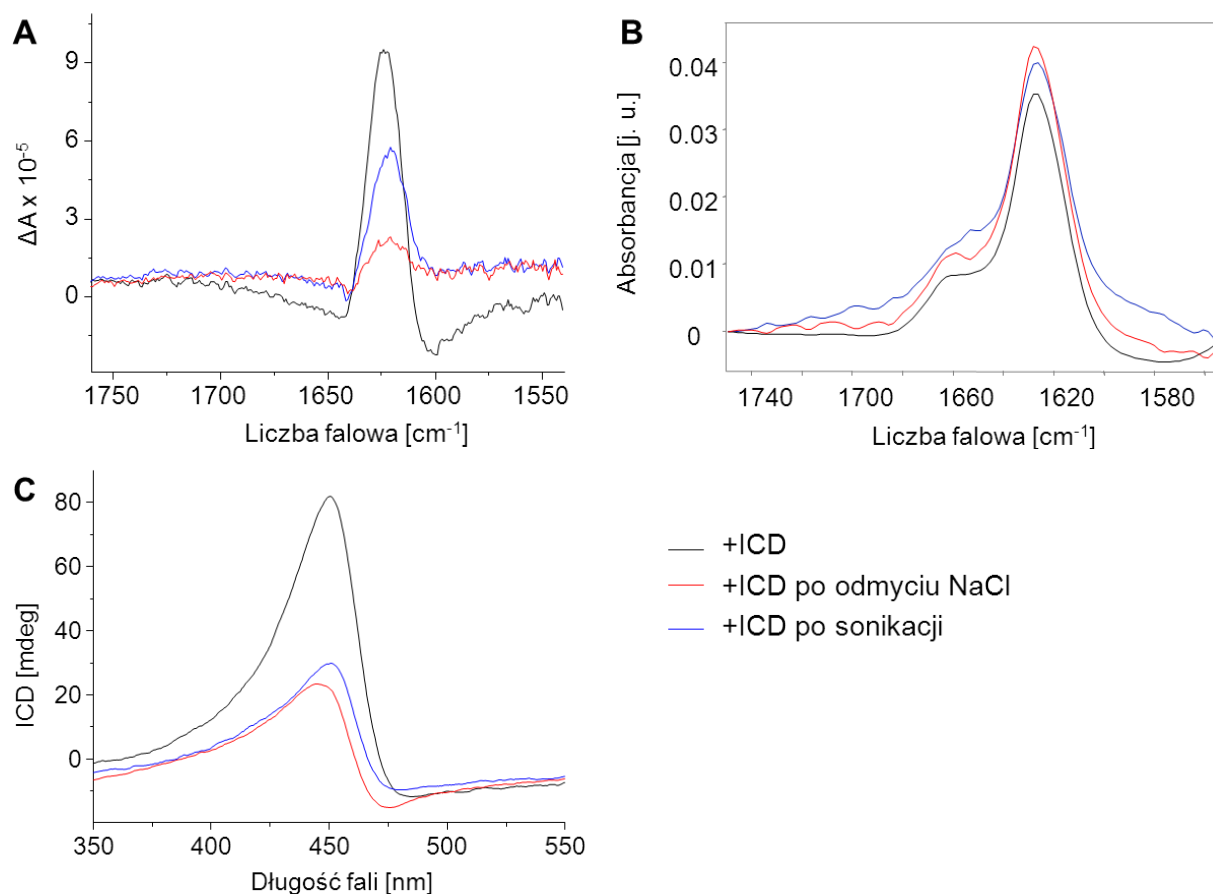
Rys. 77 Amplitudowe obrazy AFM amyloidu –ICD w obecności 70% DMSO (A), 80% DMSO (B) i 90% DMSO (C). Na powiększeniu w czerwonym okręgu widoczne są zdenaturowane oligomery insuliny

Powyższe dane ukazują rozbieżności w rejestracji obecności chiralnych superstruktur i β -kardki w próbce przez metody ICD, VCD, FT-IR i AFM. Sygnał ICD osłabia się bardzo szybko, natomiast intensywne widma VCD są obserwowane przy znacznie wyższych stężeniach DMSO. Dodatkowo agregaty o morfologii typowej dla chiralnych superstruktur są obserwowane aż do 80% stężenia DMSO. Jeśli chodzi o β -kardkę amyloidową – o ile wibracyjny dichroizm kołowy próbki –ICD przy 80% DMSO jest już bardzo słaby, o tyle duży udział β -kardki jest nadal widoczny w FT-IR, jak również skupiska amyloidów można zaobserwować mikroskopowo.

4.5.2 Analiza wpływu sonikacji i wmywania NaCl na stabilność chiralnego agregatu +ICD

Sonikacja przyczynia się do powstania wielu krótkich, połamanych fibryli, natomiast odmycie soli wywołuje rozdzielanie skupisk fibryli na mniejsze asocjaty lub pojedyncze włókna. W ramach tych badań porównano stabilność chiralnych superstruktur rejestrowaną przy pomocy techniki ICD po wybarwieniu tioflawiną T oraz VCD. Pozwoliło to naświetlić relację pomiędzy efektami chiralnooptycznymi obserwowanymi przy użyciu różnych metod.

Próbkę +ICD przygotowano tak jak w eksperymencie 5.1. Próbkę referencyjną oraz próbkę sonikowaną rozcieńczono do stężenia 0,2 wt. % za pomocą buforu o pD 1,9, 0,1 M NaCl. Pulsowa sonikacja trwała 30 sekund. Trzecią porcję amyloidu przemyto dwukrotnie D₂O a następnie rozcieńczono za pomocą D₂O do stężenia 0,2 wt. %.



Rys. 78 Zmiany sygnału VCD (A), IR (B) oraz ICD tioflawiny T chiralnego agregatu typu +ICD pod wpływem sonikacji oraz wymywania NaCl. Pomiary ICD wykonano bez rozcieńczania (stężenie białka 0,2 wt. %) w kuwecie o grubości 1 mm po dodaniu niewielkiej ilości ThT do stężenia 0,27 mM. Pomiary VCD i FT-IR również wykonano bez rozcieńczania

Zarówno sonikacja jak i wymycie NaCl powodują spadek sygnału ICD jak i VCD (Rys. 78). Zmiany te nie są jednakowe – w przypadku ICD dla obu próbek wysokość pików zmniejsza się ok. dwukrotnie, natomiast sygnał VCD ulega większemu spadkowi po sonikacji niż po usunięciu NaCl. Pozycje pików ICD i VCD nie ulegają zasadniczej zmianie, różni się w niewielkim stopniu jedynie wzajemny stosunek intensywności minimów i maksimów. Oba te procesy nie wpływają na położenie i kształt pasma amid I' w IR, a więc można uznać, że geometria β -kartki pozostaje niezmienną.

Charakter widm VCD struktur +/-ICD dowodzi, iż ich chiralooptyczne właściwości manifestują się również w zakresie podczerwieni. Podobnie jak w przypadku dichroizmu kołowego w dalekim nadfiolecie oraz ICD tioflawiny T rejestrowany sygnał jest niezwykle intensywny. Co ciekawe, jego osłabienie następuje dopiero przy 80-90% stężeniu DMSO, a więc dynamika zaniku właściwości chiralooptycznych w przypadku pomiarów VCD jest zupełnie inna niż przy pomiarach ICD, gdzie praktycznie zerowy sygnał jest obserwowany już przy 55% stężeniu DMSO i można sądzić, że te dwie techniki świadczą o właściwościach chiralooptycznych istniejących na różnych poziomach budowy amyloidów. Sygnał VCD jest intensywny tak długo jak w mikroskopii AFM wyraźne skupiska fibryli nie otoczone dużą ilością zdysocjowanego i amyloidu.

5. WNIOSKI

Celem tej pracy było głębsze zrozumienie procesu powstawania chiralnych superstruktur amyloidu insuliny oraz zjawisk chiralooptycznych z tym związanych. Przeprowadzone badania rozpoczęły się od pomiarów ICD tioflawiny T w obecności peptydów w różnych konformacjach w celu lepszego objaśnienia tej metody jako źródła informacji o strukturze białka. Następnie zweryfikowano poprawność uzyskiwanych informacji o chiralności amyloidów i wykluczono artefakty chiralooptyczne. Kolejnym etapem badań było określenie roli różnych czynników sprzyjających chiralnej agregacji insuliny. Główna część pracy eksperymentalnej opierała się na analizie uwarunkowań strukturalnych pozwalających na tworzenie się chiralnych agregatów z insuliny oraz sprawdzeniu możliwości takiej ścieżki asocjacji fibryli innych białek. Dodatkowo określono relację pomiędzy chiralnością badanych próbek stwierdzaną na podstawie pomiaru dichroizmu kołowego zewnętrznego znacznika w zakresie widzialnym oraz na podstawie bezpośredniej analizy sygnałów odbiawkowych w zakresie podczerwieni.

W badaniach ukazujących konformacyjny indukowany dichroizm kołowy tioflawiny T uzyskano dane o kształcie i intensywności widma ICD dla niewielkich struktur amyloidowych - polipeptydów. Jako że sygnał indukowanego dichroizmu kołowego dla tioflawiny T wybarwiającej chiralne superstruktury jest określany jako anomalnie intensywny, była potrzeba określenia czy ta sonda molekularna jest w stanie rozróżniać zwykłą skrętność pojedynczych włókien. W tym celu zbadano ICD fibryli utworzonych z kwasu poli-L i poli-D-glutaminowego. Mają one cechy typowe dla struktur amyloidowych – wzmacniają fluorescencję tioflawiny T i charakteryzują się widmami CD i FT-IR świadczącymi o obecności β -karkki. Analiza izomerycznych polipeptydów dawała jedyną możliwość zbadania fibryli amyloidowych o całkowicie przeciwstawnej geometrii. Widma dichroizmu kołowego zbadanych agregatów w dalekim nadfiolecie mają kształt i położenie ekstremum charakterystyczne dla struktur β -karkkowych, przy czym dla D-polipeptydów ma ono znak dodatni. Ich widma ICD także są w przybliżeniu swoimi odbiciami lustrzanymi. Detekcja znaku indukowanego dichroizmu kołowego tioflawiny T pozwala na klasyfikowanie superstruktur jako „prawo” bądź „lewo” skrętnych. Sygnały te mają intensywność o ok. rząd wielkości mniejszą niż w przypadku próbek +ICD i -ICD. Jest ona zależna od stopnia skręcenia pierścieni aromatycznych względem siebie, jednak pamiętając o wymogach fluorescencyjnej relaksacji należy przypuszczać, że kąt ten nie może być bardzo duży [Stsiapura, 2007]. Dodatkowo, widma te mają intensywność zbliżoną do innych wyników uzyskanych dla układów niewielkich struktur β -karkkowych [Biancalana, 2009] i niezasocjowanych włókien amyloidowych [Kurouki, 2009]. Można stąd wysnuć wniosek, że istotnie, intensywny sygnał ICD w przypadku chiralnych superstruktur jest skutkiem sprzężeń wielu chromoforów w układzie białko barwnik a nie tylko wynikiem sumy sygnałów pojedynczych cząsteczek. Jeszcze jedną ciekawą cechą fibryli zbudowanych z PLGA i PDGA jest brak aromatycznych reszt bocznych w strukturze. Jest to więc

pierwszy przypadek indukowanego dichroizmu tioflawiny T zarejestrowanego dla cząsteczki oddziałującej wyłącznie z rusztowaniem β -karkowym, generując jej fluorescencję przy braku kontaktów π - π . Brak idealnej przeciwstawności zarejestrowanych krzywych sugeruje, że z łańcuchów kwasu poliglutaminowego o długościach określanych przez producenta z pewnym rozrzutem mogą tworzyć się dla formy L oraz D nieco inne struktury. Inną potencjalną przyczyną tych różnic jest niejednakowe rozpraszanie światła przez β_2 -PLGA i β_2 -PDGA.

