

CHALMERS



Spektroskopisk karaktärisering av färgämnen som kan detektera patogena proteinaggregat

Spectroscopic characterization of dyes for detection of pathogenic protein aggregates

Kandidatarbete inom civilingenjörsprogrammet Bioteknik

BAHARAN ALIDOOSTI
HANNA GRAUERS WIKTORIN
AXELIA HANSSON
EVELINA LE COMTE
EMELIE LINDAHL WESÉN
ANNA WENGER

Institutionen för kemi och bioteknik
Avdelningen fysikalisk kemi
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2012
Kandidatarbete nr KBTX01-12-09

Sammanfattning

Det finns många allvarliga sjukdomar, såsom Alzheimersdemens och Parkinsons sjukdom, som är kopplade till att felveckade proteiner bildar aggregat, så kallade amyloida fibriller. De amyloida fibrillerna kan ansamlas i vävnader och förstöra organ i kroppen. Alla amyloida fibriller har en likartad β -flakstruktur som är oberoende av aminosyrasekvensen hos det specifika protein de bildas ifrån. I detta projekt utfördes *in vitro* studier på amyloida fibriller samt karaktärisering av två klassiska fibrillbindande färgämnen, Thioflavin-T (ThT) och 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS), och åtta nya potentiella fibrillbindande färgämnen med hjälp av spektroskopiska metoder. Studierna utfördes på de två modellproteinerna bovint insulin och lysozym från hönsäggvita (HEWL).

Inledningsvis karaktäriserades modellproteinerna i monomer och fibrillär form med avseende på sekundärstruktur med hjälp av cirkulär dikroism (CD) och små skillnader mellan modellfibrillerna observerades. Dessa skillnader var dock inte tillräckligt stora för att några slutsatser skulle kunna dras angående modellfibrillernas strukturella olikheter. Med hjälp av fluorescensspektroskopi framställdes bindningskurvor som bekräftade de strukturella skillnaderna mellan modellfibrillerna. Resultaten från bindningskurvorna tillsammans med resultaten från linjär dikroism (LD) visar att ThT binder lika starkt till insulin- och lysozymfibriller, men att ThT har fler bindningssäten på lysozymfibriller. Motsvarande studier med ANS visade att ANS binder starkare till lysozymfibriller än till insulinfibriller, men att ANS har fler bindningssäten på insulinfibriller.

I nästa steg undersöktes åtta nya färgämnen med avseende på amyloidbindning och potential för framtida karaktärisering av amyloida fibriller. Studier med LD visar att sju färgämnen (α CN-DIR, DIR, OTB-SO₃, MGT-1, MGT-2, MGT-3 och MG-BisT-Alkyne) av de åtta studerade binder till amyloida fibriller och att denna bindning sker mer parallellt än vinkelrätt till insulinfibrillernas långaxel. Fyra av dessa, OTB-SO₃, α CN-DIR, DIR och MGT-3, undersöktes också för bindning till lysozymfibriller. Resultaten visar att samtliga binder mer parallellt än vinkelrätt till lysozymfibrillens långaxel. LD utvärderades även som ett high-throughput screening-verktyg där vi drar slutsatsen att LD, med vissa begränsningar, fungerar relativt bra för detta ändamål.

Abstract

Several serious diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's disease, are associated with aggregation of misfolded proteins. These aggregates are called amyloid fibrils and their deposition in tissue and around organs may lead to fatal damage. Regardless of the native structure of the protein, all amyloid fibrils share a common β -sheet structure. Spectroscopic methods are applied in this project in order to study amyloid fibrils *in vitro* and to characterize two amyloid specific dyes, Thioflavin-T (ThT) and 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS), and eight potentially new fibril binding dyes. Bovine insulin and hen egg white lysozyme (HEWL) are used as model proteins in these studies.

Circular dichroism (CD) was used to characterize the secondary structure of the model proteins in monomeric and fibrillar form and small differences between the model fibrils were detected. However, these differences were not significant enough in order for us to draw any conclusions about the structural differences of the model fibrils. Fluorescence spectroscopy was used to produce binding curves which confirmed the dissimilarities between the model fibrils. The results from the binding curves and the studies with linear dichroism (LD) show that ThT binds as strong to insulin fibrils as to lysozyme fibrils, but that ThT has more binding sites on lysozyme fibrils. Corresponding studies with ANS showed that ANS binds more strongly to lysozyme fibrils than to insulin fibrils, but that ANS has more binding sites on insulin fibrils.

Eight new potential fibril binding dyes were examined and, using LD, seven of these were identified for binding to insulin fibrils. These seven dyes are α CN-DIR, DIR, OTB-SO₃, MGT-1, MGT-2, MGT-3 and MG-BisT-Alkyne and they all bind in an orientation more parallel than perpendicular to insulin fibrils. Four of these, OTB-SO₃, α CN-DIR, DIR and MGT-3, were examined with lysozyme fibrils using LD. The results show that they all bind in an orientation more parallel than perpendicular to lysozyme fibrils. LD was also evaluated as a high throughput screening tool and we draw the conclusion that LD, with some limitations, is rather good for this task.

This report is written in Swedish.

Innehållsförteckning

1 Inledning.....	1
1.1 Projektets syfte	1
1.2 Avgränsningar inom projektet	2
2 Teori – amyloida fibriller, färgämnen och metoder inom projektets ramar	2
2.1 Amyloida fibriller: historiskt perspektiv och molekylära egenskaper.....	2
2.2 Färgämnen för att studera amyloida fibriller	4
2.3 Spektroskopiska metoder.....	4
2.3.1 Absorbans inom UV-VIS-området	4
2.3.2 Fluorescens	5
2.3.3 Cirkulär dikroism.....	6
2.3.4 Linjär dikroism.....	7
3 Utförande – processen för det laborativa arbetet	7
3.1 Grundläggande laborationsmoment.....	7
3.1.1 Kemikalier.....	7
3.1.2 Protokoll för bildande av fibriller	7
3.1.3 Verifiering av fibrillbildning.....	8
3.1.4 Koncentrationsbestämning med hjälp av absorbans	8
3.2 Kinetikstudier	9
3.3 Bestämning av proteiners sekundärstruktur med hjälp av CD	9
3.4 Bindning av färgämnen till amyloida fibriller	9
3.4.1 Bestämning av bindning av färgämnen till amyloida fibriller med LD.....	9
3.4.2 Kvantitativ bindning av färgämnen till amyloida fibriller med fluorescens.....	10
3.4.3 Bestämning av färgämnens fibrillspecificitet med hjälp av fluorescens	10
4 Resultat.....	11
4.1 Undersökning av amyloida fibrillers bildning med kinetikstudier	11
4.2 Bestämning av sekundärstruktur med CD	11
4.2.1 Isolering av amyloida fibriller och jämförelser av monomera och fibrillära proteinprover.....	11
4.2.2 Jämförelser av amyloida fibriller bildade under olika experimentella betingelser..	12
4.3 Bindning av ThT och ANS till amyloida fibriller	14
4.3.1 Titreringsserier med fluorescensspektroskopi	14
4.3.2 Studier av bindning till amyloida fibriller av ThT respektive ANS med LD.....	16
4.4 Karaktärisering av nya färgämnenas bindning till amyloida fibriller	17
4.4.1 De nya färgämnenas bindning till amyloida fibriller med LD.....	17
4.4.2 De nya färgämnenas fluorescens med amyloida fibriller	20
5 Diskussion	21

5.1 Bildning av insulin- och lysozymfibriller.....	21
5.2 Amyloida fibrillers sekundärstruktur.....	22
5.3 Karakterisering av amyloida fibriller med hjälp av ThT och ANS	23
5.4 Skillnader mellan ThT och ANS	24
5.5 Nya färgämnen som binder till amyloida fibriller	25
6 Slutsatser och rekommendationer	27
7 Källförteckning.....	28

1 Inledning

I dagens samhälle finns det många allvarliga sjukdomar som orsakas av felveckade proteiner som kan aggregera och därigenom bli patogena. Proteinaggregat, eller så kallade amyloida fibriller, har en ordnad β -flakstruktur som är likartad för alla amyloida fibriller oberoende av vilket protein de bildats från. De amyloida fibrillerna kan ansamlas i vävnader och förstöra organ i kroppen (Dobson, 2003). Alzheimersdemens och Parkinsons sjukdom är exempel på neurodegenerativa sjukdomar som orsakas av amyloid fibrillbildning (Chiti, 2006). För att komma ett steg närmare att kunna bota dessa amyloidrelaterade sjukdomar är det viktigt att få ökad förståelse om amyloid fibrillbildning. De flesta proteiner kan bilda amyloida fibriller *in vitro* om de utsätts för destabiliserande betingelser, vilket möjliggör kontrollerade studier av modellfibriller. Detta kan exempelvis ge information om hur och under vilka betingelser proteiner bildar amyloida fibriller samt öka förståelsen för hur de interagerar med andra molekyler, till exempel färgämnen.

Färgämnen används för att detektera och karaktärisera amyloida fibriller och för att följa deras bildningsförlopp i biofysikaliska studier, men även för att färga amyloida fibriller i biologiska vävnader (Hawe, 2008). Därför är det viktigt att förstå i detalj hur färgämnen fungerar och vad exakt de rapporterar om. Det finns även ett stort behov av nya amyloidspecifika reporter-molekyler för positronemissionstomografiskanning (PET) av hjärnan för att kunna diagnostisera neurodegenerativa sjukdomar (Mathis, 2002). Två vanligt använda färgämnen i amyloidstudier, Thioflavin-T (ThT) och 1-anilinonaphthalene-8-sulfonat (ANS), jämförs alltmer med nya färgämnen i förhoppning att hitta alternativ med ökad känslighet respektive selektivitet vid bindning till amyloida fibriller (Volkova, 2007). Insulin- och lysozymfibriller kan användas som modellfibriller för att studera bindning av färgämnen till amyloida fibriller (Buell, 2011). Spektroskopiska metoder (Nilsson, 2004) såsom absorbans, fluorescens, cirkulär- och linjär dikroism kan användas för att studera dessa bindningar.

1.1 Projektets syfte

Det övergripande syftet med projektet är att studera hur olika färgämnen interagerar med amyloida fibriller. Proteinerna bovint insulin samt lysozym från hönsäggvita (HEWL från engelskans Hen Egg White Lysozyme) används som modellfibriller i dessa studier.

Ett av syftena är att utvärdera de amyloida fibrillernas bildande vid olika experimentella betingelser för att undersöka om det är möjligt att erhålla amyloida fibriller som är strukturellt olika och därmed kan antas interagera med färgämnen på olika sätt. Anledningen till detta är att man då skulle kunna undersöka om färgämnen är fibrillspecifika (binder till alla amyloida fibriller) eller om de enbart binder till en viss typ av amyloida strukturer. För att minska påverkan av olika aminosyrasekvenser vid bindning av molekyler är det fördelaktigt om de två strukturellt olika fibrillerna kan skapas från samma protein, men det är även möjligt att jämföra amyloida fibriller från olika proteiner.

De olika modellfibrillerna ska användas för att studera hur två vanligt använda färgämnen, ThT och ANS, binder till amyloida fibriller. Interaktionerna studeras genom att undersöka hur färgämnen binder till fibriller, parallellt med eller vinkelrätt mot fibrillernas långaxel, samt om de två ämnena, helt eller delvis, binder till samma bindningssäten.

I syfte att även hitta nya molekyler som interagerar med amyloida fibriller utvärderas åtta nya färgämnen. Dessa har tagits fram för att binda till globulära (veckade) proteiner samt har molekylstrukturer som indikerar att de även skulle kunna binda till amyloida fibriller. Målet är att avgöra om färgämnen binder till amyloida fibriller och i så fall studera på vilket sätt de

binder. Dessa färgämnen kommer även användas för att utvärdera om linjär dikroism skulle kunna användas som ett high-throughput screening-verktyg, det vill säga om linjär dikroism kan utnyttjas för att snabbt urskilja de molekyler i en komplex blandning som binder till amyloida fibriller.

1.2 Avgränsningar inom projektet

Under laborationsdelen kommer endast undersökning av amyloida fibriller *in vitro* att genomföras eftersom de spektroskopiska metoder som kommer att användas inte fungerar för *in vivo* studier.

Tidsaspekten är den främsta anledningen till att endast amyloida fibriller av proteinerna bovint insulin och HEWL studeras. Protokoll för bildande av amyloida fibriller som tar mer än 20 dygn kommer inte beaktas.

2 Teori – amyloida fibriller, färgämnen och metoder inom projektets ramar

I detta kapitel introduceras begreppet amyloida fibriller. Även en sammanfattning ges angående vad som är känt om amyloida fibrillers interaktioner med olika färgämnen. Därefter beskrivs de spektroskopiska metoder som används i projektet.

2.1 Amyloida fibriller: historiskt perspektiv och molekylära egenskaper

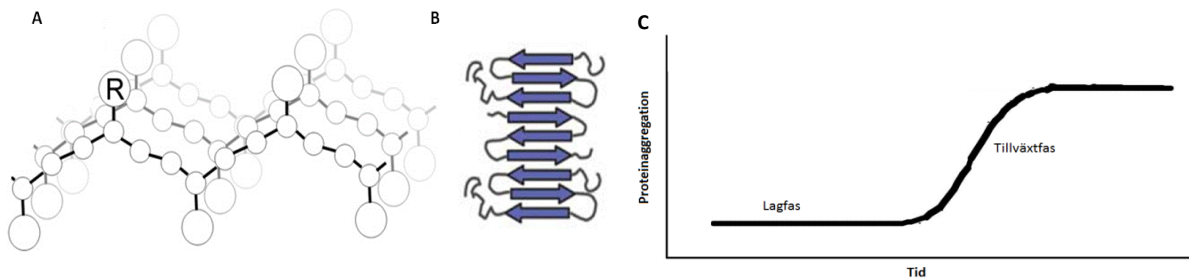
Amyloida fibriller har studerats sedan 1800-talet och är fortfarande aktuella på grund av deras starka koppling till ett antal svåra sjukdomar som i dagsläget är obotliga. Under 1800-talet observerades många likartade makroskopiska abnormaliteter från olika vävnadsprover. De fick år 1854 namnet amyloid (cellulosaliknande) eftersom de likt cellulosa kunde infärgas med jod (Virchow, 1854). År 1859 visade Friedreich och Kekule att det inte alls var cellulosa utan proteiner som orsakade abnormaliteterna i vävnaderna, vilket beskrivs i en översiktsartikel av Sipe et al. (Sipe, 2000). Forskningen på amyloider har sedan år 1854 fortskridit och med teknikens utveckling lett till att amyloida fibriller har kunnat studeras på en allt mer avancerad nivå. I en studie med elektronmikroskopi på både amyloider framställda *in vitro* och amyloider utvunna från vävnadsprover visade det sig att dessa hade fibrillär morfologi (Cohen, 1959), därav namnet amyloida *fibriller*. Flera efterföljande studier har med bland annat röntgendiffraktion och NMR visat att alla amyloida fibriller har en övergripande β -flakstruktur (se till exempel översiktsartikeln av Sunde et al., 1997).

Idag är det välkänt att amyloida fibriller är aggregat av felveckade proteiner som ansamlas i vävnader och förstör organ i kroppen (Chiti, 2006). De flesta proteiner kan bilda amyloida fibriller under destabiliserande förhållanden, exempelvis lågt pH (Kelly, 1998) och hög temperatur (Arnaudov, 2005). Varje sjukdom som orsakas av felveckade proteiner är dock associerad med ett, eller ett fåtal, specifika protein. Till exempel är peptiden amyloid- β och proteinet α -synuclein inblandade i Alzheimerdemens respektive Parkinsons sjukdom (Chiti, 2006).