Bardzo ciekawymi wynikami były widma ICD tioflawiny T oddziałującej z nie- β -karkowymi konformacjami PLGA i PDGA. Sygnał ICD rejestrowano w trakcie przejścia kłębek statystyczny - α -helisa następującego pod wpływem obniżenia pH. Jak się okazało, niezerowe widma ICD są obserwowane zarówno dla konformacji pośrednich jak i form α -helikalnych. Ich intensywność jest zbliżona do intensywności widm dla β -karkowych fibryli z kwasu poliglutaminowego, a więc odpowiada konformacyjnemu dichroizmowi kołowemu. Oddziaływanie tioflawina T – α -helisa PGA widoczne jest nie tylko w widmach ICD, ale także fluorescencyjnie w zmianie intensywności i geometrii pików ekscytacyjnych i emisyjnych. Uwzględniając ładunek polipeptydu w poszczególnych pH można sądzić, że o ile oddziaływanie pomiędzy tioflawiną T a formą pośrednią w pH 6 mogą mieć podłoże elektrostatyczne to w przypadku α -helisy, której grupy boczne są w znacznym stopniu sprotownowane, oddziaływanie z barwnikiem musi odbywać się na zasadzie interkalacji. Przy czym tioflawina T ma w takim kompleksie inną geometrię niż po związaniu się formą β -karkową PDGA, gdyż kształt widma ICD jest inny a fluorescencja bardzo niska. Jest to bardzo istotne, gdyż o ile w przypadku czerwieni Kongo wielokrotnie odnotowywano oddziaływanie tej sondy molekularnej nie tylko ze strukturami amyloidowymi, o tyle tioflawina T określana była jako indykator wyłącznie konformacji β -karkowych. Dotychczas ukazało się tylko jedno doniesienie o tym barwniku w kompleksie z białkiem w stanie natywnym, przy czym był to kompleks fluorescencyjny. Interakcję tioflawiny T z acetylocholinoesterazą przypisano obecności kieszeni w strukturze białka zawierającej kilka grup aromatycznych [De Ferrari, 2001]. Kompleks tego barwnika z α -helikalnym kwasem poliglutaminowym to pierwszy opisany przypadek oddziaływań tioflawiny T ze strukturą białkową przy braku zarówno rusztowania β -karkowego jak i aromatycznych reszt bocznych. Ta obserwacja nie wpływa na interpretację fluorescencji tioflawiny T – tylko kompleksy z amyloidami są wysoce fluorescencyjne, więc można traktować ten barwnik jako dobry indykator agregatów fibrylarnych. Z drugiej strony wyniki te stawiają w innym świetle działanie tioflawiny T w badaniach *in vivo*. W pracy Alaveza i współpracowników określono, że barwnik ten wydłuża czas życia nicieni *Caenorhabditis elegans*, który powiązany może być ze stopniem agregacji białek w tych organizmach [Alavez, 2011]. Autorzy sugerowali, że cząsteczki tioflawiny T imitują reakcję stresową i oddziałują z agregującymi białkami, uruchamiając komórkową odpowiedź na stres a być może nawet propagując powstawanie poprawnie zwiniętych form białka, jednak mechanizmy tych procesów nie zostały wyjaśnione. Interpretacja tych wyników może być jednak zupełnie inna biorąc pod uwagę możliwość

oddziaływania tego barwnika także z nie- β -kartkowymi formami białek wykazaną w moich badaniach (Rys. 43 i 44).

Istotną kwestią w przeprowadzonych badaniach była weryfikacja obserwowanych sygnałów dichroizmu kołowego. Agregaty białkowe stanowią „trudne” obiekty badawcze ze względu na duże rozmiary fibryli i ich nierozpuszczalność. W takich warunkach możliwe jest wystąpienie wielu niepożądanych zjawisk optycznych mających wkład w rejestrowane widma. Poprawność pomiarów CD i ICD została zweryfikowana na kilka sposobów. Pierwszym istotnym wynikiem było zaobserwowanie nienakładania się ekstremów widm absorpcyjnych i dichroizmu kołowego sond molekularnych – tioflawiny T i czerwieni Kongo – związanych z próbkami +ICD i –ICD. Drugą możliwą przyczyną niepoprawnego odczytu chiralności badanych próbek jest wkład dichroizmu liniowego w intensywność i kształt widma dichroizmu kołowego. Taka sytuacja może mieć miejsce w przypadku próbek o makroskopowej anizotropii, a więc na przykład w kryształach. Ze względu na duże rozmiary chiralnych skupisk amyloidu i wzajemne ustawienie fibryli było to potencjalnie możliwe także tutaj. Zmierzone widma LD ciekłych próbek +ICD i –ICD miały bardzo niską intensywność a dichroizm kołowy białka i barwnika nie zmieniał się istotnie przy różnych ustawieniach kuwet pomiarowych. Z kolei przy badaniach filmów amyloidowych utworzonych na szkiełku CaF_2 dichroizm liniowy miał znacznie większy wkład w intensywność sygnału ICD, jednak nawet przy tak silnym zorientowaniu superstruktur amyloidowych znak efektu Cottona nie był zależny od znaku LD. Inną cechą próbek, która może wpłynąć na odczyt sygnału dichroizmu kołowego jest dwójłomność. Jak wiadomo, zjawisko to zachodzi dla kulistych struktur amyloidowych – sferulitów. Za pomocą mikroskopii optycznej została porównana dwójłomność próbek zawierających sferulity oraz chiralne superstruktury. W pierwszym przypadku zaobserwowano charakterystyczne obrazy krzyża maltańskiego, natomiast w drugim obrazy uzyskane przy skrzyżowanych polaryzatorach były praktycznie czarne, a więc dla próbek +ICD i –ICD nie zaobserwowano wyraźnego podwójnego załamania światła. Dodatkowo, we współpracy z grupą profesor Reiko Kurody, sprawdzono inny możliwy przejaw aktywności optycznej próbek – dwójłomność kołową. Pomiar różnicy w refrakcji światła spolaryzowanego kołowo w prawo i w lewo umieszczony w tej pracy [Babenko, 2011] wykazał, że dwójłomność kołowa chiralnych superstruktur jest obserwowana, lecz nie wpływa na znak sygnału CD i ICD tioflawiny T. Widma chiralnych próbek oczyszczone z wkładów innych efektów optycznych zachowują swój kształt. Kolejna cecha roztworów zawierających amyloidy typu +ICD i –ICD to silne rozpraszanie wynikające z dużych rozmiarów skupisk fibryli. To zjawisko także może wpłynąć na niepoprawny odczyt dichroizmu kołowego [Bustamante, 1983]. Wpływ rozpraszania został zbadany poprzez analizę sygnału CD amyloidów i ICD tioflawiny T z nimi związanej w roztworach o współczynniku załamania zbliżonym do wartości dla fibryli amyloidowych. Podobne podejście było stosowane wcześniej także w innych układach badawczych w celu weryfikacji poprawności widm CD, zarówno w pomiarach filmów amyloidowych przeprowadzonych na szkiełku z

fluorku wapnia [Kondo, 1991], jak i w roztworze [Husband, 2001]. Pomiar w salicylanie metylu oraz glicerolu wykazały, że pomimo pewnych zmian kształtu i intensywności widm CD oraz ICD, znak rejestrowanego sygnału jest niezmienny. Wszystkie te badania oznaczają przede wszystkim, że odczyt dwóch przeciwnych chiralności próbek jest poprawny, a więc nawet nieoczekiwane dodatnie widma dichroizmu kołowego w dalekim nadfiolecie są przejawem rzeczywistej chiralności uzyskiwanych z insuliny struktur amyloidowych.

Zgodnie z tym, co określono już we wcześniejszych pracach, chiralne superstruktury amyloidowe mogą powstawać tylko w ściśle określonych warunkach: w niskim pH/pD, w obecności NaCl i w trakcie intensywnego mieszania. Następny etap doktoranckich badań eksperymentalnych opierał się na analizie wpływu szeregu czynników fizykochemicznych na przebieg agregacji i asocjacje fibryli w skupiska chiralne. Przeanalizowano szczegółowo rolę chlorku sodu w agregacji i asocjacji fibryli amyloidowych. Przede wszystkim wpływa on na szybkość agregacji, gdyż przeciwny umożliwiają zbliżanie się do siebie naładowanych w niskim pH cząsteczek przyspieszając w ten sposób nukleację zarodków i zmieniając zasadniczą kinetykę agregacji. Ekranowanie ładunku białka jest istotne zarówno przy inicjacji agregacji jak i w trakcie tworzenia się fibryli – nawet przy braku wpływu sił hydrodynamicznych przyczynia się ono do wykształcania się zwartych skupisk krótkich fibryli widocznych na obrazach mikroskopowych. Można więc sądzić, że w wysokim stężeniu NaCl znacznie przyspieszona jest nukleacja zarodków. Pamiętając o nachyleniu krzywych kinetycznych dla insuliny agregującej w różnych stężeniach NaCl należy się spodziewać, że elongacja w 60°C przy 100 czy 200 mM NaCl także jest szybsza, tyle że zachodzi na dużo większej ilości zarodków. Ze względu na ekranowanie ładunku białka korzystniejsza energetycznie jest także asocjacja włókien i potencjalna lateralna agregacja i w efekcie powstają skupiska krótkich fibryli. Co więcej, już utworzone pojedyncze włókna także mogą zostać splecione w wysokich stężeniach chlorków. Taki dodatek soli do dojrzałych fibryli nie zmienia znacząco struktury β -kartki amyloidowej, gdyż widma FT-IR są praktycznie jednakowe, aczkolwiek pewne różnice w intensywności komponentów pasma amid I' są widoczne przy wyższych stężeniach NaCl. Co więcej, amyloidy te w obecności wysokich stężeń NaCl (100 i 200 mM) mają wyraźny dodatni sygnał ICD, a więc jak się okazuje cechy chiralne mogą zostać nadane skupiskom włókien po pierwotnej agregacji i nie tylko w trakcie mieszania próbki. Przypuszczalnie mają one pochodzenie podobne jak w przypadku typowych struktur typu +ICD/-ICD, jednak nie można wykluczyć, że ten sygnał ICD pochodzi od prostego skręcenia fibryli, jako że znany jest przypadek fibryli amyloidowych charakteryzujących się zbliżonymi widmami FTIR lecz różnymi cechami chiralnymi [Kurouki, 2012b]. Zmiana skrętności fibryli i liczby protofibryli związanych ze sobą pod wpływem zwiększającej się siły jonowej była obserwowana wcześniej w pracy Adamcika i Mezzengi [Adamcik, 2011]. Zaproponowali oni, że przy niskiej sile jonowej oddziaływania elektrostatyczne są silne, więc tworzą się cienkie silnie skręcone włókna. Przy wysokiej sile jonowej ekranowanie potencjału elektrostatycznego prowadzi do relaksacji zwojów, co umożliwia

powstawanie grubszych splotów o większych odległościach pomiędzy punktami skręcenia. Interpretacja może być poprawna także dla procesu powstawania skupisk fibryli o wyraźnym ICD.

Dalsze wyniki w pracy ukazują jak warunki mieszania/NaCl wpływają na morfologię powstającego amyloidu. Bez mieszania i przy braku NaCl powstają długie pojedyncze fibryle. Jeżeli do roztworu agregującej insuliny dodamy sól, spowoduje to tworzenie się zwartych skupisk dużo krótszych fibryli. Z kolei intensywne wytrząsanie przy braku NaCl nie pozwala na tworzenie się długich włókien ze względu na ścinający przepływ hydrodynamiczny. Agregat taki jest jednak dość rozproszony przy braku ekranowania ładunku białka. Dopiero udział obu tych parametrów pozwala na wykształcenie się dość długich włókien splecionych w chiralne superstruktury wykazujące intensywne cechy chiralooptyczne. Czynniki te wpływają także na strukturę tworzącej się β -kartki – typy fibryli utworzone przy różnym ich doborze cechują się inną energią drgań grupy amidowej widoczną we FT-IR.

Następnie sprawdzono wpływ różnego doboru parametrów fizykochemicznych na wynik agregacji w warunkach sprzyjających powstawaniu superstruktur chiralnych typu –ICD. Agregacja prowadząca do powstania skupisk fibryli zachodzi tylko w wąskim zakresie stężeń NaCl (0,1-0,2 M). Zbyt mały dodatek soli prowadzi do powstania struktur o zerowym ICD, z kolei nadmiar przyczynia się do obniżenia intensywności ICD odnotowywanej dla próbki, co jest najprawdopodobniej związane z wysalaniem białka i przebiegiem agregacji przy rzeczywistym dużo niższym jego stężeniu. Zweryfikowano także, czy chiralna agregacja jest możliwa przy wykorzystaniu soli o innym kationie w miejsce Na^+ . Poszczególne kationy charakteryzują się innym położeniem w szeregu Hofmeistera, a więc mogą wpływać stabilizująco bądź destabilizująco na białko natywne, mają także inne promienie jonowe. Niezależnie od rodzaju wykorzystanej soli powstają struktury chiralne, nawet przy tak silnym czynniku chaotropowym jak GdnH^+ . Także duży promień jonowy kationów, które w roztworach agregującego białka towarzyszą anionom nie wyklucza chiralnej agregacji. Analogię można odnaleźć w pracy Buella, gdzie różne jednowartościowe kationy w solach chlorkowych nie zmieniały szybkości elongacji włókien amyloidowych insuliny [Buell, 2013].

Wiedząc, że obecność anionów jest niezbędna do chiralnej agregacji insuliny przebiegającej w niskim pH, przeanalizowano także możliwość tworzenia się takich superstruktur w obecności innych jonów niż chlorkowy: SO_4^{2-} oraz jon octanowy. Zweryfikowano także skutki obecności w roztworze rozpuszczalników wpływających w charakterystyczny sposób na stabilność białek. Zawartość dowolnej soli w próbce insuliny agregującej w odpowiednich warunkach gwarantuje utworzenie się chiralnej superstruktury, a więc nie tylko chlorki pozwalają na taki przebieg tego procesu. Intensywność sygnału ICD w przypadku takich modyfikacji jest nieco niższa niż dla standardowych próbek +ICD/–ICD. Inne aniony mogą powodować zmianę znaku otrzymywanych agregatów, tak jak to ma miejsce w dla próbki zawierającej 20% kwas octowego i 0,1 M octanu sodu, co może być skutkiem zarówno wpływu soli jak i rozpuszczalników.