Alla amyloida fibriller har stora strukturella likheter i form av en övergripande β -flakstruktur, även om de proteiner som bildar de amyloida fibrillerna har olika aminosyrasekvenser (Chiti, 2006). Amyloida fibriller är cirka 10 nm i diameter och består av så kallade protofilament, oftast 2-6 stycken, som vardera är 2-5 nm i diameter och som tvinnas samman längsmed fibrillens långaxel (Serpell, 2000). Protofilamenten består i sin tur av polypeptidkedjor med β -flakkonformation och dessa flak är orienterade vinkelrätt mot fibrillens långaxel. Sekvenserna mellan β -flaken har vanligen en oregelbunden struktur (bestående av loopar och random coils)

och kallas hädanefter peptidsvansar (**figur 1B**). β -flaken hålls samman av vätebindningar mellan peptidbindningarna i proteinets ryggrad (Sunde, 1997). Proteinets sidokedjor sticker ut vinkelrätt från β -flaken och ordnas i ”rader” längs fibrillaxeln på båda sidorna av β -flaken. Mellan sidokedjorna bildas ”fårer” (Krebs, 2004) som ligger parallellt med fibrillens långaxel och exponeras mot lösningsmedlet (Biancalana, 2010) (**figur 1A**). **Figur 2C** visar en elektronmikroskopibild av proteinet amyloid- β i fibrillär form.

Amyloida fibriller bildas genom en polymeriseringsreaktion där proteinmonomerer adderas till änden av den växande fibrillen (Cohen, 2011). Typiskt krävs destabiliserande förhållanden för att bryta proteinets normala tertiärstruktur (Arnaudov, 2005). **Figur 1C** illustrerar schematiskt en tillväxtkurva för amyloida fibriller. Under lagfasen bildas så kallade kärnor bestående av små proteinaggregat med en sådan struktur att de fungerar som startstrukturer för bildande av de amyloida fibrillerna. Då tillräckligt många kärnor bildats sker en ökning av de amyloida fibrillernas tillväxt då fler och fler proteinmonomerer binder till de växande fibrillerna (Nilsson, 2004). De amyloida fibrillernas slutliga struktur kan påverkas av omgivningens pH och temperatur vid deras bildning (Kelly, 1998 och Arnaudov, 2005).

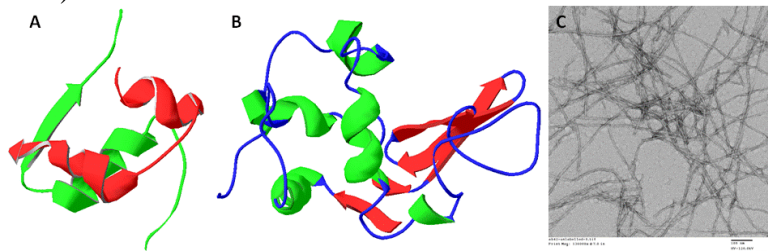


Figur 1. (A) Illustration av β -flakstrukturen hos amyloida fibriller, där R representerar en aminosyras sidokedja. ”Fårorna” mellan sidokedjorna ligger parallellt med de amyloida fibrillernas långaxel och det finns flera fåror per fibrill (anpassad från Krebs, 2005). (B) Övergripande struktur för β -flakkonformationen. Pilarna representerar β -flaken som är sammanlänkade med de delar av peptidkedjan som inte är med i β -flakkonformationen, hädanefter kallade peptidsvansar (Chiti, 2006). (C) Schematisk representation av en typisk tillväxtkurva för amyloida fibriller med mängden amyloid avsatt mot reaktionstiden (anpassad från Nilsson, 2004). Lagfasen representerar den tid det tar för amyloidbildningsreaktionen att bilda kärnor (Nilsson, 2004). Den amyloida fibrillen bildas sedan genom en polymeriseringsreaktion där proteinmonomerer adderas till den växande amyloida fibrillen under tillväxtfasen och reaktionen avstannar när mängden monomert protein i lösningen minskar (Cohen, 2011).

Bovint insulin och lysozym från hönsäggvita (HEWL) är exempel på två modellproteiner som används för att studera amyloida fibriller *in vitro*. Insulin har använts i många studier (se till exempel Wigenius, 2011 och Buell, 2011) för att undersöka amyloida fibriller eftersom det är lätt att framställa och hantera fibriller från detta protein. **Figur 2A** och **2B** illustrerar insulin och lysozym i sin naturliga form. Lysozym är ett annat protein som ofta används som modell för att studera amyloid fibrillbildning (Arnaudov, 2005 och Carlsson, 2012). Lysozym är ett intressant alternativ till insulin, då det kan vara fördelaktigt med en annan fibrillstruktur än den insulin har. Att lysozym har en amyloid fibrillstruktur skild från motsvarande för insulin grundar sig i att dessa proteiner har olika aminosyrasekvens och att proteinerna är olika stora (Jaimohan, under tryckning och Phillips, 1967).

Det finns flera sätt att studera proteiner i fibrillär form, exempelvis röntgendiffraktion, NMR (Sunde, 1997), transmissionelektronmikroskopi (TEM), fourier transform infraröd spektroskopi (FTIR) och cirkulär dikroism (Nilsson, 2004). Ett annat vanligt förekommande sätt att studera amyloida fibriller är att använda färgämnen som binder till fibriller och ger upphov till fibrillspecifika signaler. Färgämnenas signaler kan sedan detekteras med

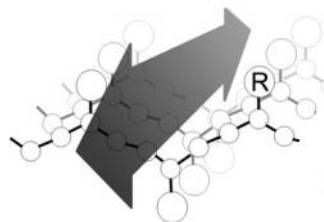
spektroskopiska metoder som exempelvis fluorescensspektroskopi och linjär dikroism (Buell, 2011).



Figur 2. (A) Modell över monomert bovint insulins ryggradsstruktur konstruerad med programmet SwissPDB Viewer. Färgerna grönt och rött representerar de två peptidkedjorna i proteinet som består av både α -helixar och β -flak i sin naturliga form. (B) Modell över monomert lysozyms (HEWL) ryggradsstruktur konstruerad med programmet SwissPDB Viewer. Färgerna grönt och rött representerar α -helixar respektive β -flak. (C) Avbildning av proteinet amyloid- β i fibrillformation tagen med transmissionelektronmikroskopi (TEM), där trådarna är fibriller (Esbjörner, opublicerade resultat).

2.2 Färgämnen för att studera amyloida fibriller

Det har utförts många studier på amyloida fibrillers interaktioner med färgämnen (se exempelvis följande översiktsartiklar; Groenning, 2007 och Biancalana, 2010) i syfte att erhålla ökad förståelse om till exempel amyloida fibrillers struktur och för att förbättra metoder för att detektera amyloida fibriller i kroppen. Standarden inom fibrillbindande färgämnen är Thioflavin-T (ThT), som har använts sedan år 1959 (Vassar, 1959). När ThT binder till de amyloida fibrillernas β -flakstruktur ger detta upphov till en ökad fluorescenssignal (Biancalana, 2010), som kan mätas med fluorescensspektroskopi. ThT är en linjär moleky (figur 4A) som binder till de amyloida fibrillerna genom att placera sig i fåror mellan β -flakens sidokedjor parallellt med fibrillernas långaxel (Krebs, 2004) (figur 3).



Figur 3. Pilen illustrerar var ThT binder till de amyloida fibrillernas β -flakstruktur. R representerar en sidokedja på en aminosyra (anpassad från Krebs, 2005).

Ytterligare information om amyloida fibrillers egenskaper kan erhållas genom att använda färgämnen som kompletterar ThT. Exempel på sådana färgämnen är 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) (figur 4B) och kongorött (CR, efter engelskans congo red). ANS ökar i fluorescensintensitet då det interagerar med hydrofoba ytor på proteiner (Hawe, 2008). Det har bland annat visat sig att ANS binder särskilt starkt till de proteinaggregat som är förstadiet till fullt utvecklade amyloida fibriller (Bolognesi, 2010). Proteinbindande färgämnen skulle kunna vara tänkbare kandidater som ytterligare komplement till ThT. Åtta sådana färgämnen studeras i projektet och visas i figur 4C-4J.

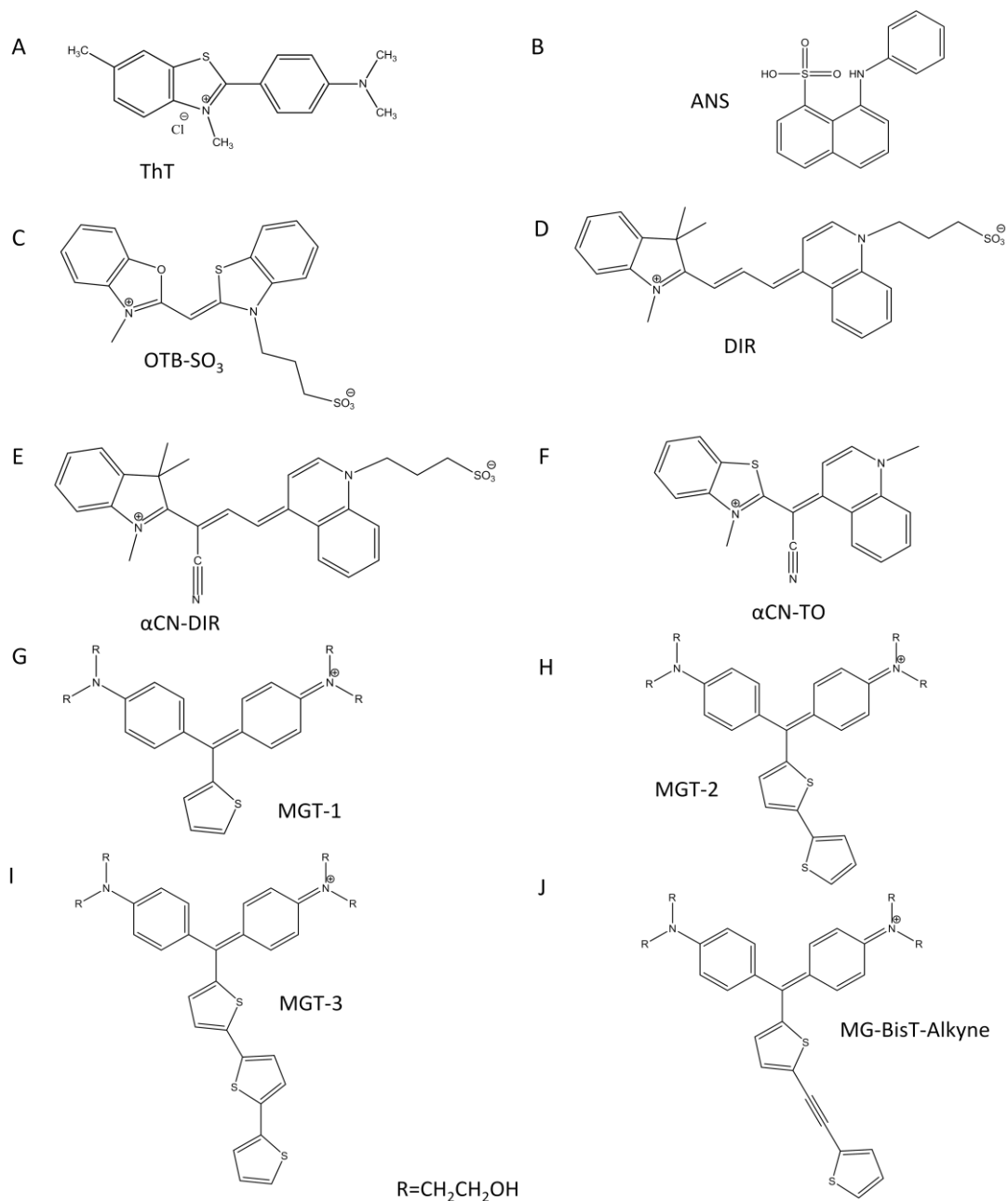
2.3 Spektroskopiska metoder

Fyra spektroskopiska metoder har använts i projektet och teorin bakom dessa presenteras i kommande avsnitt. Metoderna är absorbans, fluorescens, cirkulär dikroism och linjär dikroism.

2.3.1 Absorbans inom UV-VIS-området

Kemiska bindningar kan absorbera ljus genom att elektroner exciteras till högre energinivåer. Detta fenomen utnyttjas vid absorbansmätningar då skillnaden i intensitet mellan inskickat och utsänt ljus mäts. Absorbansen definieras som den logaritmiska kvoten mellan dessa värden, vilket beskrivs i Burrows, 2009. Utifrån absorbansen kan koncentrationen av ett ämne

beräknas med hjälp av Lambert Beers lag, $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, där A är absorbansen, ϵ är den molära absorptionskoefficienten, c är provets koncentration och l är kyvettens längd (se till exempel Workman, 1998). Olika molekyler absorberar ljus vid olika våglängder och utifrån detta väljs våglängdsregionen av det infallande ljuset. Proteiner absorberar huvudsakligen ljus under 300 nm och proteiners absorptionspektrum visar ett tydligt maximum vid 280 nm på grund av att aminosyror tyrosin och tryptofan absorberar ljus vid denna våglängd (Lakowicz, 2006). Absorbansen beror enbart av proteinets aminosyrasekvens och påverkas inte nämnvärt av proteinets tertiärstruktur (Gill, 1989).



Figur 4. Strukturformler för de färgämnen som ingår i projektet. (A) ThT. (B) ANS. (C) OTB-SO₃. (D) DIR. (E) α CN-DIR. (F) α CN-TO. (G) MGT-1. (H) MGT-2. (I) MGT-3. (J) MG-BisT-Alkyne.

2.3.2 Fluorescens

De senaste 30 åren har fluorescens använts i naturvetenskaplig forskning inom bland annat biokemi, medicinsk diagnostik och bioteknik (Lakowicz, 2006). Det som skiljer fluorescens-

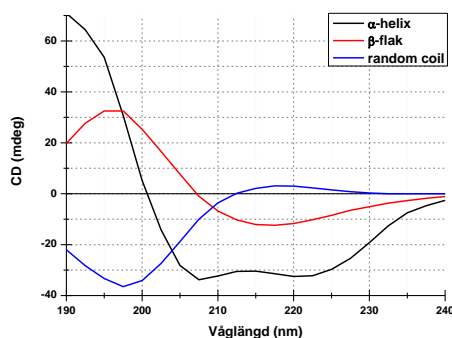
och absorbansmätningar åt är att absorbansen ger ett mått på det ljus som passerar ett prov utan att excitera molekyler (Burrows, 2009), medan fluorescens istället detekterar det ljus som emitteras till följd av excitation (Conchello, 2005). För att definieras som fluorescens krävs det att emissionen endast sker direkt efter att excitationen skett (Radley, 1935). Våglängden av det emitterade ljuset är generellt sett längre än motsvarande våglängd för det exciterande ljuset, vilket beror på energiförluster i det exciterade tillståndet (Lakowicz, 2006).

Fluorescensspektroskopi är en känslig metod som kan användas för att bland annat studera proteiner (Hawe, 2008). Detta är möjligt eftersom de aromatiska aminosyrorna fenylalanin, tyrosin och tryptofan är fluorescanta (Lakowicz, 2006). Ett annat alternativ för att studera proteiner med fluorescensspektroskopi är att använda proteinbindande fluorescanta molekyler, så kallade färgämnen. Då fluorescensen mäts från dem kan information om proteinernas egenskaper erhållas och färgämnen kan användas för att karaktärisera till exempel ythydrofobicitet, veckningsintermediärer och fibrillstruktur (Hawe, 2008). Förändringar i ett färgämnes fluorescensintensitet kan också användas för att till exempel verifiera amyloidbildning från monomert protein, för att följa amyloidbildningskinetik, samt för att utvärdera interaktioner mellan proteiner och fluorescanta färgämnen (Groenning, 2007).

2.3.3 Cirkulär dikroism

Cirkulär dikroism (CD) är en metod som baseras på polariserat ljus och som har använts sedan 1960-talet för att studera molekylära strukturer, däribland proteiners sekundärstrukturer (Whitmore, 2007). Definitionen av CD är skillnaden i absorbans mellan vänster- och högercirkulärpolariserat ljus, $CD = A_L - A_R$ (Greenfield, 2007). Cirkulärpolariserat ljus är ljus vars elektromagnetiska fält har en konstant amplitud och som breder ut sig i form av en helix i ljusets riktning. CD kan endast mätas på kirala molekyler (molekyler med avsaknad av ett spegelplan), eftersom endast dessa interagerar olika med vänster- och högercirkulärpolariserat ljus (Rodger, 1997). Detta är också grunden till att CD kan användas för att studera proteiners sekundärstrukturer i och med att peptidbindningarna i proteinerna är kirala. Elektronövergångarna i proteinernas amidbindningar påverkas av deras geometri. Detta gör i sin tur att olika sekundärstrukturer ger upphov till olika CD-spektra, vilket gör att de kan särskiljas (Whitmore, 2007).