Dodatkowym parametrem istotnym dla przebiegu chiralnej agregacji jest pH/pD roztworu. Jest ono niskie, aby możliwa była wstępna dysocjacja heksamery insuliny na dimery i monomery, co pozwala na szybki przebieg procesu. Zweryfikowano czy wartość pD próbek agregującej insuliny ma wpływ na właściwości otrzymanego amyloidu. Niezależnie od jego wartości (1,5 bądź 2,5) wykształcają się superstruktury o tym samym znaku ICD. Wynik ten jest ciekawy w kontekście badań Kurouskiego i współpracowników, którzy zauważyli tworzenie się fibryli insuliny o innej chiralności w zależności od pH roztworu – w pH 2,4-3,2 obserwowali oni włókna lewoskrętne, natomiast w pH 1.1-2.1 najprawdopodobniej składały się one z protofibryli prawoskrętnych [Kurouski, 2012b]. W przypadku badań przeprowadzonych w ramach tej pracy sytuacja jest o tyle inna, że agregacja nie przebiegała z udziałem mieszania. Dla chiralnych superstruktur proces jest znacznie szybszy i związany z udziałem bocznego sklejanie się i potencjalnej lateralnej agregacji możliwym dzięki siłom hydrodynamicznym. W tej sytuacji zrozumiałe jest, że inny może być wpływ pH na agregację pojedynczych włókien a inny na powstawanie chiralnych superstruktur.

Analiza różnych czynników fizykochemicznych wpływających na przebieg chiralnej agregacji pozwoliła określić ich rolę w tym procesie. Podstawowe warunki, które należy spełnić to obecność w roztworze dowolnych anionów w określonym stężeniu zapewniających ekranowanie ładunku białka oraz intensywne mieszanie roztworu. Co ciekawe, drobne różnice w składzie roztworu takie jak inna sól chlorkowa bądź obecność kwasu octowego i octanu sodu mogą wpłynąć na proces chiralnej agregacji powodując zmianę znaku ICD otrzymanej próbki, a więc nie tylko temperatura agregacji decyduje o typie tworzącej się superstruktury. Powstawanie asocjatów przypominających właściwościami chiralne superstruktury możliwe jest także na innej ścieżce, przy wykorzystaniu dojrzałych, długich fibryli przeniesionych do roztworu zawierającego chlorek sodu w odpowiednim stężeniu. Wydaje się więc, że chiralne superstruktury są stabilną formą polimorficzną dla insuliny agregującej przy ekranowanym ładunku białka.

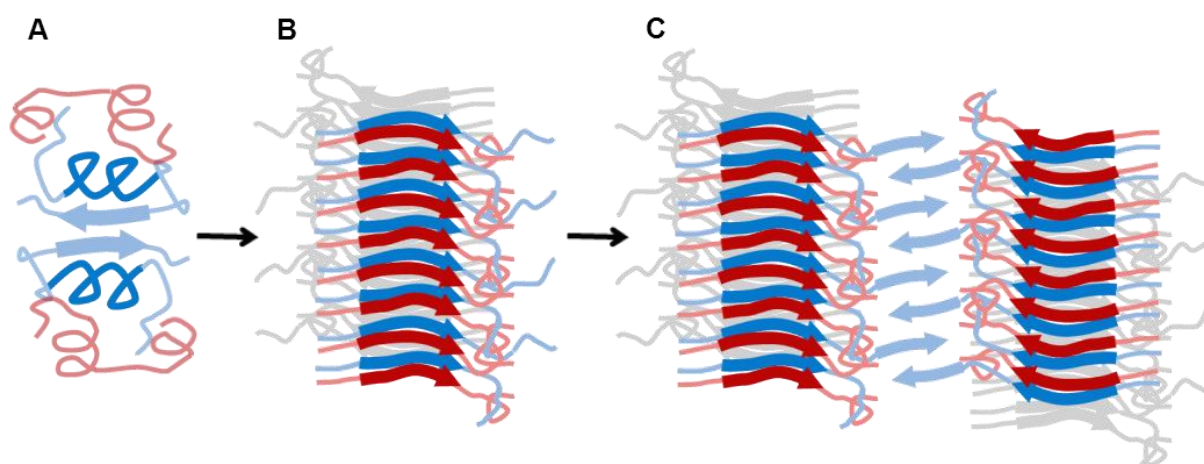
Dotychczas chiralne superstruktury zostały zaobserwowane jedynie dla insuliny. Następnym istotnym elementem badań prowadzonych w ramach tej pracy doktorskiej było określenie czy jest to jedyne białko, które jest zdolne agregować w taki sposób, a jeśli tak to jakie są tego uwarunkowanie na poziomie sekwencji aminokwasowej. Jako że insulina składa się z dwóch łańcuchów połączonych dwoma mostkami dwusiarczkowymi, zweryfikowano skutki agregacji rozdzielonych łańcuchów aby ocenić który z nich odpowiada za taki przebieg procesu. Eksperymenty przeprowadzono także w obecności środka redukującego, który miał zapewnić brak możliwości tworzenia się potencjalnych przypadkowych mostków dwusiarczkowych, w wariantach z mieszaniem oraz bez. Kontrolnie zbadano zachowanie natywnej insuliny w takich warunkach oraz równomolowej mieszaniny oddzielonych łańcuchów A i B. Łańcuch B tworzy fibryle we wszystkich warunkach, lecz są one bardziej giętkie niż typowe włókna insulinowe i nie mają tendencji do asocjacji w obecności NaCl przy braku mieszania. Rozrzut ich średnic wyznaczony w oparciu o dane AFM jest relatywnie niewielki.

Podobne zjawisko zostało zaobserwowano w przypadku włókien powstałych z łańcucha B z cysteinami zabezpieczonymi grupami sulfonowymi [Devlin, 2006]. Agregaty przypominające chiralne struktury tworzą się w obecności mieszania wyłącznie z łańcucha B i charakteryzują się dość wyraźnymi ujemnymi widmami ICD tioflawiny T. Także na obrazach mikroskopowych przypominają one typowe duże skupiska chiralnych agregatów. Jest to ciekawe o tyle, że głównie aminokwasom zawartym w łańcuchu B przypisuje się także rolę w nukleacji zarodków agregacji [Nielsen, 2001b]. Łańcuch A ma tendencję do amorficznej agregacji i nie ma w warunkach eksperymentu zdolności do tworzenia struktur fibrylarnych bez pomocy łańcucha B. Także we wcześniejszych eksperymentach fibryle utworzone z łańcucha A z zabezpieczonymi grupami tiolowymi miały tendencję do tworzenia grubszych splotów o mniej wyraźnym i jednolitym stopniu skręcenia, jak również amorficznych agregatów [Devlin, 2006]. Jeśli chodzi o różnice we właściwościach fizykochemicznych pomiędzy dwoma łańcuchami insuliny to łańcuch A zawiera 4 cysteiny, które mogą się utleniać i jeden ładunek dodatni na N-końcu, natomiast w łańcuchu B są 2 cysteiny i 5 grup naładowanych dodatnio w pH 1,9. Dodatkowo łańcuch B zawiera więcej zwartych skupisk hydrofobowych aminokwasów niż łańcuch A. Można więc stwierdzić, że morfologia agregatów tworzonych przez te łańcuchy peptydowe jest wypadkową ich ładunków, hydrofobowości oraz ilości wolnych grup –SH. Zastosowanie mieszaniny łańcuchów A i B nie pozwala na odtworzenie procesu agregacji insuliny. Pod nieobecność reduktora pierwotne mostki nie odtwarzają się samoistnie a ich brak powoduje wykształcanie się innego typu β -kardki i innych struktur amyloidowych. Wydaje się, że pod nieobecność mieszania dwa łańcuchy agregują niezależnie i co najwyżej skleją się ze sobą powierzchniowo, natomiast w obecności mieszania łańcuch A wręcz przeszkadza łańcuchowi B w wytworzeniu skupisk przypominających chiralne superstruktury – dla próbki wytworzonej przy braku mieszania i w obecności reduktora sygnał ICD jest zaniedbywalnie słaby. Porównując agregaty powstałe z insuliny wołowej oraz z mieszaniny rozdzielonych łańcuchów A i B bez mieszania można zauważyć interesującą prawidłowość – w niskim pH i w obecności 0,1 M NaCl to łańcuch A odpowiada za typowe dla insuliny sklejanie się włókien. Jeżeli pod nieobecność mieszania łańcuch B agreguje niezależnie, co ma miejsce także w przypadku mieszaniny obu peptydów, to powstające włókna są pojedyncze. Dopiero udział sił hydrodynamicznych przyczynia się do zbliżania się fibryli do siebie i równoległego ich łączenia się. W przypadku natywnej insuliny asocjacja fibryli zachodzi nawet przy braku wytrząsania. Dodatkowo z tych badań wyłania się ciekawy wniosek. Jak dotychczas zaobserwowano, agregacja insuliny jest bardzo czuła na warunki fizykochemiczne i białko to tworzy z łatwością wiele różnych odmian polimorficznych. Przyczyną takiego zjawiska może być obecność dwóch łańcuchów o tendencji do tworzenia innego typu struktur amyloidowych. Morfologia powstających włókien jest więc niejako kompromisem dla obydwu łańcuchów i stąd może wynikać łatwość tworzenia się różnorodnych polimorfów.

Dzięki eksperymentom na rozdzielonych łańcuchach A i B określono, że zdolność do tworzenia chiralnych agregatów ma tylko łańcuch B. Następnym krokiem była analiza agregacji w warunkach sprzyjających powstawaniu struktury typu -ICD peptydu LVEALYLV – fragmentu sekwencji łańcucha B znajdującego się w obszarze określonym jako rdzeniowy dla włókien amyloidowych insuliny [Ivanova, 2009]. W tych warunkach peptyd ten tworzy struktury określane jako krystality – duże słupkowe obiekty o wyglądzie przypominającym kryształy, a więc o prawdopodobnym wysokim stopniu uporządkowania. Ich sygnał ICD po wybarwieniu tioflawiną T z maksimum przy ok. 460 nm jest dość słaby, więc najprawdopodobniej ma konformacyjne pochodzenie. Można więc stwierdzić, że peptyd rdzeniowy pomimo swej podatności do tworzenia β -kartkowych włókien nie wystarcza do utworzenia chiralnych superstruktur. Co ciekawe, krystality LVEALYLV zbudowane są z antyrównoległej β -kartki w przeciwieństwie do agregatów tego peptydu uzyskanych przez grupę Eisenberga w nieco innych warunkach eksperymentalnych. Aby sprawdzić który fragment łańcucha B odpowiada za chiralną agregację zbadano kilka innych analogów insuliny różniących się od insuliny wołowej aminokwasami na różnych pozycjach. Dodatkowo zweryfikowano zdolność do tworzenia struktur typu +ICD/-ICD przez inne białka i polipeptydy, aby określić czy jest to cecha charakterystyczna wyłącznie dla insuliny. Amyloidy powstałe z lizozymu z jaja kurzego, wołowej α -laktoalbuminy oraz kwasu poli-L-glutaminowego charakteryzują się bardzo słabym sygnałem ICD po wybarwieniu tioflawiną T, natomiast wszystkie amyloidy powstałe z naturalnie występujących insulin wykazują właściwości chiralne. Jedynym wariantem insuliny o sygnale ICD bliskim zeru jest analog lispro o zamienionej kolejności aminokwasów: Lys^{B28} i Pro^{B29}. Nie tworzy on dimerów, gdyż C-końcowy fragment łańcucha B nie może przy takim podstawieniu utworzyć hydrofobowej powierzchni kontaktu. Można z tego wnioskować, że fragment sekwencji łańcucha B insuliny odpowiedzialny za tworzenie się dimerów umożliwia chiralną agregację. Sprawdzono więc dodatkowo wpływ 7-aminokwasowego końcowego peptydu na przebieg chiralnej agregacji, co miało na celu określenie czy może on konkurować z natywnymi cząsteczkami insuliny w tworzeniu stref kontaktu z C-kończącą sekwencją bądź też przeciwnie, wspomagać ten proces. Peptyd FFYTPKA nie zakłócał przebiegu chiralnej agregacji, a jedynie w wersji acylowanej nieco porządkował jej przebieg – wszystkie otrzymane superstruktury charakteryzowały się praktycznie identycznymi kształtami widm FT-IR oraz fluorescencji i ICD tioflawiny T. Analizując otrzymane wyniki warto wyjaśnić właściwości C-końcowej części łańcucha B. Nie jest ona najprawdopodobniej sekwencją kluczową dla budowy β -kartki amyloidowej, aczkolwiek odgrywa ważną rolę w procesie agregacji insuliny. Fragment ten jest niezwykle elastyczny w natywnym białku, co jest widoczne zarówno w badaniach krystalograficznych [Derewenda, 1989] jak i NMR [Hua, 1991] i musi ulec dyslokacji w celu inicjacji agregacji. Insulina skrócona o 5 bądź 8 końcowych aminokwasów łańcucha B agreguje szybciej, natomiast proinsulina o połączonych łańcuchach A i B, a więc niskiej mobilności tego fragmentu – znacznie wolniej [Brange, 1987]. Zarówno starsze jak i najnowsze modele β -kartki amyloidowej insuliny nie lokalizują

precyzyjnie C-końca łańcucha B [Brange, 1997; Jimenez, 2002; Ivanova, 2009]. Można więc sądzić, że hydrofobowy C-końcowy fragment łańcucha B w trakcie chiralnej agregacji przybiera nową rolę, działając jak „molekularny rzep”, lecz zamiast dwóch monomerów łącząc oddzielne włókna. Interesujące jest to, że przy pojedynczym łańcuchu B efekt ten jest słabszy – prawdopodobnie przy braku łańcucha sekwencja ta ma większą zdolność do układania się w obrębie jednej fibryli. Udział tego fragmentu białka w chiralnej agregacji jest o tyle ciekawy, że jest on istotny w wielu procesach. Pierwotnie odpowiada on za hydrofobowy kontakt pomiędzy monomerami. Zgodnie z najświeższymi doniesieniami związanie się insuliny z receptorem insulinowym wiąże się z odsunięciem C-końcowego fragmentu od reszty molekuly hormonu [Menting, 2013]. Podobny proces zachodzi także w trakcie inicjacji agregacji insuliny. Nowo odkryta rola C-końcowego fragmentu łańcucha B może być pomocna w wyjaśnianiu mechanizmów także innych procesów, w których bierze on udział.