CD ger endast information om proteiners övergripande struktur, till skillnad från exempelvis NMR som även kan ge information om de enskilda sidokedjornas orientering samt om hur proteinets olika delar interagerar med varandra och bildar en tredimensionell struktur (Kelly, 2005). Strukturelement som kan identifieras i CD är bland annat α -helix, β -flak samt random coil (**figur 5**). Spektrumet från ett protein som innehåller olika sekundärstrukturer visar ett medelvärde av dessa karaktäristiska signaler där störst bidrag ges från den vanligast förekommande strukturen (Greenfield, 1969). De spektra som visas i **figur 5** kan användas som referens för att dra slutsatser kring den okända strukturen hos proteinerna i ett CD-prov.



Figur 5. Karaktäristiska CD-spektra för olika sekundärstrukturer hos proteiner. Utifrån skillnaderna mellan dessa spektra kan proteiners sekundärstrukturer identifieras (Greenfield, 1969). De karaktäristiska dragen för de olika strukturernas spektrum är deras form samt våglängderna vid deras respektive toppar. Mätvärden hämtade från Greenfield, 1969.

2.3.4 Linjär dikroism

Linjär dikroism (LD) och CD är likartade metoder men i LD används linjärpolariserat ljus. LD definieras som differensen i absorption av ljus parallellt och vinkelrätt mot en orienteringsaxel i provet, $LD = A_{\parallel} - A_{\perp}$ (Rodger, 1997). Ursprungligen användes LD i huvudsak för att studera långa organiska molekyler (Nordén, 1972), men metoden har därefter applicerats på såväl DNA-molekyler (Nordén, 1992) som proteiner (Esbjörner, 2007). På senare tid har även amyloida fibriller och deras interaktioner med små molekyler, däribland färgämnen, studerats (Childers, 2009 och Wigenius, 2011).

För att mäta LD är det nödvändigt att molekylerna är orienterade, vilket kan utföras med hjälp av elektriskt fält, magnetiskt fält, sträckt polymerfilm eller visköst flöde (Bulheller, 2009). Den vanligaste flödescellen för orientering med visköst flöde är en cylindrisk Couette-cell där lösningen, innehållande molekylerna, placeras mellan en inre och en yttre cylinder där den ena roterar. Det linjärpolariserade ljuset sprids vinkelrätt mot flödesriktningen och fotonernas elektriska fält oscillerar i samma plan. En LD-mätning ger information om den orienterade molekylens struktur. Små molekyler, exempelvis färgämnen, kan inte själva orientera i det viskösa flödet och ger därmed endast upphov till LD-signaler om de interagerar med den orienterade makromolekylen, i vårt fall den amyloida fibrillen. Molekyler som inte binder till den orienterade makromolekylen detekteras inte i mätningen (Rodger, 1997).

3 Utförande – processen för det laborativa arbetet

Detta kapitel beskriver de metoder som har använts i projektet samt hur dessa har tillämpats för att uppnå projektets syfte.

3.1 Grundläggande laborationsmoment

I följande avsnitt listas de kemikalier som användes under projektet. En beskrivning av de metoder som användes för att bilda amyloida fibriller och verifiera dessa presenteras även. Slutligen beskrivs hur absorbans tillämpades vid koncentrationsbestämningar.

3.1.1 Kemikalier

De buffertar som användes under projektet var 0,1 M alternativt 0,05 M glycin-hydroklorid (GI-HCl) med pH 2,2 eller 2,0 samt 0,1 M natriumacetat (NaAc) med pH 4,0. Övriga kemikalier som användes var metanol, etanol, DMSO och tio olika färgämnen: ThT och ANS samt de nya färgämnena α CN-TO, α CN-DIR, DIR, OTB-SO₃, MGT-1, MGT-2, MGT-3 och MG-BisT-Alkyne (se **figur 4** för respektive struktur). MGT-1, MGT-2, MGT-3 och MG-BisT-Alkyne samlas under det gemensamma namnet MGT-molekyler och är alla lösta i DMSO/metanol (10/90 v/v). DIR, α CN-DIR och α CN-TO är lösta i metanol och OTB-SO₃ är löst i destillerat vatten. De åtta nya färgämnena var en gåva från professor Bruce Armitage (Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA). Proteinerna som användes var bovint insulin och lysozym. Alla kemikalier förutom de åtta nya färgämnena är köpta från Sigma-Aldrich.

3.1.2 Protokoll för bildande av fibriller

Insulinfibriller bildades genom att värma en lösning av insulinmonomerer (5 mg/ml) i GI-HCl-buffert (pH 2,2) vid 57°C i ett värmeblock över natt. Den resulterande lösningen hade synliga gelklumpar, innehållande olösliga amyloida fibriller, som centrifugerades ned med hjälp av en bordscentrifug under cirka en minut. Supernatanten innehöll lösliga amyloida fibriller och användes för fortsatta studier. Betingelserna baserades på ett protokoll från Wigenius, 2011, med en mindre modifiering av temperatur och proteinkoncentration.

Lysozymfibriller tillverkades genom att lösa upp monomert lysozym i buffert till en proteinkoncentration av 10 mg/ml. Tidiga försök i projektet visade att detta gav en rimlig fibrillkoncentration för fortsatta mätningar. I ett försök att framställa strukturellt olika amyloida fibriller från lysozym användes två olika destabiliserande betingelser. Dessa betingelser valdes baserat på ett protokoll från Arnaudov, 2005. Vid den första av dessa var temperaturen 57°C och lysozym löstes i GI-HCl-buffert med pH 2,0, vilket enligt protokollet skulle resultera i fibrillbildning efter fyra dygn. Vid den andra betingelsen höjdes temperaturen till 85°C och proteinet löstes i NaAc-buffert med pH 4,0. Amyloida fibriller skulle enligt detta protokoll bildas efter 11 dygn. Proverna inkuberades i värmeblock under dessa tidsperioder. Det visade sig att lysozymfibrillerna behövde separeras från kvarvarande monomerer. Detta utfördes genom att proverna centrifugerades i 20 minuter vid 13000 rpm, då tidigare studier visat att detta separerar lysozymfibriller från proteinstrukturer med lägre molekylvikt (Mališauskas, 2003). I ett ytterligare försök att ta fram två strukturellt olika amyloida fibriller, undersöktes det om skakning vid bildandet skulle påverka lysozymfibrillernas slutgiltiga struktur, eftersom detta indikerats i litteraturen (Nielsen, 2000).

3.1.3 Verifiering av fibrillbildning

Två metoder användes för att kontrollera om amyloida fibriller hade bildats: ThT-test och LD-mätningar. ThT-test utfördes i en Cary Eclipse fluorescensspektrofotometer (Agilent Technologies) och vi utnyttjade det faktum att fluorescensintensiteten ökar då ThT binder till amyloida fibriller (Biancalana, 2010). Med anledning av detta gjordes två mätningar, en med enbart ThT och buffert och en efter tillsats av proteinprov. Om fluorescensintensiteten ökade mellan dessa två mätningar kunde slutsatsen dras att det fanns amyloida fibriller i provet. ThT-test har typiskt utförts genom att tillsätta 20 µl proteinlösning samt 100 µl ThT (1,2 mM) till 1080 µl av den buffert som proteinet är löst i, vilket gav en slutkoncentration av ThT på 100 µM. Slutkoncentrationen av protein vid ThT-testen varierade med proteinlösningens koncentration.

Verifiering av fibriller med LD-mätning utfördes på proteinprovet i en LD-spektrofotometer (JASCO J-720). Ett LD-spektrum mättes och då ett utslag gavs vid proteiners λ_{\max} , 280 nm, påvisades amyloida fibriller i provet. Spektrumet baslinjekorrigerades genom att ett spektrum som mättes utan rotation subtraherades från det med rotation. Proteinmonomerer ger inte utslag i LD:n eftersom endast långa molekyler orienteras i ett visköst flöde (Buell, 2011).

3.1.4 Koncentrationsbestämning med hjälp av absorbans

Koncentrationen av både fibriller och färgämnen beräknades utifrån Lambert-Beers lag, $A = \epsilon \cdot c \cdot l$. Den molära absorptionskoefficienten och området där absorbansen avlästes (λ_{\max}) är specifika för molekylen i fråga (Workman, 1998). Kyvettens längd har genomgående under projektets gång varit 1 cm. Den molära absorptionskoefficienten samt λ_{\max} för de molekyler som användes i projektet presenteras i **tabell 1** nedan.

Tabell 1. λ_{\max} och absorptionskoefficient för proteiner samt färgämnen ingående i projektet.

Molekyl	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Molekyl	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Insulin ¹	280	5480	α CN-DIR ⁵	534	81600
Lysozym ²	280	37910	DIR ⁵	602	134000
ThT ³	412	35000	MGT-1 ⁵	639	72000
ANS ⁴	350	5000	MGT-2 ⁵	648	71900
OTB-SO ₃ ⁵	400	92400	MGT-3 ⁵	649	88900
α CN-TO ⁵	491	32500	MG-BisT-Alkyne ⁵	654	68600

Fotnoterna motsvarar följande källor: 1. Wigenius, 2011. 2. Arnaudov, 2005. 3. Groenning, 2007. 4. Yu, 1996. 5. Armitage, opublicerad data.

3.2 Kinetikstudier

Kinetikstudier med insulin respektive lysozym utfördes i närvaro av ThT i avseende att erhålla information om hur lång tid det tar för dessa proteiner att bilda amyloida fibriller. Syftet var att, utifrån kinetikstudierna, optimera protokollet för fibrillbildning för att erhålla maximalt utbyte av amyloida fibriller inom, för projektet, rimliga tidsramar.

Kinetikstudierna utfördes i en fluorescensspektrofotometer (Cary Eclipse, Agilent Technologies) och datapunkter mättes med tiominutersintervall för insulin och femminutersintervall för lysozym. Mätningarna utfördes till dess att fluorescenssignalen blivit konstant, vilket innebar att bildningen av amyloida fibriller hade avstannat. Försöken genomfördes vid ett flertal olika koncentrationer baserat på tidigare studier (Buell, 2011 och Arnaudov, 2005). Förhållandet mellan färgämne och insulinprotein baserades på Groenning, 2007 där bindningsstökiometrin mellan ThT och insulinfibriller bestämdes till 1:10. För att med säkerhet undvika att ThT blev den begränsande faktorn valdes istället förhållandet 1:1 i dessa försök. Motsvarande förhållande för lysozym valdes till 1:10 baserat på grundläggande försök tidigt i projektet som visade att lysozym inte bildar amyloida fibriller lika effektivt som insulin. För mycket ThT i kinetikexperiment bör dock undvikas eftersom det skulle kunna påverka kinetiken för amyloidbildningen.

ThT exciterades vid 440 nm under insulinstudierna och vid 450 nm under lysozymstudierna. Emissionen mättes vid 480 nm för både insulin och lysozym. Försöksupplägget för kinetikstudierna visas i **tabell 2**.

Tabell 2. Försöksupplägg för kinetikstudier för bildandet av amyloida fibriller från insulin respektive lysozym vid fyra olika koncentrationer.

Protein	Proteinkonc. (mg/ml)	pH	Temp. (°C)	Färgämne	Färgämneskonc. (µM)
Insulin	0,25; 0,5; 1; 2	2,2	57	ThT	4,0
Lysozym	2; 5; 10; 15	2,0	57	ThT	61,5

3.3 Bestämning av proteiners sekundärstruktur med hjälp av CD

Proteiners sekundärstrukturer studerades med CD i en JASCO J-810 spektropolarimeter. Mätningarna gjordes mellan 190 nm och 300 nm i en 0,1 mm kyvett och baslinjekorrigerades mot den buffert de amyloida fibrillerna bildades i. För att få starka CD-signaler, och för att kunna jämföra signaler mellan olika prov, användes en proteinkoncentration på 200 µM. Eftersom signalerna från CD-mätningar är svaga och därmed brusiga mättes minst 15 spektra i följd på varje prov. CD-spektrumet presenteras som ett medelvärde av dessa mätningar.

3.4 Bindning av färgämnen till amyloida fibriller

I kommande avsnitt beskrivs de LD-mätningar som utfördes för att identifiera bindning mellan färgämne och amyloida fibriller, de titreringsserier som utfördes för kvantifiering av antalet bindningssäten på modellfibrillerna samt utvärderingen av färgämnens fibrillspecificitet med fluorescensspektroskopi.

3.4.1 Bestämning av bindning av färgämnen till amyloida fibriller med LD

För att utvärdera huruvida ett färgämne binder till amyloida fibriller mättes LD med en JASCO J-720 på ett prov innehållande färgämne och fibriller. Provmängden som krävs för den Couette-cell som användes är 2 ml. För att uppnå denna volym späddes färgämnet och de amyloida fibrillerna med den buffert som fibrillerna bildades i. En fibrillkoncentration på

minst 10 μM och en färgämneskoncentration på 1-15 μM eftersträvades och färgämne titrerades gradvis till provet till dess att en tydlig LD-signal uppnåddes.

De amyloida fibrillerna, samt färgämnen som eventuellt har bundit till dessa fibriller, orienteras av skjuvflöde genom rotation av Couette-cellen. Rotationshastigheterna 50 rpm och 1000 rpm tillämpades i projektet för lysozym- respektive insulinfibriller. LD-spektrumet visar maximum eller minimum vid respektive molekyls λ_{max} . Detta innebär att det utöver LD-signalen för de amyloida fibrillerna (tydligast synlig genom topp vid 280 nm där aromatiska aminosyror absorberar), även syns en LD-signal vid λ_{max} för den bundna formen av färgämnet. Om LD-signalen för färgämnet är positiv har färgämnet bundit till amyloida fibriller mer parallellt än vinkelrätt mot fibrillens långaxel. Är LD-signalen däremot negativ har färgämnet bundit mer vinkelrätt än parallellt (Wigenius, 2011).

3.4.2 Kvantitativ bindning av färgämnen till amyloida fibriller med fluorescens

För att få en uppskattning av hur mycket färgämne som binder till amyloida fibriller kan en så kallad bindningskurva mätas upp. I projektet utnyttjades att fluorescensintensiteten från färgämnet kan antas vara proportionerlig mot mängden bundet färgämne. Bindningskurvorna genererades genom att utföra titreringsserier på amyloida fibriller med ökande färgämneskoncentration. Fluorescensintensiteten vid varje mätpunkt i titreringsserierna mättes med en Cary Eclipse fluorescensspektrofotometer (Agilent Technologies) i en 1 cm kyvett. Då mer färgämne successivt tillsattes ökade fluorescenssignalen, eftersom mer färgämne band till de amyloida fibrillerna. När fluorescenssignalen planade ut och blev konstant fanns det inte längre några tillgängliga bindningssäten på de amyloida fibrillerna kvar för färgämnesmolekylerna att binda till och mätningen avslutades.

Titreringsserierna utfördes på insulin- och lysozymfibriller med ThT respektive ANS separat. Utifrån tidiga studier i projektet valdes en ungefärlig fibrillkoncentration på 10 μM samt en startkoncentration av färgämne på 1 μM . Våglängdsintervall och bandbredd för emissions- och excitationljuset anpassades till aktuella färgämneskoncentrationer samt modellfibrill för att erhålla optimal signal. Fluorescensintensiteten mättes mellan 460 nm och 700 nm för ThT och motsvarande intervall för ANS var 365 nm till 700 nm. Tillsatsen av färgämne var inte konstant under hela titreringen, utan ökade successivt under titreringsseriernas gång efter att tidigare titreringspunkter analyserats.

En titreringsserie utfördes även på insulinfibriller med både ThT och ANS närvarande. Ett överskott av ThT valdes för att insulinfibrillernas bindningssäten skulle vara upptagna. Därefter titrerades ANS till provet och fluorescenssignalen mättes vid båda färgämnenas emissionsmaxima (450 nm för ThT och 350 nm för ANS). Denna titreringsserie utfördes för att erhålla information om var och hur starkt ANS binder till de amyloida fibrillerna jämfört med ThT.