Na podstawie wniosków wyciągniętych na podstawie tych eksperymentów oraz prac grupy Eisenberga opisujących strukturę włókien amyloidowych insuliny można zaproponować hipotetyczny model wyjaśniający powstawanie chiralnych superstruktur amyloidowych (Rys. 79).



Rys. 79 Model oddziaływań międzyfibrilarnych w obrębie chiralnej superstruktury wyjaśniający rolę C-końcowego fragmentu łańcucha B. Natywny dimer insuliny (A), pojedyncze włókno (B), fibryle połączone za pomocą C-końcowych fragmentów łańcucha B. C-końcowy fragment łańcucha B zaznaczono jasnyniebieskimi strzałkami, peptyd rdzeniowy ciemnoniebieskimi strzałkami, natomiast łańcuch A kolorem czerwonym.

Badania te świadczą o tym, że białko powinno mieć pewne cechy, aby chiralna agregacja była możliwa. Najprawdopodobniej musi ono tworzyć oligomery w stanie natywnym, a do tego fragment sekwencji odpowiadający za ten proces nie może być wcielony w rdzeń amyloidowy. Z powodu tych warunków powstawanie chiralnych superstruktur może być zjawiskiem rzadkim. Dodatkowo warto podkreślić, że już niewielkie różnice w sekwencji białka – tak jak w przypadku fragmentu A6-A11 insuliny ograniczonego z dwóch stron przez mostki dwusiarczkowe – mogą wpływać na przebieg chiralnej agregacji, czego skutkiem w przypadku insuliny ludzkiej i wieprzowej jest odwrócenie znaku sygnału ICD. Najprawdopodobniej jest za to odpowiedzialny aminokwas w pozycji A8, znajdujący się

na powierzchni monomeru natywnej insuliny. Treonina występująca w miejscu alaniny w insulynie ludzkiej i wieprzowej decyduje o dłuższym czasie nukleacji tych dwóch analogów, gdyż jest bardziej polarnym aminokwasem, natomiast w przypadku aminokwasu w pozycji A10 nie zauważono takiej zależności [Nielsen, 2001b]. Tak więc właściwości chiralnych agregatów powstających z różnych wariantów insuliny mogą zależeć zarówno od lokalnej geometrii skrętu w obrębie łańcucha A nadanej przez cechy aminokwasu A8 jak i czasu inkubacji przed nukleacją.

Ostatnie ważne pytanie stawiane w tej pracy w kwestii chiralnych superstruktur amyloidowych powstających z insuliny dotyczy wyjaśnienia przyczyn ich chiralności i poziomu budowy tych obiektów, na którym się ona objawia. W tym celu agregaty te zostały zbadane przy pomocy techniki wibracyjnego dichroizmu kołowego. Eksperyment polegał na rejestracji sygnałów próbek +ICD i -ICD zawierających coraz wyższe stężenia DMSO, w którym struktury amyloidowe sukcesywnie dysocjują. Pierwszą ciekawą informacją uzyskaną w ich toku był odczyt dodatniego pików dla próbki „+” oraz ujemnego dla próbki „-” przy 1624 cm^{-1} , co oznacza że właściwości chiralne tych amyloidów są widziane także na poziomie konformacji głównego łańcucha polipeptydowego. Widma te w przybliżeniu są swoimi odbiciami lustrzanymi i mają bardzo dużą intensywność. Dodatkowo przeanalizowano zmianę właściwości chiralnooptycznych próbki +ICD pod wpływem sonikacji i wymywania NaCl widzianych za pomocą technik VCD i ICD. Równie intensywne widma VCD zarejestrowano po raz pierwszy dla amyloidów przez Ma i współpracowników [Ma S., 2007], co zainspirowało Measeya i współpracowników do przeprowadzenia analizy wyjaśniającej nieoczekiwane silne wzmocnienie sygnału. Pomiarów dla krótkich peptydów oraz symulacje komputerowe widm zawarte w tej pracy wskazują, że na intensywność sygnału VCD wpływa geometria β -kartki (równoległa/antyrównoległa), jej długości oraz odległość pomiędzy poszczególnymi kartkami. Najintensywniejsze sygnały VCD są oczekiwane w przypadku długich skręconych fibryli o dużych odległościach międzykartkowych i równoległym układzie łańcuchów tworzących β -kartkę [Measey, 2011]. To podejście tłumaczy zaprezentowany tu szybki spadek sygnału VCD wywołany sonikacją próbki, czyli skróceniem fibryli. Najprawdopodobniej odmycie NaCl powoduje mniejszą zmianę w widmie, gdyż zmienia się wielkość sprzężonego układu, natomiast włókna nie są łamane. Według pracy Measeya i współpracowników znak dubletu zależy od kierunku skręcenia β -kartki, a niekiedy także od liczby kartek tworzących włókno. Tłumaczą oni powstanie dubletu w widmach VCD, jednak nie wyjaśniają obserwowanej asymetrii w geometrii pików, tak jak miało to miejsce we wcześniejszych pomiarach VCD amyloidów oraz w wyżej opisanych eksperymentach. Mogłaby ona być wywołana nieregularnościami w strukturze włókien. W przypadku długich fibryli mamy do czynienia w układem wielu prawie zdegenerowanych oscylatorów o wysokiej gęstości stanów ekscytonowych. Zaburzenia geometrii takiego systemu mogą prowadzić do szerszej dystrybucji intensywności.

Przy zastosowaniu coraz większych stężeń DMSO chiralność superstruktur widziana jako intensywny sygnał VCD jest rejestrowana aż do dysocjacji amyloidu obserwowanej także mikroskopowo (80-90% DMSO). Rozbicie superstruktury amyloidowej i denaturacja β -kartki pod wpływem DMSO skutkuje słabym sygnałem VCD o intensywności typowej dla niewielkich struktur białkowych. Zmiany sygnałów VCD oraz ICD nie są kooperatywne. Mogą być dwie przyczyny takiego zjawiska. Jedną jest rejestracja chiralności na różnych poziomach budowy amyloidu przez te dwie metody badawcze – Kurouski i współpracownicy sugerują, że VCD amyloidów pochodzi od skręcenia protofibrili, natomiast ICD opiera się na skręceniu bądź chiralnym otoczeniu miejsc wiązania sondy molekularnej. Także w eksperymentach z sonikacją i wymywaniem NaCl są widoczne różnice w zmianach intensywności sygnału rejestrowanej metodami VCD i ICD i nie było tam dodatkowego czynnika jakim jest DMSO. Drugi powód to możliwość niedopuszczania cząsteczek tioflawiny T do powierzchni fibryli przez otaczające białko cząsteczki DMSO bądź zaburzanie tylko powierzchniowej warstwy amyloidu w trakcie jego dysocjacji przez DMSO. Wskazywałby na to brak zmian w paśmie amid I' we FT-IR oraz dobrze wykształcone agregaty fibrylarne widziane mikroskopowo przy wysokich stężeniach DMSO. Obserwowany wcześniej spadek fluorescencji przy zwiększaniu się stężenia DMSO [Loksztejn, 2008] także wspiera tę tezę. Tak więc można sądzić, że chiralność struktur amyloidowych rejestrowana przy pomocy metod VCD i ICD nie muszą być równoznaczne, a szybki spadek sygnału ICD obserwowany w wysokich stężeniach DMSO może być także skutkiem oddziaływania DMSO z powierzchnią agregatów.

W przypadku chiralnych superstruktur wyjaśnienie pewnych parametrów widma jest utrudnione ze względu na wielkość układu sprzężonych momentów przejścia i brak jego szczegółowego opisu strukturalnego. Rejestrowane sygnały dichroizmu kołowego mają intensywność większą niż w przypadku innych dotychczas analizowanych amyloidów. Mikroskopowe określenie skrętności włókien najczęściej nie jest możliwe ze względu na silną asocjację fibryli w ramach superstruktury amyloidowej. Pojedyncze obserwowane włókna wydają się jednak mieć kształt płaskich, nieelastycznych słupków, które chętnie skleją się podłużnie i dopiero ich sploty mają widoczną skrętność. Na tym etapie badań nie można więc ani wykluczyć ani potwierdzić, że źródłem właściwości chiralnooptycznych struktur typu +ICD i -ICD jest skręcenie protofibrili budujących włókna. Jednak te superstrukturalne cechy chiralne manifestują się również na poziomie molekularnym, czego dowodem są nie tylko widma VCD, ale także wpływ chiralnych superstruktur amyloidowych na przebieg reakcji syntezy organicznej. Dzięki współpracy z grupą profesora Yoshihisa Inoue przeprowadzone zostały eksperymenty, w których amyloidy posłużyły jako matryce dla antraceno-2-karboksylationu (AC), przyczyniając się do powstania w reakcji fotonaświetlania cyklicznych dimerów o strukturze typu „głowa do głowy” w nadmiarze w stosunku do dimerów typu „głowa do ogona” [Nishijima, 2013]. Powstawanie tego pierwszego typu izomerów praktycznie nie zachodzi dla wolnych cząsteczek AC w roztworze, ale staje się bardzo efektywne gdy prekursorzy – monomery AC –

wstępnie dokują w makromolekularnej matrycy takiej jak cyklodekstryna [Yang, 2008] czy duże białko typu surowicza albumina wołowa [Nishijima, 2007]. Takie reakcje zostały przeprowadzone z wykorzystaniem superstruktur +/-ICD insuliny jako katalitycznych matryc w miejsce dotychczas stosowanych. Celem badań była więc weryfikacja zachodzenia transferu chiralnego z poziomu superstrukturalnego (amyloid) do molekularnego (jako nadmiar chiralny dimerów AC). Wydajność procesu tworzenia się cyklodimerów typu „głowa do głowy” (jako *ee* – nadmiar enancjomeru) była zależna od typu wykorzystanych agregatów zgodnie z kolejnością +ICD > -ICD > amyloid insuliny o zerowym ICD > brak agregatów w próbce poddawanej naświetlaniu, przy czym ich chiralność osiowa korelowała ze znakiem próbki „+” bądź „-”. Wyniki te są pomocne w wyjaśnieniu sposobu wiązania się sond molekularnych z chiralnymi superstrukturami. Sygnał ICD tioflawiny T ma anomalną intensywność, więc może on być skutkiem sprzężenia zarówno cząsteczek o skręconych względem siebie pierścieniach jak i płaskich, lecz ustawionych względem siebie w chiralnym układzie. Pojedyncze cząsteczki AC wykazywały w obecności agregatów +ICD i -ICD widma będące w przybliżeniu swoim odbiciami lustrzanymi i w tym przypadku efekt ten mógł być wywołany jedynie ich chiralnym ułożeniem nadanym przez budowę agregatu. Interpretacja ta popiera tezę, że efekty chiralooptyczne obserwowane dla sond molekularnych w obecności chiralnych superstruktur mogą pochodzić nie od skręcenia cząsteczki barwnika, lecz od wzajemnego układu grupy tych cząsteczek. Dane te wraz z wynikami dotyczącymi chiralności superstruktur amyloidowych rejestrowanej za pomocą technik VCD i ICD, opisanymi w tej rozprawie doktorskiej przybliżają zrozumienie poziomów chiralności pojedynczych włókien i ich chiralnych skupisk.

6. PODSUMOWANIE

Celem badań przeprowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej było pogłębienie wiedzy na temat chiralnych superstruktur amyloidowych powstałych w wyniku agregacji nieprawidłowo zwiniętych molekuł insuliny. Opis zjawiska chiralnej agregacji był dotychczas z dużym stopniem fenomenologiczny, stąd zachodziła potrzeba wyjaśnienia obserwowanych procesów. Klasyfikacja tych struktur oparta jest o pomiary dichroizmu kołowego w zakresie typowym dla białek – dalekim nadfiolecie oraz w zakresie przejść elektronowych dokujących na powierzchni tych superstruktur zewnętrznych znaczników, takich jak tioflawina T.