3.4.3 Bestämning av färgämnens fibrillspecificitet med hjälp av fluorescens

För att undersöka huruvida färgämnen är fibrillspecifika mättes fluorescensintensiteten på prov innehållande färgämnen och monomert respektive fibrillärt insulin. Koncentrationen av monomert protein och fibrillärt protein var samma i de båda proverna. Även samma koncentration av färgämne eftersträvades i proverna. Som referens mättes fluorescensintensitet på färgämne i buffert. ThT och ANS undersöktes även med lysozym.

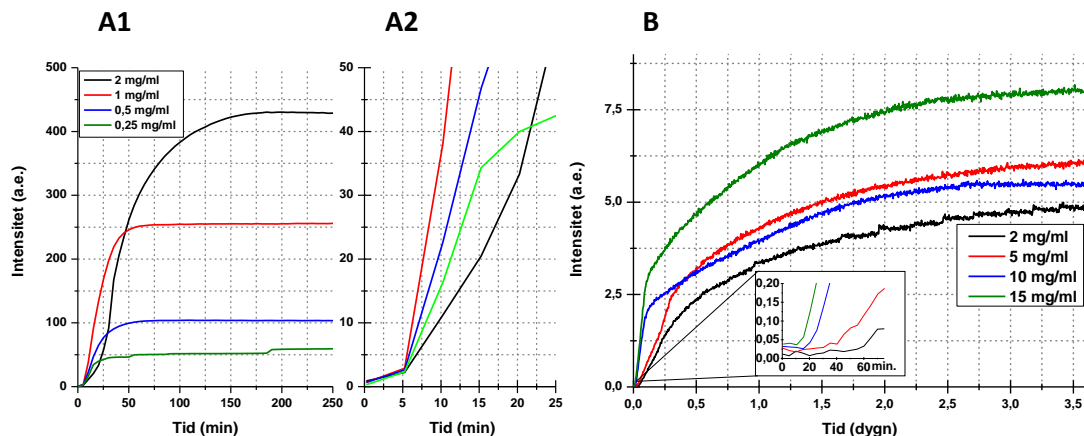
4 Resultat

I det här kapitlet presenteras resultaten från projektet. Vi har optimerat protokoll för fibrillbildning med insulin och lysozym, karaktäriserat fibrillernas sekundärstruktur med CD och undersökt hur fibrillerna interagerar med ThT och ANS samt de åtta nya färgämnen.

4.1 Undersökning av amyloida fibrillers bildning med kinetikstudier

För att fastställa den optimala tiden för fibrillbildning utfördes kinetikstudier (**figur 6**). Vid studierna mättes fluorescensintensiteten för ThT som en funktion av tiden. Fluorescensintensiteten ökar då ThT binder till de amyloida fibrillerna. Eftersom fler bindningssäten skapas då mer amyloida fibriller bildas ökar fluorescenssignalen från ThT under fibrillbildningen.

Resultaten visar att insulin bildar amyloida fibriller på mellan 50 och 180 minuter beroende på startkoncentration, vilket kan avläsas då kurvorna planar ut i **figur 6A1**. Motsvarande tid för bildningen av lysozymfibriller är cirka 3,5 dygn oberoende av startkoncentration (**figur 6B**). Amyloidbildningsreaktionerna har en kort lagfas innan fibrillbildningen startar. Denna lagfas är ungefär 10 minuter lång för insulin oberoende av startkoncentrationen (**figur 6A2**) och mellan 20 och 60 minuter lång för lysozym (**figur 6B**). För lysozym är lagfasens längd koncentrationsberoende. Lagfasen följs av en tillväxtfas, vilken sker snabbare för insulin än för lysozym. Detta resulterar i att insulin bildar amyloida fibriller på en kortare tid än lysozym.



Figur 6. Amyloidbildningskinetik. (A1) Bildande av insulinfibriller som funktion av tid vid fyra olika startkoncentrationer av monomert insulin i 0,1 M GI-HCl-buffert (pH 2,2) vid 57°C. Koncentrationen ThT var 4,0 μ M. Tillväxtfasen pågår fram till dess att fluorescensintensiteten blivit konstant vilket visar att det inte längre bildas några amyloida fibriller. (A2) Förstoring av lagfaserna från A1. (B) Bildande av lysozymfibriller vid fyra olika startkoncentrationer av monomert lysozym i 0,1 M GI-HCl-buffert (pH 2,0) vid 57°C. Koncentrationen ThT var 61,5 μ M. Tillväxtfasen pågår fram till dess att fluorescensintensiteten blivit konstant. Förstoringen visar lagfasen och tiden för bildandet av den amyloida fibrillkärnan.

4.2 Bestämning av sekundärstruktur med CD

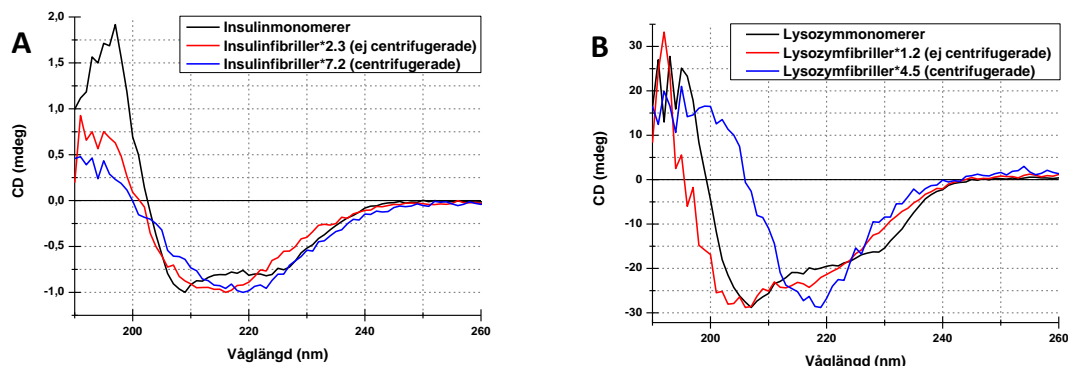
CD användes i två syften under projektet; dels för att studera skillnader i strukturen hos insulin- respektive lysozymprotein i monomer och fibrillär form och dels för att karaktärisera strukturella skillnader mellan dessa amyloida fibriller.

4.2.1 Isolering av amyloida fibriller och jämförelser av monomera och fibrillära proteinprover

Efter att lämplig inkubationstid för optimal amyloidbildning hade fastställts med kinetikstudier var nästa steg att undersöka hur effektivt de båda proteinerna bildat amyloida

fibriller. CD-spektra från prover med amyloida fibriller jämfördes med motsvarande spektra för monomert protein. Jämförelserna visade att merparten av insulinet hade bildat amyloida fibriller (**figur 7A**, spektra är normerade och ska därför endast jämföras med avseende på form). Denna slutsats baseras på att CD-spektrumet från insulinprovet har en negativ topp vid 217 nm, vilket är karaktäristiskt för proteiner med β -flakstruktur (**figur 5**) såsom amyloida fibriller. Slutsatsen baseras även på att CD-spektrumet för insulinprovet tydligt skiljer sig från CD-spektrumet för insulinmonomerer som har två negativa toppar vid 208 nm respektive 222 nm, vilket är karaktäristiskt för proteiner med α -helixstruktur (**figur 5**).

CD-spektrumet för lysozym (**figur 7B**, spektra är normerade) indikerar att fibrillbildningen inte är lika effektiv för lysozym som för insulin. Denna analys baseras på att lysozymprovets CD-spektrum fortfarande har en övergripande α -helixstruktur och är likt (men inte identiskt med) CD-spektrumet för monomert lysozym, vilket antyder att en majoritet av lysozymet fortfarande föreligger i monomer form. I och med att CD-spektrumet från ett prov är en sammanvägning av alla förekommande sekundärstrukturer i provet och att en viss skillnad mellan CD-spektrana kan utläsas är det rimligt att anta att det finns låga halter lysozymfibriller i lysozymproverna. Detta antagande stöds även av att proverna ger upphov till fluorescens vid tillsats av ThT. För att separera lysozymfibrillerna från kvarvarande monomert lysozym centrifugerades proverna och pelleten löstes upp och analyserades med CD. De isolerade lysozymfibrillerna har en tydlig β -flaksignal i och med den negativa toppen vid 217 nm (**figur 7B**). Även insulinfibrillerna centrifugerades, men eftersom det inte resulterade inte i någon nämnvärd skillnad mot ocentrifugerat prov fastslog vi att mängden monomerer i insulinproverna är försumbar. Med anledning av detta centrifugerades inte insulinfibrillerna i fortsatta experiment.



Figur 7. CD-spektra för monomert och fibrillärt insulin respektive lysozym. (A) Insulinfibriller före och efter centrifugering i jämförelse med monomert insulin. Både det centrifugerade och det ocentrifugerade provet visar på β -flaksignaler, vilket indikerar att insulinfibriller är så pass rena att de inte behöver centrifugeras. (B) Lysozymfibriller före och efter centrifugering i jämförelse med monomert lysozym. CD-spektrumet visar att proverna innan centrifugering har en CD-signal som liknar den för monomert lysozym, men att de efter centrifugering får en karaktäristisk β -flaksignal. Lysozymfibriller måste därför isoleras från monomert protein. Alla CD-spektra är normerade för att förenkla jämförelser av deras form och normeringsfaktorn anges i figuren.

4.2.2 Jämförelser av amyloida fibriller bildade under olika experimentella betingelser

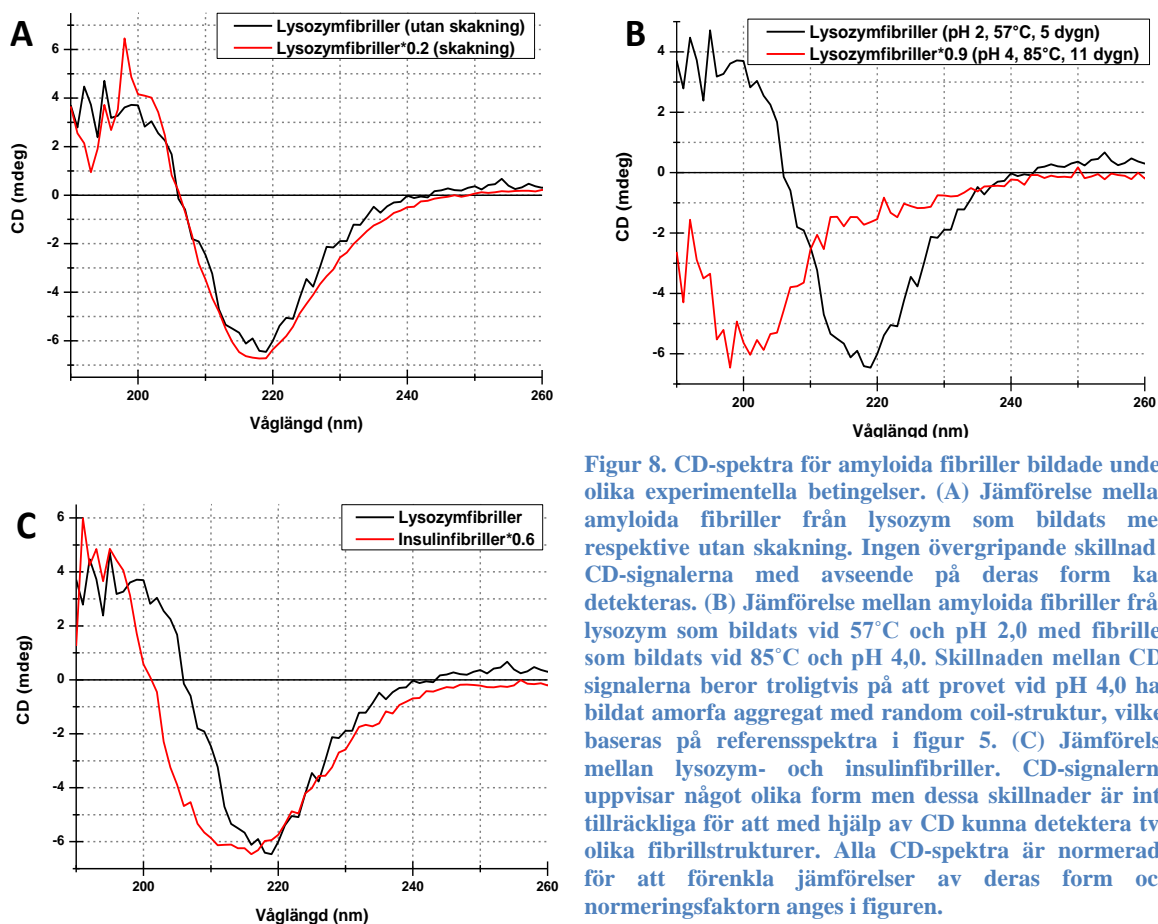
I avsikt att ta fram två olika referensfibriller från lysozym bildades amyloida fibriller vid olika experimentella betingelser. Därefter isolerades dessa enligt de metoder som beskrivits i avsnitt 4.2.1 och studerades sedan med CD. De experimentella betingelser som jämfördes var effekten av pH och temperatur samt skakning under fibrillbildning.

Resultaten visar att CD-spektra från lysozymfibriller bildade med respektive utan skakning har samma form (**figur 8A**, spektra är normerade). CD-spektrumet från lysozymfibriller

bildade under skakning ger dock upphov till en starkare (jämför normeringsfaktorerna) och mindre brusig CD-signal, men dessa prover var synligt grumliga och därför uteslöts skakning i fortsatta experiment. Grumliga prover sprider ljus och kan därför orsaka svårigheter i framförallt absorbansmätningar eftersom spritt ljus gör att signalen inte längre är proportionerlig mot koncentrationen.

Då effekten av temperatur och pH studerades gav prover från dessa betingelser upphov till CD-spektra med stora skillnader (**figur 8B**, spektra är normerade). Skillnaden mellan de två CD-spektrumen skulle dock kunna bero på att merparten av proteinet vid pH 4,0 och 85°C bildat amorfa (ostrukturerade) aggregat eftersom en tydlig random coil-struktur kunde observeras. Detta baseras på likheten (en negativ topp vid 200 nm) med referensspektrumet för random coil i **figur 5**. En svag negativ signal kan dock ses i regionen kring 217 nm, vilken antyder att åtminstone en del av proteinet föreligger i β -flakstruktur (**figur 5**) och därmed troligtvis bildat amyloida fibriller. Detta prov gav även upphov till fluorescens vid tillsats av ThT vilket stödjer slutsatsen.

CD-spektrumet för lysozymfibriller jämfördes även med motsvarande för insulinfibriller (**figur 8C**, spektra är normerade). Eftersom lysozym och insulin har olika aminosyrasekvenser kommer deras sekundärstrukturer i fibrillär form vara olika. Den negativa toppen i CD-spektrumet för insulinfibriller är bredare än den negativa toppen för lysozymfibriller. Dessa två toppar har dock båda sina minimum kring våglängden 217 nm, vilket är karaktäristiskt för proteiner med β -flakstruktur. Skillnaderna i CD-spektrum är inte tillräckligt stora för att tydligt kunna avgöra hur amyloidstrukturerna skiljer sig åt, men eftersom insulin och lysozym har olika aminosyrasekvens är de ändå lämpliga som referensfibriller för fortsatta experiment.



Figur 8. CD-spektra för amyloida fibriller bildade under olika experimentella betingelser. (A) Jämförelse mellan amyloida fibriller från lysozym som bildats med respektive utan skakning. Ingen övergripande skillnad i CD-signalerna med avseende på deras form kan detekteras. (B) Jämförelse mellan amyloida fibriller från lysozym som bildats vid 57°C och pH 2,0 med fibriller som bildats vid 85°C och pH 4,0. Skillnaden mellan CD-signalerna beror troligtvis på att provet vid pH 4,0 har bildat amorfa aggregat med random coil-struktur, vilket baseras på referensspektra i figur 5. (C) Jämförelse mellan lysozym- och insulinfibriller. CD-signalerna uppvisar något olika form men dessa skillnader är inte tillräckliga för att med hjälp av CD kunna detektera två olika fibrillstrukturer. Alla CD-spektra är normerade för att förenkla jämförelser av deras form och normeringsfaktorn anges i figuren.

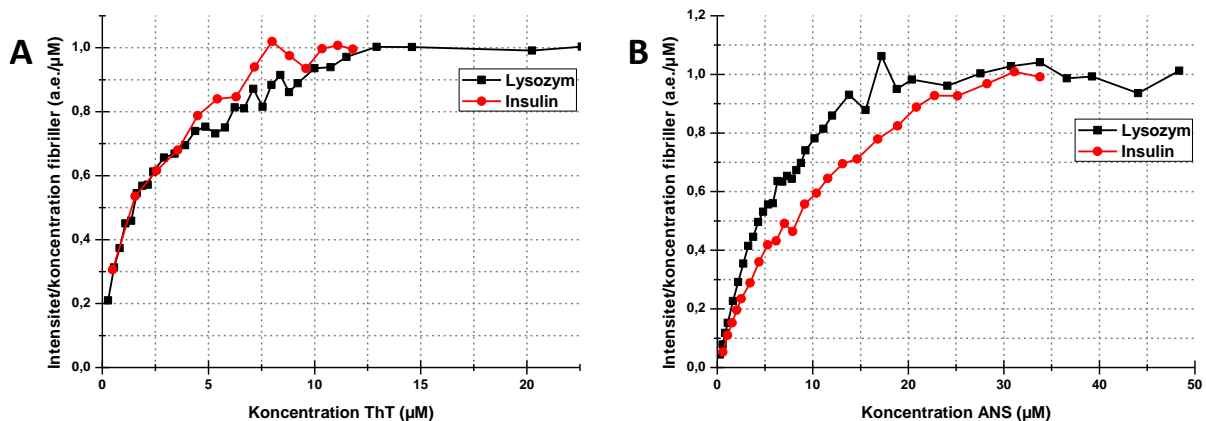
4.3 Bindning av ThT och ANS till amyloida fibriller

I detta avsnitt presenteras resultaten från fluorescensspektroskopi- och LD-mätningar med amyloida fibriller och deras interaktioner med ThT och ANS.

4.3.1 Titreringsserier med fluorescensspektroskopi

Genom att successivt tillsätta färgämne till en lösning med amyloida fibriller och följa hur dess fluorescensintensitet förändras kan information erhållas om ett färgämnes interaktion med amyloida fibriller. Bindning resulterade i en ökning i fluorescensintensitet, vilket utnyttjades för att konstruera bindningskurvor som kan ge information om färgämnets egenskaper vid bindning till amyloida fibriller. Bindningskurvorna (**figur 9**) som erhöles på detta sätt visar kvalitativt hur starkt ThT (**figur 9A**) respektive ANS (**figur 9B**) binder till amyloida fibriller och jämförelser kan göras mellan insulin- och lysozymfibriller. Då kurvorna planar ut finns det inte möjlighet för fler färgämnesmolekyler att binda till de amyloida fibrillerna.

Det är intressant att det inte finns någon märkbar skillnad mellan insulin- och lysozymfibriller med ThT medan en skillnad kan observeras för ANS. Detta tyder på att ThT binder på samma sätt till de olika fibrillerna och att det finns ungefär lika många bindningssäten för ThT på de båda modellfibrillerna. Kurvan för lysozymfibriller med ANS (**figur 9B**) har en brantare lutning än den för insulinfibriller, vilket indikerar att ANS binder starkare till lysozymfibriller. Detta kan förstås om man beaktar att bindningskonstanten K i jämviktsekvationen, $K = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]}$, som beskriver relationen mellan koncentrationerna av ämnena A och B fritt i lösningen samt koncentrationen av A och B i bundet tillstånd till varandra. Om det finns mer AB relativt A och B separat i lösningen är bindningskonstanten högre, vilket ger upphov till en brantare lutning på bindningskurvan. Om mycket ANS (A) kan binda till lysozymfibrillen (B), det vill säga föreligger i AB, innebär det att bindningen mellan dem är stark.



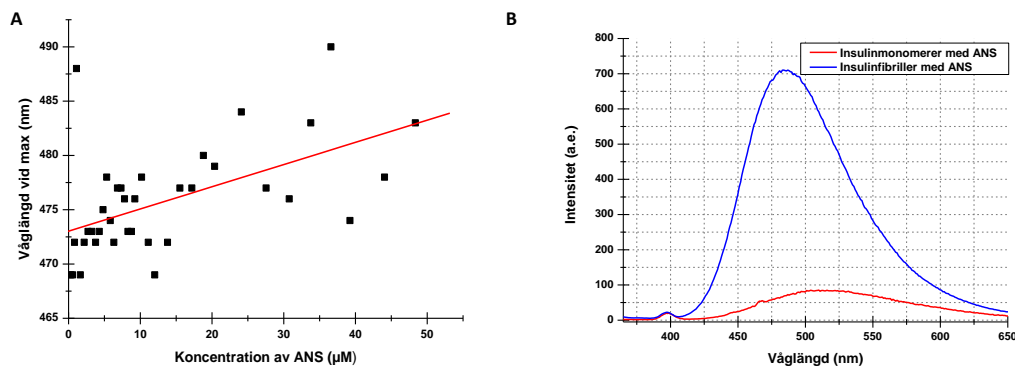
Figur 9. Bindningskurvor baserade på titreringsserier med både insulin- och lysozymfibriller samt ThT och ANS. Y-axeln visar summan av fluorescensintensiteten dividerat med koncentrationen av amyloida fibriller och X-axeln visar färgämneskoncentrationen. Värdena korrigerades för utspädning. Kurvorna normerades utifrån de tre sista punkternas medelvärde. Då kurvorna blivit konstanta binder inte längre mer färgämne till fibrillerna. (A) Bindningskurva för ThT. Koncentrationen av insulinfibriller var 12,6 μM och koncentrationen av lysozymfibriller var 10,0 μM. ThT exciterades vid 450 nm. (B) Bindningskurva för ANS. Koncentrationen av insulinfibriller var 11,6 μM och koncentrationen av lysozymfibriller var 10,0 μM. ANS exciterades vid 350 nm.

Utifrån substansmängden amyloida fibriller respektive tillsatt färgämne vid mättnad kunde antalet bundna färgämnesmolekyler per fibrillenhet uppskattas. Uppskattningen gjordes genom att dividera substansmängden färgämne vid mättnad med substansmängden amyloida fibriller där den faktor som erhöles kallades bindningsfaktor. Bindningsfaktorn för ThT blev

1,0 för insulinfibriller och 1,6 för lysozymfibriller. Bindningsfaktorn för ANS blev 4,6 för insulinfibriller och 2,4 för lysozymfibriller. Bindningsfaktorerna skiljer sig nästan femfaldigt mellan ThT och ANS för insulinfibriller, men knappt tvåfaldigt för lysozymfibriller. Att det för insulinfibriller är sådan stor skillnad i antalet bundna ThT- och ANS-molekyler tyder på att ANS kan ha tillgång till betydligt fler bindningssäten och kanske kan binda till andra ytor på insulinfibrillerna än just β -flakstrukturen där ThT binder. Det är även intressant att jämföra bindningsfaktorerna för ANS med insulin- och lysozymfibriller, där skillnaden indikerar att insulinfibrillerna har fler hydrofoba ytor än lysozymfibrillerna.

Från de fluorescensspektra som uppmättes under titreringarna (460-700 nm för ThT och 365-700 nm för ANS) kunde vissa skift i λ_{\max} konstateras. För att undersöka om dessa skift skedde systematiskt avsattes λ_{\max} för ThT respektive ANS mot koncentrationen tillsatt färgämne. Systematiska skift kunde endast detekteras för ANS bundet till lysozymfibriller (**figur 10A**). Där syntes en trend i ökande λ_{\max} med ökande koncentration ANS, vilket skulle kunna betyda att ANS har flera olika typer av bindningssäten på lysozymfibrillen och att dessa har olika hydrofobicitet. Någon sådan trend kunde inte observeras för lysozymfibriller med ThT, vilket stämmer väl överens med att ThT endast har en typ av bindningssäte på amyloida fibriller (se avsnitt 2.2).

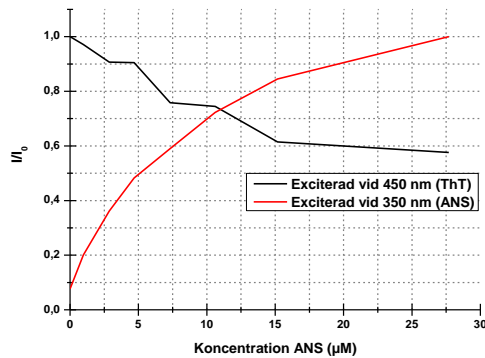
För att undersöka om det finns en interaktion mellan ThT respektive ANS och monomert insulin respektive lysozym tillsattes färgämnena även till lösningar av dessa monomerer. Ingen fluorescenssignal från ThT detekterades vid 480 nm, varken med monomerer av insulin eller av lysozym, vilket är rimligt då ThT är ett fibrillspecifikt färgämne. ANS fluorescerade inte i närvaro av monomert lysozym. Däremot noterades en ökning i fluorescensintensitet med monomert insulin och ANS, dock inte med lika hög ökning i fluorescensintensitet som med insulinfibriller och ANS (**figur 10B**). Det är även intressant att notera att det sker ett skift i λ_{\max} åt längre våglängder då ANS binder till monomert jämfört med fibrillärt insulin. Detta tyder på att det finns olika slags hydrofoba ytor på insulinet i de två olika formerna, och att ANS binder på olika sätt i de två fallen.



Figur 10. (A) Förändring av våglängden för fluorescensmaximum (λ_{\max}) som funktion av koncentrationen ANS i ett prov med lysozymfibriller. Den röda linjen är en linjär regression till punkterna. λ_{\max} ökar något med ökande ANS-koncentration. (B) Fluorescensspektra för ANS i närvaro av insulinfibriller (blå kurva) och insulinmonomerer (röd kurva). Excitatorvåglängden var 350 nm. Koncentrationen av insulinfibriller var 15 μM och koncentrationen av insulinmonomerer var 12 μM . Koncentrationen av ANS med insulinfibriller var 28 μM och med insulinmonomerer 31 μM . Kurvorna har korrigerats för utspädning.

För att undersöka om ThT och ANS kan binda till samma ställe på insulinfibriller utfördes en titreringsserie där ANS successivt tillsattes till ett prov med en konstant mängd ThT och insulinfibriller. Från tidigare studier (Vassar, 1959 och Krebs, 2004) är det känt att ThT binder till de amyloida fibrillernas β -flakstruktur och därför valdes ThT som färgämnet med

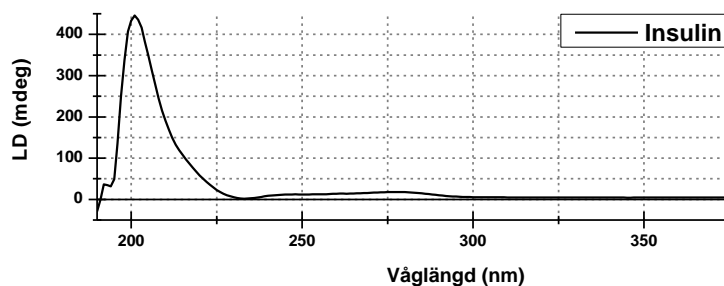
konstant koncentration. Om ANS kan konkurrera ut ThT skulle det betyda att de helt eller delvis har samma bindningssäten. Om så är fallet betyder det också att den del av β -flakstrukturen som ThT interagerar med har hydrofoba ytor. I varje titreringspunkt exciterades provet vid absorptionsmaxima för både ThT (450 nm) och ANS (350 nm) och emissionen mättes i intervallet 460-700 nm respektive 365-700 nm. Det observerades att ThT-fluorescensen minskade och att ANS-fluorescensen ökade (**figur 11**). Det var inte möjligt att helt eliminera ThT-fluorescensen, 60 % av ursprungssignalen fanns kvar även då de amyloida fibrillerna mätts med ANS. Detta tyder på att ANS främst, men inte uteslutande, har andra bindningssäten än ThT på insulinfibriller.



Figur 11. Titreringskurva med konstanta koncentrationer av ThT (4 µM) och insulinfibriller (6 µM) samt med ökande mängd ANS mätt vid 450 nm (excitationsvåglängd för ThT) respektive 350 nm (excitationsvåglängd för ANS) i en fluorescensspektrofotometer. Värdena korrigerades för utspädd ThT- och fibrillkoncentration. Summan av integralen för varje titreringspunkt relativt den ökande koncentrationen ANS visas i figuren. Värdena är normaliserade mot det högsta värdet för respektive excitationsvåglängd. Då ThT-fluorescensen inte går ner till noll innebär det att ThT fortfarande kan binda till insulinfibrillerna trots mätnad med ANS.

4.3.2 Studier av bindning till amyloida fibriller av ThT respektive ANS med LD

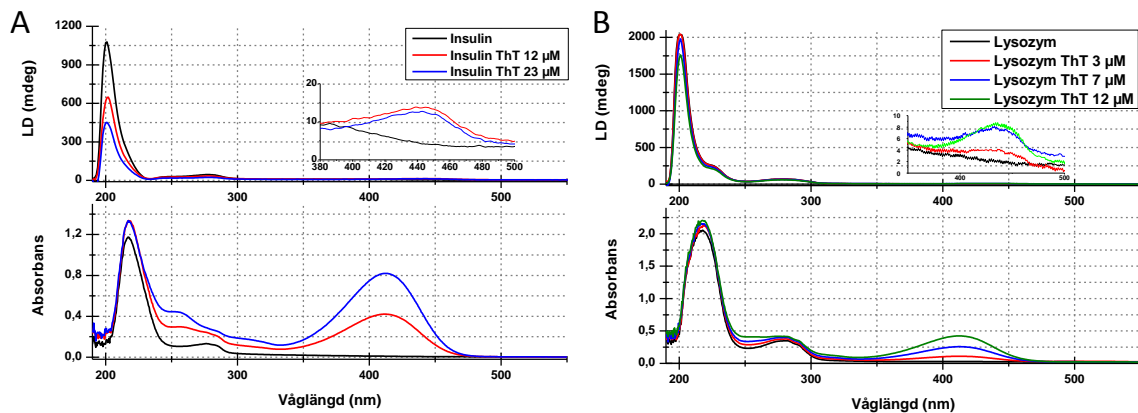
LD-mätningar användes för att undersöka om ThT och ANS binder på ett orienterat sätt till insulin- respektive lysozymfibriller. Samtliga absorptionsspektra för modellfibrillerna baslinjekorrigerades mot den buffert de framställdes i och LD-spektra baslinjekorrigerades genom att subtrahera signalen mätt på provet utan rotation. I **figur 12** visas ett baslinjekorrigerat prov med enbart insulinfibriller och de positiva LD-signalerna vid 280 nm och cirka 200 nm indikerar att det finns amyloida fibriller i provet. Amyloida fibriller har karaktäristiska signaler som beror på orienteringen av β -flakstrukturen (~200 nm) och orienteringen av de aromatiska sidokedjorna (220-300 nm). Våglängden för den sistnämnda LD-signalen är något olika för insulin- och lysozymfibriller. Dessa signaler syns i alla spektra oavsett om färgämne tillsats eller inte (**figur 13-20**).