Przy użyciu polipeptydów w izomerycznych wariantach L- i D- scharakteryzowano widma ICD o pochodzeniu konformacyjnym i przeanalizowano ich kształt. Niespodziewanym wynikiem otrzymanym w ramach tych badań była informacja o tworzeniu się niefluorescencyjnego kompleksu tioflawiny T z α -helikalną formą kwasu poliglutaminowego, co jest istotne w kontekście opracowań medycznych opisujących wpływ tego barwnika na agregację białek *in vivo*. Jako że obserwowane efekty chiralnooptyczne mają anomalnie dużą intensywność, zweryfikowano podstawowe źródła potencjalnych artefaktów pomiarowych. Eksperymenty te wykazały, że źródłem rejestrowanych sygnałów CD jest istotnie efekt Cottona i widma te rzeczywiście oddają chiralność badanych próbek a udziały efektów mogących generować artefakty optyczne – tj. dichroizmu liniowego, dwójłomności bądź rozpraszania światła nie dominują w mierzonym sygnale.

Badania czynników fizykochemicznych wpływających na przebieg chiralnej agregacji wykazały kluczową rolę jonów chlorkowych, przy czym chiralne superstruktury mogą powstawać w obecności dowolnych anionów a ich ładunek i promień jonowy wpływają na znak dichroizmu kołowego otrzymywanych agregatów. Co więcej, asocjacja wcześniej utworzonych, pojedynczych włókien amyloidowych insuliny w obecności NaCl w odpowiednim stężeniu prowadzi do powstania skupisk o charakterze przypominającym chiralne superstruktury i niezerowym sygnale ICD-ThT. Oznacza to, że amyloidogeneza w przepływie hydrodynamicznym nie jest jedyną ścieżką prowadzącą do powstania takich struktur i mogą one być stabilną odmianą polimorficzną agregatów insuliny, przybieraną w pewnych warunkach.

Kolejne wyniki, uzyskane w ramach mojej pracy doktorskiej, dotyczyły kwestii uzyskiwania chiralnych superstruktur wyłącznie z jednego białka – insuliny. Przeprowadzono eksperymenty badające występowanie tego rodzaju struktur wśród szeregu białek i peptydów. Fragment łańcucha insuliny, określany jako peptyd rdzeniowy w fibrylach nie tworzył skupisk amyloidowych o wzmocnionych cechach chiralnooptycznych. Żadne inne z badanych białek bądź peptydów takich jak lizozym, α -laktoalbumina, kwas poli-L-glutaminowy, nie tworzyło definiowanych poprzez takie właściwości chiralnooptyczne chiralnych superstruktur, w przeciwieństwie do naturalnie występujących wariantów insuliny (choć o zróżnicowanej charakterystyce ICD). Zależała ona od

drobnych podstawień aminokwasowych w obrębie łańcucha A, decydujących prawdopodobnie o możliwych zgięciach łańcucha peptydowego. Przy analizie agregacji rozseparowanych łańcuchów A i B insuliny wołowej określono, że łańcuch B ma zdolność do tworzenia agregatów przypominających chiralne superstruktury, natomiast łańcuch A ma tendencję do zapętlania się pod nieobecność natywnych mostków dwusiarczkowych i wykształcania amorficznych agregatów. Dodatkowo zbadano agregację analogu insuliny – lispro – nie tworzącego dimery z powodu podstawienia w obrębie C-końcowego fragmentu łańcucha B. Amyloid ten nie cechował się intensywnymi widmami dichroizmu kołowego. Na podstawie tych eksperymentów wyciągnięto wniosek, że jednym z koniecznych uwarunkowań pozwalających na tworzenie się chiralnych superstruktur insuliny są właściwości C-końcowego odcinka łańcucha B. Ta część sekwencji tworzy w natywnej insulinie hydrofobowy kontakt z drugim monomerem, natomiast w trakcie agregacji zmienia swoją rolę i może służyć jako „rzep molekularny”, łączący najprawdopodobniej w formie antyrównoległej β -kartki sąsiednie fibryle. Takie zjawisko mogłoby prowadzić do silnej asocjacji włókien, widzianej w przypadku chiralnych superstruktur insuliny. Ta obserwacja określa także jakie cechy powinno mieć białko, aby móc utworzyć tego typu agregaty.

Dalsze wyniki, zawarte w rozprawie doktorskiej, opisują relację pomiędzy chiralnością superstruktur rejestrowaną jako pomiar indukowanego dichroizmu kołowego tioflawiny T oraz wibracyjnego dichroizmu kołowego samych amyloidów. Wykonano charakterystykę spektroskopową próbek +ICD i -ICD dysocjujących pod wpływem DMSO oraz lub poprzez sonikację bądź odmycie NaCl. Cechy chiralooptyczne tych agregatów są widoczne także w VCD jako anomalnie intensywny sygnał. Znak próbek w zakresie elektronowym pokrywa się ze znakiem rejestrowanym w zakresie podczerwieni. Eksperymenty te wykazały, że chiralność superstruktur jest obserwowana tak długo, jak w próbce widoczne są duże, zwarte skupiska fibryli. Zanik cech chiralooptycznych jest nierównoczesny w przypadku pomiaru ICD-ThT i VCD. Można więc sądzić, że te dwie metody pomiarowe rejestrują chiralność superstruktur na różnych poziomach budowy amyloidu, choć sygnały te są ze sobą skorelowane. W obu przypadkach dochodzi do wzmocnienia anomalnego wzmocnienia intensywności widm.

Przeprowadzone przeze mnie badania w znaczącym stopniu przyczyniły się do lepszego zrozumienia krytycznych czynników fizykochemicznych i strukturalnych umożliwiających zajście chiralnej agregacji insuliny. Wyciągnięte wnioski są istotne zarówno pod kątem zrozumienia procesu agregacji białek jak i w kontekście potencjalnych zastosowań chiralnych superstruktur jako chiralnego podłoża. Wyniki tych prac zostały w znacznej części opublikowane w czasopismach naukowych.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adamcik J., Mezzenga R. **2011** Adjustable twisting periodic pitch of amyloid fibrils. *Soft Matter* 7, 5437–5443
- Alavez S., Vantipalli M. C., Zucker D. J., Klang I. M., Lithgow G. J. **2011** Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan. *Nature* 472, 226-229
- Amemori S., Iwakiri R., Endo H., Ootani A., Ogata S., Noda T., Tsunada S., Sakata H., Matsunaga H., Mizuguchi M., Ikeda Y., Fujimoto K. **2006** Oral dimethyl sulfoxide for systemic amyloid A amyloidosis complication in chronic inflammatory disease: a retrospective patient chart review. *J. Gastroenterol.* 41, 444-449
- Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H. **1961** The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 1309-1314
- Appel T. R., Richter S., Linke R. P., Makovitzky J. **2005** Histochemical and topo-optical investigations on tissue-isolated and in vitro amyloid fibrils. *Amyloid.* 12, 174-183
- Arteaga O., Canillas A., Purrello R., Ribo J. M. **2009** Evidence of induced chirality in stirred solutions of supramolecular nanofibers. *Optic. Lett.* 34, 2177–2179
- Azriel R., Gazit E. **2001** Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *J. Biol. Chem.* 276, 34156–34161
- Babenko V., Harada T., Yagi H., Goto Y., Kuroda R., Dzwolak W. **2011** Chiral superstructures of insulin amyloid fibrils. *Chirality* 23, 638-646
- Babenko V., Piejko M., Wojcik S., Mak P., Dzwolak W. **2013** Vortex-induced amyloid superstructures of insulin and its component A- and B-chains. *Langmuir* 29, 5271-5278
- Baker E. N., Blundell T. L., Cutfield J. F., Cutfield S. M., Dodson E. J., Dodson G. G., Hodgkin D. M. C., Hubbard R. E., Isaacs N. W., Reynolds C. D., Sakabe K., Sakabe N., Vijayan N. M. **1988** The Structure of Z₂N Pig Insulin Crystals at 1.5 Å Resolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 319, 369–456
- Bauer H. H., Aebi U., Haner M., Hermann R., Muller M., Merkle H. P. **1995** Architecture and polymorphism of fibrillar supramolecular assemblies produced by in vitro aggregation of human calcitonin. *J. Struct. Biol.* 115, 1–15
- Baxa U., Taylor K. L., Wall J. S., Simon M. N., Cheng N., Wickner R. B., Steven A. C. **2003** Architecture of Ure2p prion filaments: the N-terminal domains form a central core fiber. *J. Biol. Chem.* 278, 43717–43727
- Benditt E. P., Eriksen N. **1971** Chemical classes of amyloid substance. *Am. J. Pathol.* 65, 231–252
- Bennhold H. **1922** Eine spezifische Amyloidfärbung mit Kongorot. *Münch. Med. Wochenschr.* 69, 1537–1538

- Bentley G., Dodson E., Dodson G., Hodgkin D., Mercola D. **1976** Structure of insulin in 4-zinc insulin. *Nature* 261, 166–168
- Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. **2009** Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to the surface of beta-rich peptide self-assemblies. *J. Mol. Biol.* 385, 1052–1063
- Binnig G., Quate C. F., Gerber C. **1986** Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933
- Blake C. C. F., Koenig G. A., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R. **1965** Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* 206, 759–761
- Blundell T. L., Cutfield J. F., Cutfield S. M., Dodson E. J., Dodson G. G., Hodgkin D. C., Mercola D. A., Vijayan M. **1971** Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature* 231, 506–511
- Blundell T., Dodson G., Hodgkin D., Mercola D. **1972** Insulin: The structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Adv. Protein Chem.* 26, 279-402
- Bodin K., Ellmerich S., Kahan M. C., Tennet G. A., Loesch A., Gilbertson J. A., Hutchinson W. L., Mangione P. P., Gallimore J. R., Millar D. J., Minogue S., Dhillon A. P., Taylor G. W., Bradwell A. R., Petrie A., Gillmore J. D., Belotti V., Botto M., Hawkins P. N., Pepys M. B. **2010** Antibodies to human serum amyloid P component eliminate visceral amyloid deposits. *Nature* 468, 93-97
- Bolton D. C., McKinley M. P., Prusiner S. B. **1982** Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309–1311
- Boneti T. **1679** Sepulchretum sive anatomia practica ex cadaveribus morbo denatis.
- Bouchard M., Zurdo J., Nettleton E. J., Dobson C. M., Robinson C. V. **2000** Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* 9, 1969–1967
- Brahms S., Brahms J. **1980** Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism *J. Mol. Biol.* 138, 149-178
- Brange J., Hansen J. F., Havelund S., Melberg S.G. **1987** Studies of the insulin fibrillation process. Brunetti P., Waldhausl W. K. (eds.) *Advanced Models for the Therapy of Insulin Dependent Diabetes.* Lippincott-Raven, 85–90
- Brange J., Andersen L., Laursen E. D., Meyn G., Rasmussen E. **1997** Toward understanding insulin fibrillation. *J. Pharm. Sci.* 86, 517-525
- Brems D. N., Brown P. L., Heckenlaible L. A., Frank B. H. **1990** Equilibrium denaturation of insulin and proinsulin. *Biochemistry* 29, 9289-9293
- Bryngelson J., Onuchic J., Socci N., Wolynes P. G. **1995** Funnels, Pathways, and the Energy Landscape of Protein Folding: A Synthesis. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 21, 167-195

- Buell A. K., Hung P., Salvatella X., Welland M. E., Dobson C. M., Knowles T. P. **2013** Electrostatic effects in filamentous protein aggregation. *Biophys. J.* 104, 1116-1126
- Bulheller B. M., Rodger A., Hirst J. D. **2007** Circular and linear dichroism of proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 2020-2035
- Burke M. J., Rougvie M. **1972** Cross- protein structures. I. Insulin fibrils. *Biochemistry* 11, 2435–2439
- Bustamante C., Tinoco I. Jr, Maestre M. F. **1983** Circular differential scattering can be an important part of the circular dichroism of macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3568–3572
- Carny O., Shalev D. E., Gazit E. **2006** Fabrication of coaxial metal nanocables using a self-assembled peptide nanotube scaffold. *Nano Lett.* 6, 1594–1597
- Chamberlain A. K., MacPhee C. E., Zurdo J., Morozova-Roche L. A., Hill H. A., Dobson C. M., Davis J. J. **2000** Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Biophys J.* 79, 3282-3293
- Channon K. J., Devlin G. L., MacPhee C. E. **2009** Efficient energy transfer within self-assembling peptide fibers: A route to light-harvesting nanomaterials. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 12520–12521
- Cheon M., Chang I., Mohanty S., Luheshi L. M., Dobson C. M., Vendruscolo M., Favrin G. **2007** Structural reorganisation and potential toxicity of oligomeric species formed during the assembly of amyloid fibrils. *PLoS Comput. Biol.* 3, 1727-1738
- Chiti F., Webster P., Taddei N., Clark A., Stefani M., Ramponi G., Dobson C. M. **1999** Designing conditions for In-vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3590–3594
- Chiti F., Taddei N., Baroni., Capanni C., Stefani M., Ramponi G., Dobson C. M. **2002** Kinetic partitioning of protein folding and aggregation. *Nat. Struct. Biol.* 9, 137–143
- Chothia C. **1973** Conformation of twisted beta-pleated sheets in proteins. *J. Mol. Biol.* 75, 295–302
- Collins K. D., Washabaugh M. W. **1985** The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q. Rev. Biophys.* 18, 323–422
- Crowther R. A., Goedert M. **2000** Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J. Struct. Biol.* 130, 271-279
- De Ferrari G. V., Mallender W. D., Inestrosa N. C., Rosenberry T. L. 2001 Thioflavin T is a fluorescent probe of the acetylcholinesterase peripheral site that reveals conformational interactions between the peripheral and acylation sites. *J. Biol. Chem.* 276, 23282-23287
- Dember L. M. **2009** Modern Treatment of Amyloidosis: Unresolved Questions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 469–472
- Derewenda U., Derewenda Z., Dodson E., Dodson G. G., Reynolds C. D., Smith G. D., Sparks C., Swenson D. **1989** Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature* 338, 594-596