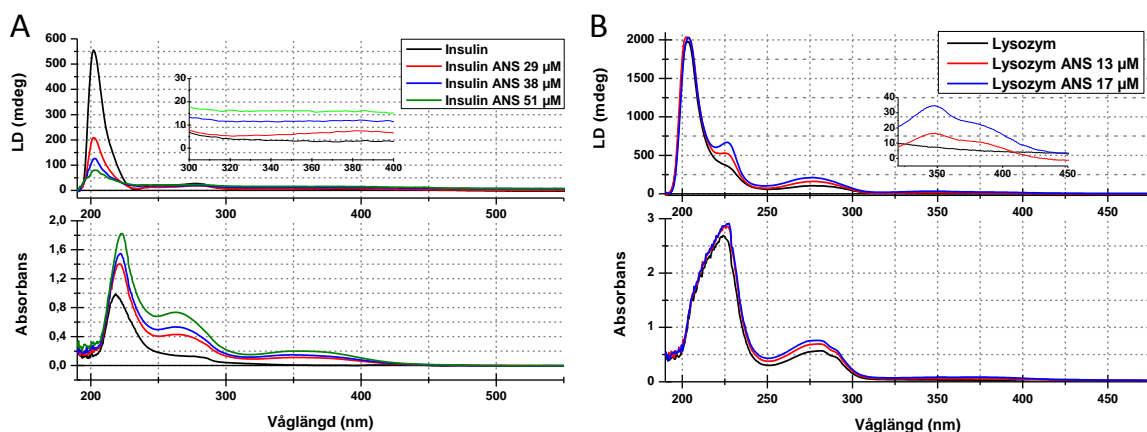
Figur 12. LD-spektrum av ett prov innehållande enbart insulinfibriller och buffert. Topparna vid 200 nm och 280 nm verifierar närvaron av amyloida fibriller i provet.

Mätningar med ThT och ANS utfördes separat med insulin- respektive lysozymfibriller. I **figur 13** och **14** visas LD- och absorptionsspektra för ThT och ANS i närvaro av amyloida fibriller. Spektra mättes vid en eller flera olika färgämneskoncentrationer. **Figur 13** visar att ThT binder till både insulin- och lysozymfibriller på ett orienterat sätt, eftersom en LD-signal uppträder i närheten av färgämnets λ_{max} i LD-spektrana. LD-signalen för ThT är positiv, vilket innebär att färgämnet binder mer parallellt än vinkelrätt relativt fibrillens långaxel. ANS binder också orienterat till lysozymfibriller (**figur 14B**) och ger upphov till en positiv LD-signal. Däremot ses ingen LD-signal för ANS i närvaro av insulinfibriller (**figur 14A**).

Bindningskurvan i **figur 9B** visar dock att ANS faktiskt binder till insulinfibriller och från LD-mätningen kan det alltså konstateras att bindningen till insulinfibriller inte sker med en specifik orientering relativt fibrillaxeln.



Figur 13. (A) LD- och absorptionsspektrum för ThT vid två olika koncentrationer samt en koncentration av insulinfibriller på 20 μM. ThT binder till insulinfibriller eftersom det finns ett LD-maximum för färgämnet vid 445 nm (se förstoring). Absorbansmaximum förekommer vid 412 nm, vilket är ett skift jämfört med LD-maximum. (B) LD- och absorptionsspektrum för lysozymfibriller med koncentrationen 9 μM och tre olika koncentrationer av ThT. Absorbansmaximum för ThT föreligger vid 412 nm och en motsvarande topp kan utläsas i LD-spektrumet vid 438 nm (se förstoring) som visar på att ThT binder till lysozymfibriller.



Figur 14. (A) LD- och absorptionsspektrum för ANS i närvaro av insulinfibriller med koncentrationen 29 μM och ANS vid tre olika koncentrationer. Absorbansmaximum för ANS är vid 350 nm, men någon topp återfinns inte i detta område i LD-spektrumet (se förstoring). Detta indikerar att ANS inte binder på ett orienterat sätt till insulinfibriller. (B) LD- och absorptionsspektrum för lysozymfibriller med koncentrationen 15 μM och två olika koncentrationer av ANS. ANS binder orienterat till lysozymfibriller, vilket stöds av toppen i LD-spektrumet vid 366 nm (se förstoring). Motsvarande topp i absorptionsspektrumet är vid 366 nm.

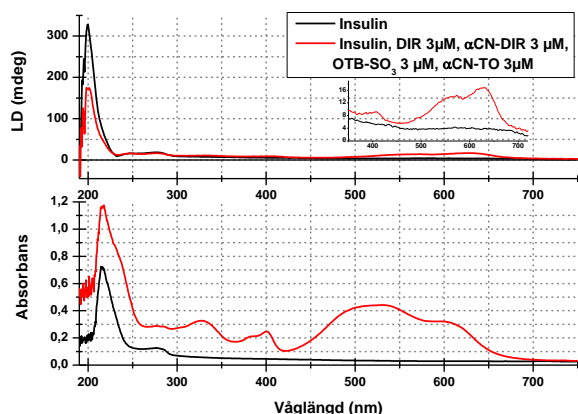
4.4 Karaktärisering av nya färgämnenas bindning till amyloida fibriller

Nedan presenteras resultat angående de nya färgämnenas bindning till amyloida fibriller av insulin och lysozym.

4.4.1 De nya färgämnenas bindning till amyloida fibriller med LD

Efter att de välkända färgämnen ThT och ANS hade undersökts påbörjades studier av de nya färgämnen. Först valdes fyra färgämnen med skilda λ_{\max} ut: DIR, α CN-DIR, OTB-SO₃ och α CN-TO (**figur 4C-F**). Därefter utfördes en high-throughput-mätning med LD genom att tillsätta dessa fyra färgämnen samtidigt till insulinfibriller (**figur 15**). Toppar i närheten av tre av färgämnenas absorbansmaxima (**tabell 3**) kan utläsas men för α CN-TO syns ingen LD-signal, vilket indikerar att tre av de fyra färgämnen binder till insulinfibriller. LD-signalerna

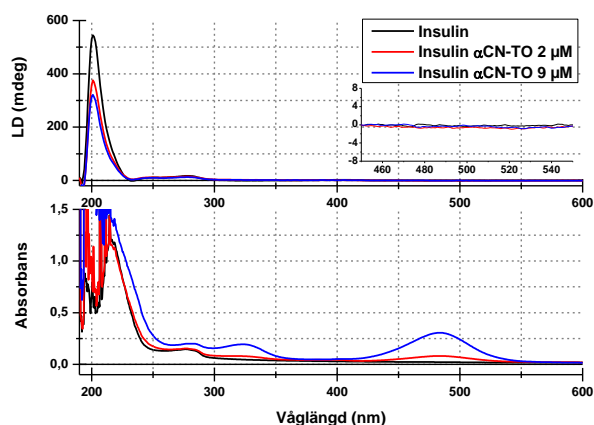
för dessa färgämnen är positiva, vilket innebär att de binder mer parallellt än vinkelrätt till fibrillerna.



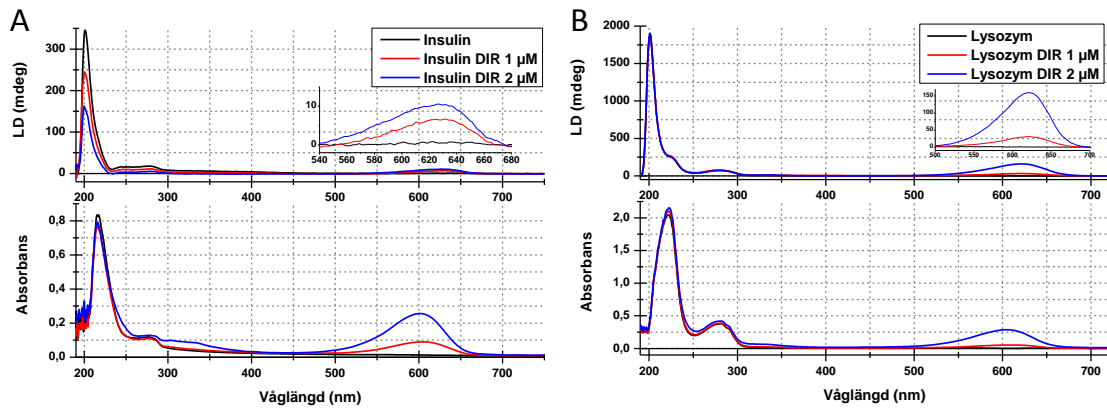
Figur 15. LD- och absorptionsspektrum för high-throughput-mätning med färgämnen DIR, α CN-DIR, OTB-SO₃ och α CN-TO tillsammans med insulinfibriller med koncentrationen 22 μ M. I LD-spektrumet observeras toppar vid 407, 574 och 631 nm (se förstoring). Dessa motsvarar färgämnenas OTB-SO₃, α CN-DIR och DIR:s absorptionsmaxima 400, 530 och 600 nm, vilket antyder att dessa färgämnen binder till insulinfibriller. Inget maximum är synbart för α CN-TO i LD-spektrumet och detta färgämne binder därför inte på ett orienterat sätt till insulinfibriller.

Färgämnen som ingick i high-throughput-mätningen, samt de fyra resterande färgämnen, studerades sedan med LD, var och ett för sig, tillsammans med insulinfibriller. LD-signalerna visar att alla färgämnen förutom α CN-TO binder orienterat till insulinfibriller, eftersom en positiv signal erhålls i närheten av respektive färgämnes λ_{max} . Detta innebär att de, i likhet med ThT, binder mer parallellt än vinkelrätt relativt insulinfibrillernas långaxel. Spektra för α CN-TO (**figur 16**) och fyra av de färgämnen som binder, DIR, α CN-DIR, OTB-SO₃ och MGT-3, visas i **figur 17A-20A**. Dessa fyra ansågs mest intressanta av olika anledningar; OTB-SO₃ har liknande λ_{max} som ThT, MGT-3 ger upphov till både en positiv och en negativ LD-signal och DIR samt α CN-DIR har långa λ_{max} och ger tydliga LD-signaler. Dessa färgämnen undersöktes även med lysozymfibriller och samtliga binder till lysozymfibriller mer parallellt än vinkelrätt (**figur 17B-20B**).

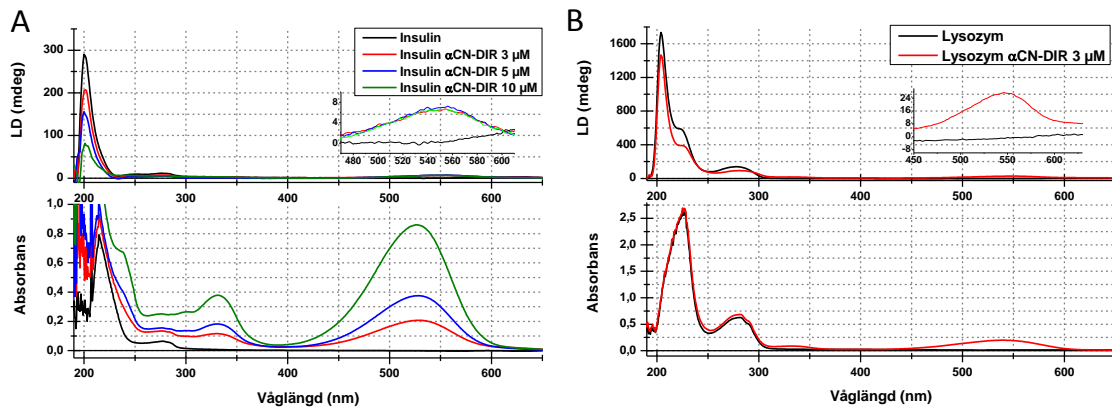
I **tabell 3** sammanställs information om absorptions- respektive LD-maxima för de nya färgämnen. Ett skift observeras mellan absorptions- och LD-maximum där den bundna formen av samtliga färgämnen, det vill säga den form som mäts i LD, har absorption som är skiftad mot längre våglängder.



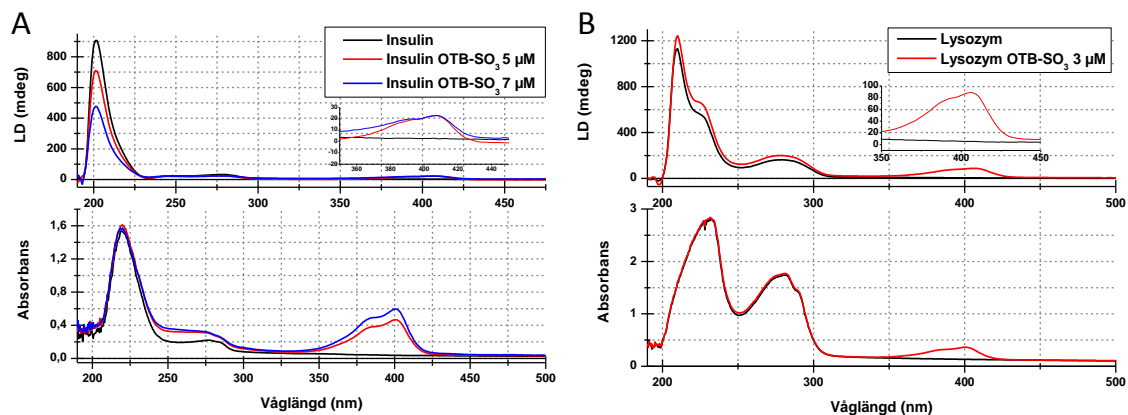
Figur 16. LD- och absorptionsspektrum för mätningar av insulinfibriller med koncentrationen 29 μ M och färgämnet α CN-TO vid två olika koncentrationer. Inget utslag i LD-mätningen syns i närheten av α CN-TO:s absorptionsmaximum (se förstoring), 485 nm, vilket tyder på att färgämnet inte binder till insulinfibriller.



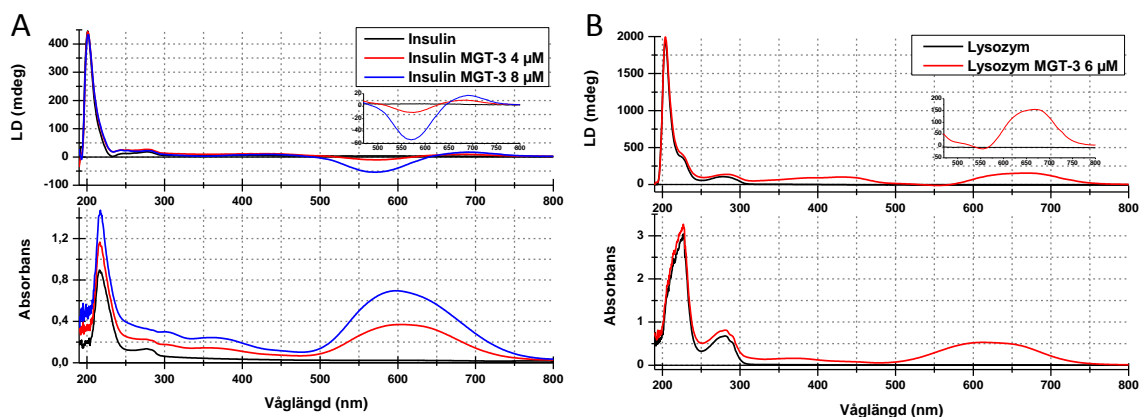
Figur 17. (A) LD- och absorptionsspektrum för insulinfibriller med koncentrationen 21 μM och DIR vid två olika koncentrationer. Från LD-spektrumet noteras att DIR binder till insulinfibriller eftersom det är en topp för DIR vid 626 nm (se förstoring). Detta kan jämföras med dess topp i absorptionsspektrum vid 602 nm. (B) LD- och absorptionsspektrum för lysozymfibriller med koncentrationen 10 μM och DIR vid två olika koncentrationer. DIR binder till lysozymfibriller i och med att LD-maximum för DIR avläses vid 623 nm (se förstoring), med motsvarande absorbansmaximum vid 605 nm.



Figur 18. (A) LD- och absorptionsspektrum för insulinfibriller med koncentrationen 11 μM och $\alpha\text{CN-DIR}$ vid tre olika koncentrationer. Absorbansmaximum för $\alpha\text{CN-DIR}$ är vid 526 nm och motsvarande topp i LD-spektrumet är vid 554 nm (se förstoring). Denna topp indikerar att $\alpha\text{CN-DIR}$ binder till insulinfibriller. (B) LD- och absorptionsspektrum för lysozymfibriller vid koncentrationen 17 μM och $\alpha\text{CN-DIR}$. Färggämnestoppen vid 550 nm i LD-spektrumet (se förstoring) med motsvarande topp vid 540 nm i absorptionsspektrum medför att $\alpha\text{CN-DIR}$ binder till lysozymfibriller.