- Devlin G. L., Knowles T. P. J., Squires A., McCammon M. G., Gras S. L., Nilsson M. R., Robinson C. V., Dobson C. M., MacPhee C. E. **2006** The Component Polypeptide Chains of Bovine Insulin Nucleate or Inhibit Aggregation of the Parent Protein in a Conformation-Dependent Manner. *J. Mol. Biol.* 360, 497–509
- Dische F. E., Wernstedt C., Westermark G. T., Westermark P., Pepys M. B., Rennie J. A., Gilbey S. G., Watkins P. J. **1988** Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* 31, 158–161
- Divry P., Florkin M. **1927** Sur les proprietes optiques de l'amyloide. *C. R. Soc. Biol. Paris* 97, 1808-1810
- Duboisset J., Ferrand P., He W., Wang X., Rigneault H., Brasselet S. **2013** Thioflavine-T and Congo Red reveal the polymorphism of insulin amyloid fibrils when probed by polarization-resolved fluorescence microscopy. *J. Phys. Chem. B* 117, 784-788
- Dzwolak W., Jansen R., Smirnovas V., Lokszejn A., Porowski S., Winter R. **2005a** Template-controlled conformational patterns of insulin fibrillar self-assembly reflect history of solvation of the amyloid nuclei. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7, 1349-1351
- Dzwolak W., Pecul M. **2005b** Chiral bias of amyloid fibrils revealed by the twisted conformation of thioflavin T: an induced circular dichroism / DFT study. *FEBS Lett.* 579, 6601-6603
- Dzwolak W., Jansen R., Smirnovas V., Lokszejn A., Porowski S., Winter R. **2005c** Template-controlled conformational patterns of insulin fibrillar self-assembly reflect history of solvation of the amyloid nuclei. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7, 1349-1351
- Dzwolak W., Lokszejn A., Galinska-Rakoczy A., Adachi R., Goto Y., Rupnicki L. **2007** Conformational indeterminism in protein misfolding: chiral amplification on amyloidogenic pathway of insulin. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 7517-7522
- Eanes E. D., Glenner G. G. **1968** X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* 16, 673–677
- Edwards R. A., Woody R. W. **1977** Induced circular dichroism as a probe of Cibacron Blue and Congo Red bound to dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 470-476
- Fändrich M., Dobson C. M. **2002** The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* 21, 5682–5690
- Fändrich M., Meinhardt J., Grigorieff N. **2009** Structural polymorphism of Alzheimer Abeta and other amyloid fibrils. *Prion* 3, 89-93
- Foderà V., Librizzi F., Groenning M., Van De Weert M., Leone M. **2008** Secondary nucleation and accessible surface in insulin amyloid fibril formation. *J. Phys. Chem. B* 112, 3853-3858
- Fowler D. M., Koulov A. V., Alory-Jost C., Marks M. S., Balch W. E., Kelly J. W. **2005** Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4, 1–8
- Friedreich N., Kekulé A. Zur Amyloidfrage. **1859** *Virchow's Arch. Pathol. Anat. Klin. Med.* 16, 50–65

- Fulara A., Dzwolak W. **2010** Bifurcated Hydrogen Bonds Stabilize Fibrils of Poly(L-glutamic) Acid. *J. Phys. Chem. B* 114, 8278–8283
- Fulara A., Lakhani A., Wójcik S., Nieznańska H., Keiderling T. A., Dzwolak W. **2011** Spiral Superstructure of Amyloid-Like Fibrils of Polyglutamic Acid: An Infrared Absorption and Vibrational Circular Dichroism Study. *J. Phys. Chem. B* 115, 11010-11016
- Gajdusek D. C., Gibbs C. J. Jr, Rogers N. G., Basnight M., Hooks J. **1972** Persistence of Viruses of Kuru and Creutzfeldt-Jakob Disease in Tissue Cultures of Brain Cells. *Nature* 235, 104 – 105
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. **2005** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Walker J. M. (ed.) *The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press*
- Gazit E. **2002** The “correctly folded” state of proteins: is it a metastable state? *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 257-259
- Getz E. B., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R., Selvin P. R. **1999** A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2- carboxyethyl)-phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Anal. Biochem.* 273, 73–80
- Glenner G. G., Keiser H. R., Bladen H. A., Cuatrecasas P., Eanes E. D., Ram J. S., Kanfer J. N., DeUellis R. A. **1968** Amyloid. VI. A comparison of two morphologic components of human amyloid deposits. *J. Histochem. Cytochem.* 16, 633-644
- Glenner G. G., Terry W., Harada M., Isersky C., Page D. **1971** Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analysis. *Science* 172, 1150–1151
- Glenner G. G., Eanes E. D., Bladen H. A., Linke R. P., Termine J. D. **1974** Beta-pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils, *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1141-1158
- Glenner G.G., Wong C.W. **1984** Alzheimer’s disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890
- Goldsbury C. S., Cooper G. J., Goldie K. N., Muller S. A., Saafi E. L., Gruijters W. T., Misur M. P., Engel A., Aebi U., Kistler J. **1997** Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *J. Struct. Biol.* 119, 17–27
- Grabowski Z. R., Rotkiewicz K., Rettig W. **2003** Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures. *Chem. Rev.* 103, 3899–4032
- Grabowski S. (ed.) **2006** Hydrogen Bonding - New Insights. *Springer*
- Griffiths P., de Hasseth J. A. **2007** Fourier Transform Infrared Spectrometry (2nd ed.). *Wiley-Blackwell*
- Griswold I. J., Dahlquist F. W. **2002** Bigger is better: megadalton protein NMR in solution. *Nat. Struct. Biol.* 9, 567–568

- Harel M., Sonoda L. K., Silman I., Sussman J. L., Rosenberry T. L. **2008** Crystal structure of thioflavin T bound to the peripheral site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase reveals how thioflavin T acts as a sensitive fluorescent reporter of ligand binding to the acylation site. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 7856–7861
- Harper J. D., Lieber C. M., Lansbury P. T. Jr **1997** Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chem. Biol.* 4, 951–959
- Hartl F. U., Hayer-Hartl M. **2009** Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 574–581
- Hawe A., Sutter M., Jiskoot W. **2008** Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.* 7, 1487–1499
- Hobbs J. R., Morgan A. D. **1963** Fluorescence microscopy with thioflavine-T in the diagnosis of amyloid. *J. Pathol. Bacteriol.* 86, 437–442
- Hoffman M. **1997** Connecting peptide, correcting peptide? *Ann. Intern. Med.* 127, 1147–1148
- Hong D. P., Ahmad A., Fink A. L. **2006** Fibrillation of human insulin A and B chains. *Biochemistry* 45, 9342–9353
- Hoshino M., Katou H., Hagihara Y., Hasegawa K., Naiki H., Goto Y. **2002** Mapping the core of the β 2-microglobulin amyloid fibril by H/D exchange. *Nat. Struct. Biol.* 9, 332–336
- Howey D. C., Bowsher R. R., Brunelle R. L., Woodworth J. R. **1994** [Lys(B28), Pro(B29)]-Human Insulin: A Rapidly Absorbed Analogue of Human Insulin. *Diabetes* 43, 396–402
- Hua Q., Weiss M. A. **1991** Comparative 2D NMR studies of human insulin and despentapeptide insulin: sequential resonance assignment and implications for protein dynamics and receptor recognition. *Biochemistry* 30, 5505–5515
- Husband F. A., Garrood M. J., Mackie A. R., Burnett G. R., Wilde P. J. **2001** Adsorbed protein secondary and tertiary structures by circular dichroism and infrared spectroscopy with refractive index matched emulsions. *J. Agric. Food. Chem.* 49, 859–866
- Ingrosso L., Ladogana A., Pocchiari M. **1995** Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. *J. Virol.* 69, 506–508
- Ionescu-Zanetti C., Khurana R., Gillespie J. R., Petrick J. S., Trabachino L. C., Minert L. J., Carter S. A., Fink A. L. **1999** Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 23 13175–13179
- Ivanova M. I., Sievers S. A., Sawaya M. R., Wall J. S., Eisenberg D. **2009** Molecular basis for insulin fibril assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 18990–18995
- Jackson M., Mantsch H. H. **1991** Beware of proteins in DMSO. *Biochim. Biophys. Acta* 1078, 231–235

- Jain S., Udgaonkar J. B. **2010** Salt-induced modulation of the pathway of amyloid fibril formation by the mouse prion protein. *Biochemistry* 49, 7615-7624
- Jansen R., Dzwolak W., Winter R. **2005** Amyloidogenic Self-Assembly of Insulin Aggregates Probed by High Resolution Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* 88, 1344-1353
- Jaroniec C. P., MacPhee C. E., Bajaj V. S., McMahon M. T., Dobson C. M., Griffin R. G. **2004** High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 711-716
- Jarrett J. T., Lansbury P. T. **1993** Seeding one-dimensional crystallization of amyloid - a pathogenic mechanism in alzheimers-disease and scrapie. *Cell* 73, 1055-1058
- Jimenez J. L., Guijarro J. I., Orlova E., Zurdo J., Dobson C. M., Sunde M., Saibil H. R. **1999** Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.*, 18, 815-821
- Jimenez J. L., Tennent G., Pepys M., Saibil H. R. **2001** Structural diversity of ex vivo amyloid fibrils studied by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 311, 241-247
- Jimenez J. L., Nettleton E. J., Bouchard M., Robinson C. V., Dobson C. M., Saibil H. R. **2002** The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9196-9201
- Kagan H. M., Hewitt N. A., Franzblau C. A **1973** microenvironmental probe of elastin. Properties of a solubilized congo red-elastin complex. *Biochim. Biophys. Acta* 322, 258-268
- Keiderling T. A., Pancoska P. **1993** Structural Studies of Biological Macromolecules using Vibrational Circular Dichroism. Hester R. E., Clarke R. J. H. (eds.) *Advances in Spectroscopy Vol. 21: Biomolecular Spectroscopy Part B. John Wiley* 267-315
- Keiderling T. A. **2002** Protein and Peptide Secondary Structure and Conformational Determination with Vibrational Circular Dichroism. Leary J., Arnold M. (eds.) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 682-688
- Kelly S.M., Jess T. J., Price N. C. **2005** How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 119-139
- Kendrew J. C., Bodo G., Dintzis H. M., Parrish R. G., Wyckoff H., Phillips D. C. **1958** A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181, 662-666
- Khurana R., Uversky V. N., Nielsen L., Fink A. L. **2001** Is Congo red an amyloid-specific dye? *J. Biol. Chem.* 276, 22715-22721
- Khurana R., Ionescu-Zanetti C., Pope M., Li J., Nielson L., Ramirez-Alvarado M., Regan L., Fink A. L., Carter S. A. **2003** A General Model for Amyloid Fibril Assembly Based on Morphological Studies Using Atomic Force Microscopy *Biophys. J.* 85, 1135-1144

- Klement K., Wieligmann K., Meinhardt J., Hortschansky P., Richter W., Fändrich M. **2007** Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's abeta(1-40) amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 373, 1321-1333
- Klintworth G. K. **2009** Corneal dystrophies. *Orphanet. J. Rare Dis.* 4:7
- Klunk W. E., Pettegrew J. W., Abraham D. J. **1989** Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1273-1281
- Kondepudi D.K., Laudadio J., Asakura K. **1999** Chiral symmetry breaking in stirred crystallization of 1,1'-binaphthyl melt. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1448-1451
- Kondepudi D. K., Asakura K. **2001** Chiral autocatalysis, spontaneous symmetry breaking, and stochastic behavior. *Acc. Chem. Res.* 34, 946-954
- Kondo A., Oku S., Higashitani K. **1991** Structural changes in protein molecules adsorbed on ultrafine silica particles. *J. Colloid Interface Sci.* 143, 214-221
- Kong J., Yu S. **2007** Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 39, 549-559
- Krebs M.R.H., MacPhee C.E., Miller A.F., Dunlop I.E., Dobson C.M., Donald A.M. **2004** The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14420-14424
- Krebs M. R. H., Bromley E. H. C., Rogers S. S., Donald A. M. **2005a** The Mechanism of Amyloid Spherulite Formation by Bovine Insulin. *Biophys J.* 88, 2013-2021
- Krebs M. R. H., Bromley E. H. C., Donald A. M. **2005b** The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.* 149, 30-37
- Kuciel R, Mazurkiewicz A. **1997** Molten globule as an intermediate on the human prostatic phosphatase folding pathway. *Acta Biochim. Pol.* 44, 645-657
- Kumar S., Walter J. **2011** Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging* 3, 803-812
- Kuroda R., Harada T., Shindo Y. **2001** A solid-state dedicated circular dichroism spectrophotometer: development and application. *Rev. Sci. Inst.* 72, 3802-3810
- Kurouski D., Lombardi R. A., Dukor R. K., Lednev I. K., Nafie L. A. **2010** Direct observation and pH control of reversed supramolecular chirality in insulin fibrils by vibrational circular dichroism. *Chem. Commun.* 46, 7154-7156
- Kurouski D., Dukor R. K., Lu X., Nafie L. A., Lednev I. K. **2012a** Spontaneous inter-conversion of insulin fibril chirality. *Chem. Commun.* 48, 2837-2839
- Kurouski D., Dukor R. K., Lu X., Nafie L. A., Lednev I. K. **2012b** Normal and reversed supramolecular chirality of insulin fibrils probed by vibrational circular dichroism at the protofilament level of fibril structure. *Biophys. J.* 103, 522-531

- Kurouski D., Washington J., Ozbil M., Prabhakar R., Shekhtman A., Lednev I. K. **2012c** Disulfide bridges remain intact while native insulin converts into amyloid fibrils. *PLoS ONE* 7, e36989
- Lal R., Lin H., Quist A. P. **2007** Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* 1768, 1966–1975
- Lakhani A., Malon P., Keiderling T. A. **2009** Comparison of vibrational circular dichroism instruments: development of a new dispersive VCD. *Appl. Spectrosc.* 63, 775–785
- Lemere C. A. **2013** Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. *Mol. Neurodegener.* 8:36.
- Lendel C., Bertocini C. W., Cremades N., Waudby C. A., Vendruscolo M., Dobson C. M., Schenk D., Christodoulou J., Toth G. **2009** On the mechanism of nonspecific inhibitors of protein aggregation: dissecting the interactions of alpha-synuclein with Congo red and lacmoid. *Biochemistry* 48, 8322–8234
- LeVine III, H. **1993** Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2, 404–410
- Levinthal C. **1968** Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* 65, 44–45
- Litman B. J. **1972** Effect of light scattering on the circular dichroism of biological membranes. *Biochemistry* 11, 3243–3247
- Loksztejn A., Dzwolak W. **2008** Chiral bifurcation in aggregating insulin: An induced circular dichroism study *J. Mol. Biol.* 379, 9–16
- Loksztejn A., Dzwolak W. **2009** Noncooperative dimethyl sulfoxide-induced dissection of insulin fibrils: Toward soluble building blocks of amyloid. *Biochemistry* 48, 4846–4851
- Loksztejn A., Dzwolak W. **2010** Vortex-Induced Formation of Insulin Amyloid Superstructures Probed by Time-Lapse Atomic Force Microscopy and Circular Dichroism Spectroscopy *J. Mol. Biol.* 395, 643–655
- Lopez De La Paz M., Goldie K., Zurdo J., Lacroix E., Dobson C. M., Hoenger A., Serrano L. **2002** De novo designed peptide-based amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16052–16057
- Lue L. F., Kuo Y. M., Roher A. E., Brachova L., Shen Y., Sue L., Beach T., Kurth J. H., Rydel R. E., Rogers J. **1999** Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 155, 853–862
- Ma A. W. K., Mackley M. R., Rahatekar S. S. **2007** Experimental observation on the flow-induced assembly of carbon nanotube suspensions to form helical bands. *Rheol. Acta* 46, 979–987
- Ma S., Cao X., Mak M., Sadik A., Walkner C., Freedman T. B., Lednev I. K., Dukor R.K., Nafie L.A. **2007** Vibrational Circular Dichroism Shows Unusual Sensitivity to Protein Fibril Formation and Development in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 12364–12365

- Macchi F., Hoffmann S. V., Carlsen M., Vad B., Imparato A., Rischel C., Otzen D. E. **2011** Mechanical stress affects glucagon fibrillation kinetics and fibril structure. *Langmuir* 27, 12539-12549
- Magill J. H. **2001** Spherulites: a personal perspective. *J. Mater. Sci.* 36, 3143–3164
- Makin O. S., Atkins E., Sikorski P., Johansson J., Serpell L. C. **2005** Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 315–320
- Manuelidis L., Fritch W., Xi Y. G., **1997** Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science* 277, 94–98
- Margiolaki I., Giannopoulou A. E., Wright J. P., Knight L., Norrman M., Schluckebier G., Fitch A. N., Von Dreele R. B. **2013** High-resolution powder X-ray data reveal the T6 hexameric form of bovine insulin. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 69, 978-990
- Masison D. C., Wickner R. B. **1995** Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science* 270, 93–95
- Maskevich A. A., Stsiapura V. I., Kuzmitsky V. A., Kuznetsova I. M., Povarova O. I., Uversky V. N., Turoverov K. K. **2007** Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in fibril-incorporated form. *J. Proteome Res.* 6, 1392-1401
- Maver U., Maver T., Peršin Z., Mozetič M., Vesel A., Gaberšček M., Stana-Kleinschek K. **2013** Polymer Characterization with the Atomic Force Microscope. Yilmaz F. (ed.) Polymer Science. *InTech*
- Measey T. J., Schweitzer-Stenner R. **2011** Vibrational circular dichroism as a probe of fibrillogenesis: the origin of the anomalous intensity enhancement of amyloid-like fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 1066-1076
- Menting J. G., Whittaker J., Margetts M. B., Whittaker L. J., Kong G. K., Smith B. J., Watson C. J., Záková L., Kletvíková E., Jiráček J., Chan S. J., Steiner D. F., Dodson G. G., Brzozowski A. M., Weiss M. A., Ward C. W., Lawrence M. C. **2013** How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature* 493, 241-245
- Miyazawa T., Blout E. R. **1961** The Infrared Spectra of Polypeptides in Various Conformations: Amide I and II Bands T. *J. Am. Chem. Soc.* 83, 712–719
- Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T. J. P., Chothia C. **1995** SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247, 536-540
- Muzaffar M., Ahmad A. **2011** The mechanism of enhanced insulin amyloid fibril formation by NaCl is better explained by a conformational change model. *PLoS ONE* 6, e27906
- Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. **1989** Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, Thioflavin T. *Anal. Biochem.* 177, 244–249
- Naslund J., Haroutunian V., Mohs R., Davis K. L., Davies P., Greengard P., Buxbaum J. D. **2000** Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283, 1571–1577

- Nayak A., Sorci M., Krueger S., Belfort G. **2009** A universal pathway for amyloid nucleus and precursor formation for insulin. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 74, 556-565
- Nelson R., Sawaya M. R., Balbirnie M., Madsen A. O., Riek C., Grothe R., Eisenberg D. **2005** Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773-778
- Nettleton E. J., Tito P., Sunde M., Bouchard M., Dobson C. M., Robinson C. V. **2000** Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry. *Biophys J.* 79, 1053-1065
- Nielsen L., Frokjaer S., Carpenter J. F., Brange J. **2001a** Studies of the structure of insulin fibrils by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy *J. Pharm. Sci.* 90, 29-37
- Nielsen L., Frokjaer S., Brange J., Uversky V. N., Fink A. L. **2001b** Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants *Biochemistry* 40, 8397-8409
- Nishijima M., Wada T., Mori T., Pace T. C., Bohne C., Inoue Y. **2007** Highly enantiomeric supramolecular [4 + 4] photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate mediated by human serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 3478-3479
- Nishijima M., Tanaka H., Yang C., Fukuhara G., Mori T., Babenko V., Dzwolak W., Inoue Y. **2013** Supramolecular photochirogenesis with functional amyloid superstructures. *Chem. Commun.* 49, 8916-8918
- Olsen A., Jonsson A., Normark S. **1989** Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652-655
- Osserman E. F., Isobe T., Farhangi M. **1976** Effect of dimethyl-sulfoxide (DMSO) in the treatment of amyloidosis. Wegelius O., Pasternack A. (eds.) *Amyloidosis. Academic Press.* 553
- Osugi C. O., Weitz D. A. **2008** Highly anisotropic vorticity aligned structures in a shear thickening attractive colloidal system. *Soft Matter* 4, 1388-1392
- Otagiri M., Ikeda K., Uekama K., Ito O., Hatano M. **1974** Induced circular dichroism of racemic methylcyclohexanones included in cyclodextrin. *Chem. Lett.* 7, 679-682
- Pauling L., Corey R. B., Branson H. R. **1951a** The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37, 205-211
- Pauling L., Corey R. B. **1951b** Configurations of polypeptide chains with favored orientations of the polypeptide around single bonds: Two pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.* 37, 729-740
- Pauling L., Corey R. B. **1953** Two rippled-sheet configurations of polypeptide chains, and a note about the pleated sheets. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 39, 253-256
- Pawar A. P., Dubay K. F., Zurdo J., Chiti F., Vendruscolo M., Dobson C. M. **2005** Prediction of 'aggregation-prone' and 'aggregation-susceptible' regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J. Mol. Biol.* 350, 379-392

- Pelton J. T., McLean L. R. **2000** Spectroscopic Methods for analysis of protein secondary structure. *Anal. Biochem.* 277, 167-176
- Petkova A. T., Buntkowsky G., Dyda F., Leapman R. D., Yau W. M., Tycko R. **2004** Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel beta-sheet registry in fibrils formed by a beta-amyloid peptide. *J. Mol. Biol.* 335, 247–260
- Petkova A. T., Leapman R. D., Guo Z., Yau W. M., Mattson M. P., Tycko R. **2005** Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* 307, 262-265
- Pollard H. B., Arispe N., Rojas E. **1995** Ion channel hypothesis for Alzheimer amyloid peptide neurotoxicity. *Cell Mol. Neurobiol.* 15, 513-526
- Prusiner S. B. **1982** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144
- Ptitsyn O. B. **1995** Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* 47, 83-229
- Reches M., Gazit E. **2006** Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes. *Nature Nanotech.* 1, 195–200
- Ribo J. M., Crusats J., Sagues F., Claret J., Rubires R. **2001** Chiral sign induction by vortices during the formation of mesophases in stirred solutions. *Science* 292, 2063–2066
- Richardson J. S. **1981** The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. *Adv. Protein Chem.* 34, 167-339
- Rodger A., Norden B. **1997** Circular Dichroism and Linear Dichroism. *Oxford University Press*
- Rogers S. S., Krebs M. R. H., Bromley E. H. C., van der Linden E., Donald A. M. **2006** Optical Microscopy of Growing Insulin Amyloid Spherulites on Surfaces In Vitro. *Biophys. J.* 90 1043-1054
- Rubin N., Perugia E., Wolf S. G., Klein E., Fridkin M., Addadi L. **2010** Relation between serum amyloid A truncated peptides and their suprastructure chirality. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 4242–4248
- Sabate R., Lascu I., Saupe S. J. **2008** On the binding of Thioflavin-T to HET-s amyloid fibrils assembled at pH 2. *J. Struct. Biol.* 162, 387–396
- Sachse C., Grigorieff N., Fandrich M. **2001** Nanoscale flexibility parameters of Alzheimer amyloid fibrils determined by electron cryo-microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 1321-1323
- Sackett D., Wolff J. **1987** Nile Red as polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Anal. Biochem.* 167, 228–234
- Sanger F. **1959** Chemistry of insulin. *Science* 129, 1340-1344
- Saraiva A. M., Cardoso I., Saraiva M. J., Tauer K., Pereira M. C., Coelho G. **2010** Randomization of amyloid- β -peptide(1-42) conformation by sulfonated and sulfated nanoparticles reduces aggregation and cytotoxicity. *Macromol. Biosci.* 10, 1152-1163