Figur 19. (A) LD- och absorptionsspektrum för insulinfibriller med koncentrationen 39 μM vid två olika koncentrationer av OTB-SO_3 . Maximumet i LD-spektrumet vid 408 nm (se förstoring) indikerar att OTB-SO_3 binder till insulinfibriller. Absorbansmaximum för OTB-SO_3 är vid 400 nm. (B) LD- och absorptionsspektrum för mätningar med lysozymfibriller med koncentrationen 43 μM och OTB-SO_3 . OTB-SO_3 binder till lysozymfibriller, vilket motiveras av toppen i LD-spektrumet vid 406 nm (se förstoring) som motsvarar toppen vid 400 nm i absorptionsspektrum.



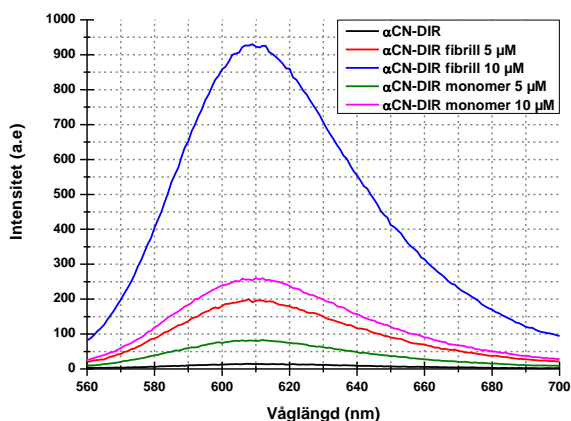
Figur 20. (A) LD- och absorptionsspektrum för insulinfibriller med koncentrationen 23 μM med två olika koncentrationer av MGT-3. Absorbansmaximum för MGT-3 är vid 598 nm och ett LD-minimum detekteras vid 571 nm (se förstoring). Notera även maximum vid 691 nm i LD-spektrumet. Därmed binder MGT-3 till insulinfibriller. (B) LD- och absorptionsspektrum för lysozymfibriller vid koncentrationen 18 μM och MGT-3. Observera att rotationshastigheten för mätningen var 500 rpm. MGT-3 binder till lysozymfibriller, vilket motiveras av toppen i LD-spektrumet vid 668 nm (se förstoring). Notera att det finns ett svagt LD-minimum vid 555 nm. Absorbansmaximum för MGT-3 föreligger vid 609 nm.

Tabell 3. Absorbans- och LD-maxima för de nya färgämnen med insulin- och lysozymfibriller. För $\alpha\text{CN-TO}$ har avsaknad av λ_{max} för LD symboliserats med ett streck (-). Om ett färgämne inte är undersökt med en viss typ av amyloida fibriller representeras det av ett kryss (x). För de färgämnen som har både en positiv och negativ LD-signal indikerar plus (+) respektive minus (-) inom parentes vilket λ_{max} som hör till respektive LD-signal.

Molekyl	Insulinfibriller			Lysozymfibriller		
	Abs. λ_{max} (nm)	LD λ_{max} (nm)	$ \Delta $ (nm)	Abs. λ_{max} (nm)	LD λ_{max} (nm)	$ \Delta $ (nm)
OTB-SO ₃	400	408	8	400	406	6
$\alpha\text{CN-TO}$	485	-	-	x	x	x
$\alpha\text{CN-DIR}$	526	554	28	540	550	10
DIR	602	626	24	605	623	18
MGT-1	625	654	29	x	x	x
MGT-2	635	528(+);675(-)	107;40	x	x	x
MGT-3	598	571(-);691(+)	27;93	609	555(-);668(+)	54;59
MG-BisT-Alkyne	644	682	38	x	x	x

4.4.2 De nya färgämnenas fluorescens med amyloida fibriller

Fluorescensintensiteten mättes för färgämnen tillsammans med amyloida fibriller eftersom det är av intresse att kunna detektera amyloida fibriller med fluorescensspektroskopi och fluorescensmikroskopi. Till skillnad från ThT fluorescerar $\alpha\text{CN-DIR}$ och DIR även i närvaro av monomert insulin. $\alpha\text{CN-DIR}$ och DIR ger liknande ökning i fluorescensintensitet då de binder till insulinfibriller relativt insulinmonomerer (**figur 21** för $\alpha\text{CN-DIR}$). Fluorescensintensiteten är cirka fyra gånger högre för färgämnet med amyloida fibriller jämfört med monomerer, vid likartade koncentrationer. $\alpha\text{CN-DIR}$ och DIR studerades även med lysozymfibriller med resultatet att de fluorescerar även vid bindning till dessa amyloida fibriller. Övriga färgämnen har inte undersökts med varken lysozymfibriller eller lysozym- och insulinmonomerer. Samtliga färgämnen har dock testats med insulinfibriller och MGT-molekylerna fluorescerar inte då de binder till dessa. $\alpha\text{CN-TO}$ fluorescerar inte heller i lösning med insulinfibriller eller monomert insulin, vilket var väntat eftersom bindning till insulinfibriller inte detekterades med LD (**figur 16**). OTB-SO₃ fluorescerar däremot med såväl insulinfibriller som insulinmonomerer.



Figur 21. Fluorescensspektra för α CN-DIR med koncentrationen $4 \mu\text{M}$, exciterat vid 550 nm , tillsammans med insulinfibriller respektive insulinmonomerer. Två olika insulinkoncentrationer användes. Vid den första mätningen (understa kurvan) är α CN-DIR löst i enbart GI-HCl-buffert (pH 2,2) där fluorescensintensiteten är låg. α CN-DIR med insulinfibriller har ungefär fyra gånger högre intensitet än vid motsvarande koncentration av insulinmonomerer. Fluorescensintensiteten ökar betydligt mer då fibrillkoncentrationen fördubblas jämfört med när monomerkoncentrationen fördubblas. Fluorescensmaximum för insulinfibriller och insulinmonomerer är vid 609 nm .

5 Diskussion

I kapitlet nedan diskuteras projektets resultat och slutsatserna sätts i ett sammanhang.

5.1 Bildning av insulin- och lysozymfibriller

Det tar olika lång tid för insulin och lysozym att bilda amyloida fibriller. Kinetikstudien visade att insulin bildar fibriller inom loppet av 50 till 180 minuter beroende på startkoncentrationen av monomert protein (**figur 6A1**). Ju lägre startkoncentrationen av insulin är, desto kortare tid tar det för proteinet att bilda amyloida fibriller. **Figur 6A2** antyder att lagfasens längd, omkring 10 minuter, är ungefär densamma för alla startkoncentrationer av insulin som studerades. Mätningar utfördes dock endast var tionde minut, vilket medför att endast en mätning utgör lagfasen.

I **figur 6A1** ser man att formen på kinetikkurvan för den högsta koncentrationen av insulin (2 mg/ml) avviker från de övriga kurvorna. Skillnaden är särskilt tydlig i början av tillväxtfasen, mellan 5 och 25 minuter, där lutningen för koncentrationen 2 mg/ml är mindre än för resterande koncentrationer, vilket förskjuter kurvan. Trenden visar däremot att högre koncentration ger brantare lutning, det vill säga en snabbare tillväxthastighet av amyloida fibriller, under samma tidsintervall. Avvikelsen skulle kunna bero på att insulin kan bilda dimerer och hexamerer vid högre koncentration av monomerer. Bindningarna är svårare att bryta i dessa komplex (Sluzky, 1991) och det tar därmed längre tid för fibrillerna att bildas.

Kinetikstudien för lysozym visade att det tar ungefär 3,5 dygn för lysozymfibriller att bildas. Bildningstiden verkar vara oberoende av startkoncentrationen i det koncentrationsintervall vi studerade (**figur 6B**), men eftersom tillväxthastigheten är låg i slutet av tillväxtfasen är det svårt att avgöra den exakta tidpunkten då fibrillbildningen nått jämvikt. Lagfasen vid bildandet av lysozymfibriller är mellan 20 och 60 minuter lång. Ett samband kan ses mellan hög startkoncentration av protein och kort lagfas. Detta var förväntat då bildandet av de amyloida fibrillernas kärna gynnas av hög proteinkoncentration.

En avvikelse kunde ses i kinetikstudien för lysozym (**figur 6B**), där kurvorna för koncentrationerna 5 och 10 mg/ml korsar varandra under tillväxtfasen. Denna avvikelse skulle kunna bero på de stora gelklumpar och aggregat som detekterades i samtliga kyvetter.

Kinetikstudien visar att bildningstiden för insulinfibriller är kortare än den för bildandet av lysozymfibriller. En orsak till detta är säkerligen att lysozymprotein är mer stabilt i monomer form än vad insulinprotein är. Skillnaden i stabilitet kan utläsas av att lysozums

denatureringstemperatur är 76°C (Haezebrouck, 1991) till skillnad från insulin där denaturering har observerats redan vid 50°C (Elshemei, 2010). Lysozymmonomerernas stabilitet är troligtvis också anledningen till att lysozym bildar amyloida fibriller mindre effektivt än insulin och att lysozymfibriller därför måste isoleras från monomert protein (**figur 7**).

5.2 Amyloida fibrillers sekundärstruktur

För att kunna utföra noggranna och kvantitativa studier på fibrillprover krävs det att så lite monomert protein som möjligt förekommer i provet. En indikation på rena fibrillprover är att dessa prover ger upphov till en karaktäristisk β -flaksignal vid CD-mätningar, samtidigt som inga andra tydliga sekundärstrukturer syns i CD-spektrumet (**figur 5**). Inledande studier med CD visade att insulin mycket effektivt bildar amyloida fibriller (**figur 7A**) och därför krävdes ingen extra isolering av dessa fibriller. Däremot förelåg en stor andel av proteinerna i lysozymprovet fortfarande i monomer form även efter flera dagars fibrillering (**figur 7B**), vilket medförde att dessa fibriller behövde isoleras. När lysozymproverna centrifugerades erhöles en ren β -flaksignal från pelleten, vilket visade att lysozymmonomerer effektivt hade avskiljts. Dock medförde centrifugeringen att olösliga aggregat bildades, vilket kan ha påverkat resultaten i efterföljande studier genom att orsaka spridningseffekter vid absorbans- och CD-mätningar.

Från **figur 8A** kan det utläsas att lysozymfibriller bildade under skakning ger upphov till en mindre brusig CD-signal. Detta var förvånande eftersom proverna var grumligare än övriga och antogs därmed kunna ge upphov till spridningseffekter vid CD-mätningar. En anledning till den jämnare CD-signalen kan vara att lysozym skulle kunna bilda kortare amyloida fibriller under skakning. En annan möjlig orsak till det jämnare spektrumet skulle kunna vara att lysozym bildar amyloida fibriller effektivare under skakning, vilket i så fall skulle förklara det faktum att signalen är fem gånger starkare för lysozymfibriller bildade under skakning (se normeringsfaktorn i **figur 8A**). Eftersom CD-signalerna normeras dämpas bruset, vilket medför en jämnare CD-signal. Lysozymfibriller bildade utan skakning valdes dock för vidare studier baserat på att dessa prover var mindre grumliga, vilket ger upphov till tydligare spektra vid absorbansmätningar.

Figur 8B visar att toppen i CD-spektrumet för lysozymfibriller bildade vid 85°C och pH 4,0 är förskjutet mot kortare våglängder jämfört med lysozymfibriller bildade vid 57°C och pH 2,0. Det är troligt att denna förskjutning beror på att lysozym vid 85°C och pH 4,0 inte bildar amyloida fibriller utan istället bildar amorfa proteinaggregat med random coil-struktur (**figur 5**). Dock kan en antydning till β -flaksignal observeras vid 220 nm, vilket indikerar att en liten andel av provet består av lysozymfibriller. Dessa lysozymfibriller skulle potentiellt kunna vara strukturellt skilda från de som bildats vid 57°C och pH 2,0. På grund av den begränsade projekttiden valde vi att inte vidare karaktärisera dessa skillnader.

Endast små skillnader kunde ses mellan insulin- och lysozymfibriller (**figur 8C**) trots att dessa har olika aminosyrasekvenser och därmed borde ha olika fibrillstrukturer. Skillnader i fibrillstrukturer förekommer genom att längden samt strukturen på peptidsvansarna mellan den gemensamma β -flakstrukturen (**figur 1B**) varierar mellan de två olika modellfibrillerna. Problemet med att detektera skillnader mellan olika fibriller i CD har sin grund i att CD-signalen är en sammanvägning av de olika strukturer som förekommer i provet (Greenfield, 1969). Eftersom fibriller i huvudsak utgörs av β -flak ger olika fibrillprover upphov till CD-spektra med likartad form, trots förekomst av strukturella skillnader mellan peptidsvansarna för respektive modellfibrill.

Ett ytterligare problem med att jämföra fibrillstrukturer med CD är att signaler från β -flak generellt är svagare än dem från α -helix och random coil (**figur 5**). De amyloida fibrillernas struktur orsakar dessutom ljusspridning, vilket försvagar β -flaksignalen från fibrillerna ytterligare (Greenfield, 2007). Dessa två faktorer medför att signalen från de amyloida fibrillernas β -flak lätt kan överskuggas av signalerna från övriga strukturer i provet, såsom kvarvarande monomert protein. Ljusspridningen leder också till att CD-signalen inte längre är proportionerlig mot koncentrationen av β -flak i proven, vilket medförde att vi inte drog några slutsatser om andelen β -flak i de olika modellfibrillerna.

5.3 Karaktärisering av amyloida fibriller med hjälp av ThT och ANS

Även om det finns strukturella skillnader mellan insulin- och lysozymfibriller, såsom att lysozym har fler aminosyror än insulin (lysozym och insulin har 129 respektive 51 aminosyror) (Phillips, 1967 och Jaimohan, under tryckning), kan endast små skillnader detekteras med CD. Mer information om skillnaderna mellan fibrillerna kunde däremot erhållas från de bindningskurvor som visar hur ANS och ThT interagerar med modellfibrillerna (**figur 9**). I **figur 9A** kan ingen tydlig skillnad mellan insulin- och lysozymfibriller ses när de titreras med ThT. Detta tyder på att de båda modellfibrillerna har en likartad β -flakstruktur och stämmer väl överens med de likheter vi såg i CD. Då kurvornas lutning är likartad innebär det att ThT binder lika starkt och på samma sätt till de båda modellfibrillerna. Att ThT binder på samma sätt till de båda modellfibrillerna kan även ses i LD-mätningarna med insulin- respektive lysozymfibriller (**figur 13**). Från båda mätningarna fås en positiv LD-signal för ThT som visar att ThT binder mer parallellt än vinkelrätt mot modellfibrillernas långaxel. Vi har därmed styrkt teorin från Krebs, 2004 som föreslår att ThT binder i fårorna som bildas mellan aminosyroras sidokedjor i β -flakstrukturen (**figur 3**).

För ThT skiljer sig de beräknade bindningsfaktorerna (ett mått på antalet bundna färgämnesmolekyler då fibrillerna är mättade) mellan insulinfibriller (1,0) och lysozymfibriller (1,6). Detta tyder på att ThT har fler bindningssäten på lysozymfibriller än insulinfibriller. Det är intressant att observera att styrkan i bindning av ThT till insulin- och lysozymfibriller är densamma men att antal bindningssäten för ThT skiljer sig åt, vilket tyder på att det finns en viss skillnad mellan de två olika modellfibrillerna. Då det har bekräftats att ThT binder till fårorna i β -flakstrukturen är det möjligt att det finns mer β -flak i lysozymfibriller än i insulinfibriller. Detta resonemang stöds även av att lysozym är ett större protein än insulin.

När ANS titrerades till insulin- och lysozymfibriller observerades en markant skillnad mellan de två kurvorna (**figur 9B**). Den brantare lutningen på kurvan med lysozymfibriller indikerar att ANS binder starkare till lysozymfibriller än insulinfibriller. Då det är känt att ANS interagerar med hydrofoba ytor (Hawe, 2008), tyder resultaten på att de båda modellfibrillerna har olika typer av hydrofoba ytor och att ANS har högre affinitet för de ytor som finns på lysozymfibriller. Det är även en skillnad i bindningsfaktor mellan ANS med insulinfibriller (4,6) och lysozymfibriller (2,4). Insulinfibriller har därmed fler bindningssäten för ANS jämfört med lysozymfibriller, trots att ANS binder starkare till lysozymfibriller.