- Scheibel T., Parthasarathy R., Sawicki G., Lin X. M., Jaeger H., Lindquist S. L. **2003** Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4527–4532
- Schulz G. E., Elzinga M., Marx F., Schirmer R. H. **1974** Three dimensional structure of adenyl kinase. *Nature* 250, 120-123
- Schwartz R., King J. **2006** Frequencies of hydrophobic and hydrophilic runs and alternations in proteins of known structure. *Protein Sci.* 15, 102–112
- Seilheimer B., Bohrmann B., Bondolfi L., Müller F., Stüber D., Döbeli H. **1997** The toxicity of the Alzheimer's beta-amyloid peptide correlates with a distinct fiber morphology. *J. Struct. Biol.* 119, 59-71
- Semisotnov G. V., Rodionova N. A., Razgulyaev O. I., Uversky V. N., Gripas A. F., Gilmanshin R. I. **1991** Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* 31, 119-128
- Serio T. R., Cashikar A. G., Kowal A. S., Sawicki G. J., Moslehi J. J., Serpell L., Arnsdorf M. F., Lindquist S. L. **2000** Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289, 1317-1321
- Serpell L. C., Sunde M., Benson M. D., Tennent G. A., Pepys M. B., Fraser P. E. **2000** The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 300, 1033–1039
- Shindo Y., Nishio M. **1990** The effect of linear anisotropies on the CD spectrum: it is true that the oriented polyvinylalcohol film has a magic chiral domain inducing optical activity in achiral molecules? *Biopolymers* 30, 25–31
- Sipe J. D., Benson M. D., Buxbaum J. N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M. J., Westermark P. **2012** Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 19, 167-170
- Sletten K., Westermark P., Natvig J. B. **1976** Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *J. Exp. Med.* 143, 993–998
- Slotta U., Hess S., Spiess K., Stromer T., Serpell L., Scheibel T. **2007** Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromol. Biosci.* 7, 183–188
- Snow A. D., Sekiguchi R., Nochlin D., Fraser P., Kimata K., Mizutani A., Arai M., Schreier W. A., Morgan D. G. **1994** An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron* 12, 219–234
- Sorenson G. D., Binnington B. **1964** Resistance of murine amyloid fibrils to proteolytic enzymes. *Fed. Proc.* 23, 550
- Sorrenti A., El-Hachemi Z., Arteaga O., Canillas A., Crusats J., Ribo J. M. **2012** Kinetic control of the supramolecular chirality of porphyrin J-aggregates. *Chem. Eur. J.*, 8820-8826

- Spek E. J., Gong Y., Kallenbach N. R. **1995** Intermolecular interactions in alpha helical ologo and poly (L-glutamic acid) at acidic pH. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10773-10774
- Stephens P. J. **1985** Theory of vibrational circular-dichroism. *J. Phys. Chem.* 89, 748-752
- Stigter D., Alonso D. O., Dill K. A. **1991** Protein stability: electrostatics and compact denatured states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4176–4180
- Stsiapura V. I., Maskevich A. A., Kuzmitsky V. A., Turoverov K. K., Kuznetsova I. M. **2007** Computational study of thioflavin T torsional relaxation in the excited state. *J. Phys. Chem. A* 111, 4829-4835
- Tsuda A., Alam M. A., Harada T., Yamaguchi T., Ishii N., Aida T. **2007** Spectroscopic visualization of vortex flows using dye-containing nanofibers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8198-8202
- Ueda M., Horibata Y., Shono M., Misumi Y., Oshima T., Su Y., Tasaki M., Shinriki S., Kawahara S., Jono H., Obayashi K., Ogawa H., Ando Y. **2011** Clinicopathological features of senile systemic amyloidosis: an ante- and post-mortem study. *Mod. Pathol.* 24, 1533-1544
- Usov I., Adamcik J., Mezzenga R. **2013** Polymorphism complexity and handedness inversion in serum albumin amyloid fibrils. *ACS Nano* 7, 10465–10474
- Van Holde K. E., Johnson C., Ho P. S. **2005** Principles of Physical Biochemistry: Second Edition. *Prentice Hall*
- Virchow R. **1854** Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Virchow's Arch. Pathol. Anat. Klin. Med.* 6, 135–138
- Vos J.H., Gruys E., **1985** Amyloid in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 22, 347–354
- Waugh D. F. **1944** The linkage of corpuscular protein molecules. I. A fibrous modification of insulin *J. Am. Chem. Soc.* 66, 663–663
- Waugh D. F. **1946** A fibrilous modifications of insulin. I. The heat precipitate of insulin. *J. Am. Chem. Soc.* 68, 247-250
- Waugh D. F., Wilhelmson D. F., Commerford S. L., Sackler M.L. **1953** Studies of the Nucleation and Growth Reactions of Selected Types of Insulin Fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2592–2600
- Waugh D. F. **1957** A mechanism for the formation of fibrils from protein molecules. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49, 145-164
- Weiss M. A., Nguyen D. T., Khait I., Inouye K., Frank B. H., Beckage M., O'Shea E., Shoelson S. E., Karplus M., Neuringer L. J. **1989** Two-dimensional NMR and photo-CIDNP studies of the insulin monomer assignment of aromatic resonances with application to protein folding, structure, and dynamics. *Biochemistry* 28, 9855–9873
- Weissmann C., Enari M., Klöhn P. C., Rossi D., Flechsig E. **2002** Molecular biology of prions. *Acta Neurobiol. Exp.* 62, 153-166

- White H. E., Hodgkinson J. L., Jahn T. R., Cohen-Krausz S., Gosal W. S., Muller S., Orlova E. V., Radford S. E., Saibil H. R. **2009** Globular tetramers of β 2-microglobulin assemble into elaborate amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 389, 48-57
- Whittemore N. A., Mishra R., Kheterpal I., Williams A. D., Wetzel R., Serpersu E. H. **2005** Hydrogen-deuterium (H/D) exchange mapping of A β 1-40 amyloid fibril secondary structure using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 44, 4434-4441
- Whittingham J. L., Scott D. J., Chance K., Wilson A., Finch J., Brange J., Dodson G. G. **2002** Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *J. Mol. Biol.* 318, 479-490
- Williams A. D., Portelius E., Kheterpal I., Guo J., Cook J. D., Xu Y., Wetzel R. **2004** Mapping Abeta Amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 335, 833-842
- Wolfe L. S., Calabrese M. F., Nath A., Blaho D., Miranker A. D., Xiong Y. **2010** Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 16863-16868
- Wolffs M., George S. J., Tomovic Z., Schenning A. P. H. J., Meijer E. W. **2007** Macroscopic Origin of Circular Dichroism Effects by Alignment of Self-Assembled Fibers in Solution, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8203-8205
- Woody A. Y., Reisbig R. R., Woody R. W. **1981** Spectroscopic studies of Congo Red binding to RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* 655, 82-88
- Woźniak K., Mallinson P. R., Smith G. T., Wilson C. C., Grech E. **2003** Role of C-H...O hydrogen bonds in the ionic complexes of 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene. *J. Phys. Org. Chem.* 16, 764-771
- Wu C., Wang Z., Lei H., Duan Y., Bowers M. T., Shea J. E. **2008** The binding of thioflavin T and its neutral analog BTA-1 to protofibrils of the Alzheimer's disease Abeta (16-22) peptide probed by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* 384, 718-729
- Wu C., Biancalana M., Koide S., Shea J. E. **2009** Binding modes of Thioflavin-T to the single-layer beta-sheet of the peptide self-assembly mimics. *J. Mol. Biol.* 394, 627-633
- Xu W., Su H., Zhang J. Z. H., Mu Y. **2012** Molecular dynamics simulation study on the molecular structures of the amylin fibril models. *J. Phys. Chem. B* 116, 13991-13999
- Yang C., Mori T., Origane Y., Ko Y. H., Selvapalam N., Kim K., Inoue Y. **2008** Highly stereoselective photocyclodimerization of alpha-cyclodextrin-appended anthracene mediated by gamma-cyclodextrin and cucurbit[8]uril: a dramatic steric effect operating outside the binding site. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8574-8575
- Yoshimura Y., Lin Y., Yagi H., Lee Y. H., Kitayama H., Sakurai K., So M., Ogi H., Naiki H., Goto Y. **2012** Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 14446-1445

- Zandomeneghi G., Krebs M. R. H., McCammon M. G., Fandrich M. **2004** FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci.* 13, 3314–3321
- Zako T., Sakono M., Hashimoto N., Ihara M., Maeda M. **2009** Bovine Insulin Filaments Induced by Reducing Disulfide Bonds Show a Different Morphology, Secondary Structure, And Cell Toxicity from Intact Insulin Amyloid Fibrils. *Biophys. J.* 96, 3331–3340
- Zhong Q., Inniss D., Kjoller K., Elings V. **1993** Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surf Sci Lett.* 290: L688-L692
- Zsila F., Bikádi Z., Simonyi M. **2003** Molecular basis of the Cotton effects induced by the binding of curcumin to human serum albumin *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 2433-2444

Wykaz publikacji autora

1. **Master and Slave Relationship Between Two Types of Self-Propagating Insulin Amyloid Fibrils**, Surmacz-Chwedoruk W., Babenko V., Dzwolak W., *Journal of Physical Chemistry B* 2014, 118, 13582-13589
2. **Supramolecular photochirogenesis with functional amyloid superstructures**, Nishijima M., Tanaka H., Yang C., Fukuhara G., Mori T., Babenko V., Dzwolak W., Inoue Y., *Chemical Communications* 2013, 49, 8916-8918
3. **Vortex-induced amyloid superstructures of insulin and its component A- and B-chains**, Babenko V., Piejko M., Wojcik S., Mak P., Dzwolak W., *Langmuir* 2013, 29, 5271-5278
4. **Amino acid sequence determinants in self-assembly of insulin chiral amyloid superstructures: Role of C-terminus of B-chain in association of fibrils**, Babenko V., Dzwolak W., *FEBS Letters* 2013, 587, 625-630
5. **Conformational memory effect reverses chirality of vortex-induced insulin amyloid superstructures**, Dzwolak, W., Surmacz-Chwedoruk W., Babenko, V., *Langmuir* 2013, 29, 365-370
6. **On the DMSO-Dissolved State of Insulin: A Vibrational Spectroscopic Study of Structural Disorder**, Dzwolak, W., Kalinowski J., Johannessen C., Babenko, V., Zhang G., Keiderling T., *Journal of Physical Chemistry B* 2012, 116, 11863–11871
7. **Thioflavin T forms a non-fluorescent complex with α -helical poly-L-glutamic acid**, Babenko, V., Dzwolak, W., *Chemical Communications* 2011, 47, 10686-10688
8. **Chiral superstructures of insulin amyloid fibrils**, Babenko, V., Harada, T., Yagi, H., Goto, Y., Kuroda, R., Dzwolak, W., *Chirality* 2011, 23, 638-646
9. **Insulin amyloid superstructures as templates for surface enhanced raman scattering**, Wojcik, S., Babenko, V., Dzwolak, W., *Langmuir* 2010, 26, 18303-18307

Lista osiągnięć naukowych autora

UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH

- 09.2012-02.2014 Kierownik grantu badawczego Preludium Narodowego Centrum Nauki „*Nowe spojrzenie na oddziaływanie dokujące pomiędzy tioflawiną T a nieprawidłowo zwiniętymi białkami*”
- 2009 – 2012 Udział w realizacji zadań projektu „*Chiralna bifurkacja*” – grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego realizowany na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, kierownik Wojciech Dzwolak

STAŻE

- 11.2012 Staż w grupie prof. T. Keiderlinga na University of Illinois, Stany Zjednoczone
Pomiary wibracyjnego dichroizmu kołowego chiralnych agregatów insuliny dysocjujących w DMSO.
- 12.2009 oraz 02.2010 Staż w grupie prof. A. Roger, University of Warwick, Wielka Brytania
Badanie agregacji insuliny w przepływie laminarnym.
- 1-4.12.2009 *Circular and Linear Dichroism Workshop*, University of Warwick, Wielka Brytania

SZKOLENIA

- 24-28.01.2011 *XV SCHOOL OF PURE AND APPLIED BIOPHYSICS Protein Stability and Pathways of Self-Assembly*, Wenecja, Włochy
Prezentacja plakatu **α -Helical polyglutamic acid forms a non-fluorescent complex with Thioflavin T**
- 15-19.11.2010 *Training in Metrology in Chemistry*, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski
- 10.2010 *Advanced crystallography course*, Laboratorium Badań Strukturalnych, Uniwersytet Warszawski
- 1-4.12.2009 *Circular and Linear Dichroism Workshop*, University of Warwick, Wielka Brytania
Prezentacja plakatu **Chiral Bifurcation in Aggregating Insulin**

STYPENDIA I WYRÓŻNIENIA

- 2011/2012, 2013/2014 Stypendium naukowe z dotacji projakościowej
- 2012 Laureatka konkursu w programie stypendialno-szkoleniowym „Doktoraty dla Mazowsza II”
- 2010/2011;2011/2012, 2012/2013 Stypendium dla najlepszych doktorantów Uniwersytetu Warszawskiego

KONFERENCJE

- 20-23.07.2013 *The 27th Annual Symposium of The Protein Society, Boston, USA*
Prezentacja plakatu **Role of aminoacid sequence in the chiral association of amyloid fibrils**
- 17.05.2013 *ChemSession'13: X, Warszawa*
Prezentacja plakatu **Role of aminoacid sequence in the chiral association of amyloid fibrils**
- 06.02.2013 *Konferencja programu "Doktoraty dla Mazowsza II", Warszawa*
Wystąpienie ustne **Badanie chiralnych superstruktur amyloidowych**
- 06-08.09.2012 *Computational Molecular Biology 2012, Teresin*
Prezentacja plakatu **α -Helical polyglutamic acid forms a non-fluorescent complex with Thioflavin T**
- 25-28.08.2011 *Amyloid Fibrils, Prions and Precursors: Molecules for Targeted Intervention, Haale, Niemcy*
Prezentacja plakatu **α -Helical polyglutamic acid forms a non-fluorescent complex with Thioflavin T**