Även i LD-mätningarna för insulin- och lysozymfibriller med ANS kan en tydlig skillnad ses mellan de två modellfibrillerna (**figur 14**). För lysozym observeras en positiv LD-signal, vilket indikerar att ANS, liksom ThT, binder mer parallellt än vinkelrätt mot lysozymfibrillernas långaxel (**figur 14B**). Vid motsvarande försök med insulinfibriller erhålls ingen LD-signal alls för ANS (**figur 14A**). Avsaknaden av en LD-signal för ANS med insulinfibriller tillsammans med resultaten från bindningskurvorna betyder att ANS binder

ickeorienterat till insulinfibriller, exempelvis till de peptidsvansar som inte ingår i fibrillens β -flakstruktur (**figur 1B**). En möjlig, men högst osannolik, orsak till att ingen LD-signal erhålls skulle kunna vara att bindningsvinkeln mellan samtliga bundna ANS-molekyler och fibrillaxeln är väldigt nära $54,7^\circ$, vilket är den orienteringsvinkel som ger strikt $LD = 0$ (kan härledas matematiskt från ekvationen för LD) (Rodger, 1997).

5.4 Skillnader mellan ThT och ANS

Det är sedan tidigare känt att ThT binder mer parallellt än vinkelrätt till de amyloida fibrillernas långaxel (Krebs, 2004), vilket bekräftades i våra studier där ThT hade en positiv LD-signal vid bindning till både insulin- och lysozymfibriller (**figur 13**). Det är däremot inte känt hur ANS binder till amyloida fibriller och i vilken utsträckning ThT och ANS kan binda till samma bindningssäten. Vi visade att ökande tillsats av ANS till ett prov som innehöll insulinfibriller och ThT resulterade i en successiv minskning av ThT:s fluorescensintensitet, men det var inte möjligt att helt eliminera ThT:s fluorescenssignal även då de amyloida fibrillerna var mättade med ANS (**figur 11**). Detta tyder på att ThT och ANS i viss mån påverkar varandras bindning, men det är inte sannolikt att de enbart binder till samma bindningssäten på insulinfibriller. Från LD-mätningen för ANS med insulinfibriller (**figur 14A**) erhöles ingen signal, vilket utesluter att ANS binder på samma sätt som ThT till insulinfibriller, det vill säga på ett orienterat sätt i β -flakstrukturens fåror. Även om ANS inte binder till fåror skulle färgämnet ändå kunna binda till β -flakstrukturens sidokedjor. Denna typ av bindning skulle kunna medföra att ANS delvis kan konkurrera ut ThT trots att de inte binder till samma bindningssäten. Enligt Biancalana, 2010 kan bindningen av ThT till amyloida fibriller inhiberas av vissa molekyler. Våra data tyder därmed på att ANS har en viss sådan inhiberande effekt (**figur 11**).

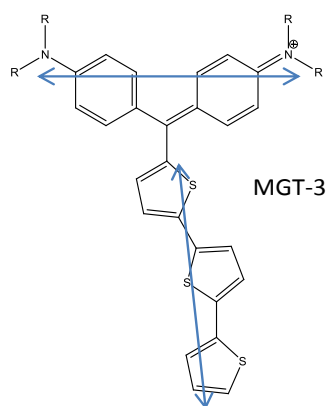
För bindningskurvorna, som mättes för både insulin- och lysozymfibriller med ThT och med ANS (**figur 9**), beräknades bindningsfaktorer. Det är intressant att bindningsfaktorerna mellan ThT och ANS skiljs åt med nästan en faktor fem för insulinfibriller (1,0 för ThT och 4,6 för ANS), medan det inte finns någon nämnvärd skillnad för lysozymfibriller (1,6 för ThT och 2,4 för ANS). Denna skillnad i bindningsfaktor för insulinfibriller visar att ANS binder till andra ytor på insulinfibrillerna än den β -flakstruktur som ThT binder till. Skillnaden i bindningsfaktor tyder också på att det finns färre bindningssäten för ThT, som enbart binder i fåror, jämfört med ANS som även kan binda till andra ytor på insulinfibrillerna än de ThT binder till.

I våra studier med monomert insulin och lysozym har vi verifierat att ThT är ett fibrillspecifikt färgämne eftersom ThT inte alls fluorescerar i närvaro av monomert insulin eller lysozym. Liknande försök med ANS visade att detta färgämne fluorescerar både vid interaktion med monomert insulin och med insulinfibriller, dock med en avsevärd högre fluorescensintensitet med insulinfibriller. Det är naturligt att ANS kan fluorescera även med monomert protein, då ANS är en markör för hydrofoba ytor. Monomert och fibrillärt insulin har dock olika hydrofoba ytor, vilket verifieras från resultatet i **figur 10B** där ett skift och en fluorescensökning observeras mellan monomert och fibrillärt insulin med ANS. Med tanke på att det var en låg fluorescensintensitet för monomert insulin jämfört med insulinfibriller och att CD-mätningarna visade att det inte fanns nämnvärda mängder av monomert insulin i fibrillproverna, bortsågs bidrag från monomert insulin i våra fluorescensstudier. ANS fluorescerar inte alls med lysozymfibriller, vilket tyder på att det inte finns några hydrofoba ytor på monomert lysozym för ANS att binda till. Däremot visar våra mätningar att det bildas hydrofoba ytor när lysozym bildar amyloida fibriller.

5.5 Nya färgämnen som binder till amyloida fibriller

Sju av de åtta nya färgämnen som ingick i den här studien binder till insulinfibriller. Samtliga uppvisar positiv LD-signal i någon eller alla toppar i LD-spektrumet, vilket innebär att de binder företrädesvis med sin långaxel parallellt med insulinfibrillens långaxel. Dessa färgämnen binder därför troligtvis på liknande sätt som ThT, det vill säga de binder i fårorna mellan β -flakens sidokedjor (**figur 3**). Det enda av de studerade färgämnena som inte binder till insulinfibriller är α CN-TO (**figur 4F**). Bruce Armitage, som tillhandahöll de nya färgämnena, informerade oss om att α CN-TO inte heller binder till DNA eftersom α CN-TO har en icke-plan konformation. Det går därför att anta att en plan konformation krävs för bindning till insulinfibriller, vilket i sin tur antyder att bindningssätet är trångt. Utrymmet där ThT binder till insulinfibriller, i fårorna mellan β -flakens sidokedjor, är förhållandevis smalt (ett par Ångström). De sju färgämnen som binder kan antas få plats där, medan α CN-TO således inte binder på grund av sin icke-plana konformation.

Med tanke på att MGT-1, MGT-2, MGT-3 samt MG-BisT-Alkyne är stora molekyler jämfört med övriga färgämnen som studerades i detta projekt (**figur 4**) är det förvånande att samtliga av MGT-molekylerna binder till insulinfibriller. Det är dessutom intressant att MGT-3 (**figur 4I**) ger upphov till både en negativ och en positiv LD-signal då den binder till insulin- och lysozymfibriller (**figur 20**). Även MGT-2 visar liknande LD-signaler medan MGT-1 och MG-BisT-Alkyne enbart uppvisar positiv LD-signal. Bruce Armitages kollega, biträdande professor David Yaron (Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA), har tagit fram information om elektronövergångarnas riktning i MGT-molekylerna. Det finns en övergång som är gemensam för dessa MGT-molekyler och denna övergång är orienterad approximativt mellan de två kväveatomerna (vågrät pil i **figur 22**) i den del av MGT-färgämnet som är gemensam för alla MGT-molekyler (de två aromatingarna i vågrät riktning i **figur 4G-J**). Vi antar därför att denna övergång ger upphov till den positiva LD-signalen, eftersom denna



Figur 22. Molekylstruktur för MGT-3 där pilarna approximativt illustrerar hur elektronövergångar i MGT-molekylerna är orienterade.

signal uppkommer för samtliga MGT-molekyler. Detta betyder att MGT-molekylerna troligtvis binder till amyloida fibriller genom att den gemensamma strukturen för MGT-molekylerna (med övergång orienterad mellan de två kväveatomerna) interagerar med fårorna längs fibrillaxeln. Den negativa LD-signalen för MGT-2 och MGT-3 uppkommer därmed från en ytterligare elektronisk övergång, vinkelrät mot den förra, som sker mellan tiofenringarna (lodrät pil i **figur 22**). Dessa tiofenringar orienterar sig därmed annorlunda till fibrillens långaxel jämfört med den gemensamma delen av MGT-molekylerna, eftersom elektronövergångarna över de olika delarna ger upphov till LD-signaler med motsatta tecken. Det är också intressant att notera att LD-signalen från MGT-3:s tiofenringar är olika, sett till både λ_{\max} och styrka, för insulinfibriller och lysozymfibriller (**figur 20**) och att tiofenringarna därmed är orienterade olika vid bindning till de olika fibrillerna.

Förutom MGT-3 valdes även DIR, α CN-DIR och OTB-SO₃ ut för studier med lysozym och slutsatsen drogs att samtliga binder mer parallellt än vinkelrätt till lysozymfibriller (**figur 17B-20B**). För DIR, α CN-DIR och OTB-SO₃ observeras en skillnad på 4 nm eller mindre i λ_{\max} i LD-mätningar för färgämnet bundet till insulin- respektive lysozymfibriller (**tabell 3**). Dessa marginella skillnader i λ_{\max} antyder att färgämnena binder på samma sätt till de båda modellfibrillerna.

I våra mätningar har ett skift observerats för en del av de fibrillbindande färgämnenas λ_{\max} mellan absorbans och LD. DIR har ett skift på 24 nm med insulinfibriller och 18 nm med lysozymfibriller och α CN-DIR har motsvarande skift på 28 nm respektive 10 nm (**tabell 3**). En tänkbar anledning till att absorptionspektrumet skiftar från LD-spektrumet är att en stor andel av färgämnen inte binder till de amyloida fibrillerna. I LD:n erhålls endast signal från de färgämnesmolekyler som bundit till de amyloida fibrillerna medan absorbansen mäter både bundna och obundna färgämnesmolekyler. Färgämne i lösning har fri rotation kring sin axel och har därmed högre energi, vilket motsvarar kortare våglängd. λ_{\max} i absorbansen blir därför förskjuten mot kortare våglängd, jämfört med LD:s λ_{\max} , på grund av de obundna färgämnesmolekylerna, vilket är i enlighet med resultaten (**tabell 3**). Att färgämne bundet till amyloida fibriller ger upphov till längre våglängd än obundet färgämne kan förstås utifrån att elektroner är delokaliserade över färgämnesmolekylerna i så kallade π -system. Dessa π -system ger upphov till längre λ_{\max} för färgämnet ju planare π -systemet är. Om molekylerna inte är plan bryts konjugeringen och delokaliseringen. Bindning av färgämne till fibrillerna i fibrillstrukturen (**figur 3**) resulterar i en planare molekylstruktur för färgämnet och därmed erhålls längre λ_{\max} vid LD-mätning jämfört med absorbansmätning.

LD utvärderades som ett high-throughput screening-verktyg i ett försök där fyra färgämnen, DIR, α CN-DIR, OTB-SO₃ och α CN-TO, testades samtidigt med insulinfibriller. Vi visar i **figur 15** att samtliga ämnen som binder till insulinfibriller kan identifieras i LD-spektrumet på basis av deras respektive λ_{\max} . Resultatet visar att LD kan användas för att identifiera flera amyloidbindande molekyler samtidigt, förutsatt att deras absorbansstoppar inte överlappar. För att direkt identifiera samtliga färgämnen i en enda LD-mätning anser vi att λ_{\max} i absorbans för dessa ämnen bör skilja sig från varandra med ungefär 70 nm. Detta kriterium sätts upp i syfte att undvika att topparna från de olika ämnena överlappar. Avståndet 70 nm baseras på att det i studierna har förekommit ett skift på upp till 30 nm mellan absorbans och LD.

Vid LD-mätning med en väldigt stor mängd ämnen kan flera av dessa ha närliggande λ_{\max} . Om endast ett av ämnena i detta våglängdsområde ger upphov till en LD-signal går det från den mätningen inte att identifiera vilket av ämnena som binder till amyloida fibriller. Detta beror på att alla ämnen inom samma våglängdsområde skulle ge upphov till en topp inom ett intervall av några få nanometer vid bindning till amyloida fibriller. För att identifiera vilket av ämnena som binder till amyloida fibriller kan ytterligare LD-mätningar göras endast för ämnena inom våglängdsområdet i fråga. Övriga ämnen från den första mätningen kan därmed sällas bort, eftersom de inte binder orienterat till amyloida fibriller och därför är de inte lämpliga för att detektera amyloida fibriller. En stor mängd ämnen skulle alltså snabbt kunna förkastas om ingen LD-signal erhålls i en high-throughput-mätning, eftersom detta innebär att inget av ämnena binder till amyloida fibriller.

Vi bedömer att LD skulle kunna fungera relativt bra som ett high-throughput screening-verktyg, eftersom vi har visat att det i samma mätning faktiskt går att detektera minst tre färgämnen som binder till amyloida fibriller. Dessutom är det möjligt att snabbt avgöra vilka ämnen som inte binder till amyloida fibriller. I de fall då LD-signal erhålls krävs dock vidare LD-mätningar för att avgöra vilket av ämnena inom detta våglängdsområde som binder till amyloida fibriller. I vårt fall band nästan alla av de undersökta molekylerna till fibriller, men i en större och mer förutsättningslös screen hade troligen betydligt färre LD-signaler för färgämnen erhållits. Detta medför att fortsatta studier för att identifiera de fibrillbindande färgämnen inte blir så omfattande.

I ett avslutande försök att utvärdera de nya färgämnen testades huruvida de fluorescerar vid bindning till amyloida fibriller, vilket är viktigt för framtida användning *in vitro* eftersom fluorescensspektroskopi är överlägset absorptions i fråga om känslighet. Fluorescensdetektion är dessutom nödvändigt för avbildning med mikroskopi. Vid bindning till insulinfibriller fluorescerade inte de fyra MGT-molekylerna, vilket minskar deras användbarhet som potentiella färgämnen för att detektera amyloida fibriller i de exempel som nämnts ovan. De skulle dock fortfarande kunna vara aktuella för exempelvis PET-scanning.

Fluorescensintensiteten för DIR och α CN-DIR (**figur 21**) ökar fyrfaldigt då ämnena binder till insulinfibriller jämfört med monomert insulin. Denna faktor kan jämföras med motsvarande faktor åtta för ANS bundet till insulin och ungefärlig faktor 80 för ThT. Trots att faktorn för DIR och α CN-DIR är lägre än den för ANS, är DIR och α CN-DIR ändå intressanta för vidare studier eftersom LD-mätningarna visade att de binder orienterat till amyloida fibriller och faktorn fyra antyder att de är relativt fibrillspecifika. DIR och α CN-DIR absorberar vid längre våglängd än ThT, vilket är en intressant egenskap för bland annat mikroskopi av biologiska material. Detta grundar sig i att ThT:s emission överlappar med absorptionsområdet för färgämnen som exciteras med den vanligaste laserlinjen (488 nm), vilket kan resultera i förvrängda fluorescenssignaler från båda molekylerna. DIR och α CN-DIR har även närliggande λ_{\max} där den ena kan excitera den andra om avståndet mellan molekylerna är mindre än 10 nm genom en process som kallas energiöverföring (Kinoshita, 2003).

6 Slutsatser och rekommendationer

Ett protokoll för bildande av lysozymfibriller som genererar rena fibrillprover togs fram under projektet. Detta protokoll kan användas i fortsatta studier för att underlätta mätningar på lysozymfibriller. Projektet visade även att undersökningar med insulinfibriller är mindre komplicerade än undersökningar med lysozymfibriller eftersom fibrilleringen för insulin är mer effektiv. Lysozymfibriller är ändå ett bra komplement till insulinfibriller i studier då det krävs olika typer av amyloida fibriller för att kunna göra jämförelser. Inga stora skillnader kunde utläsas mellan insulin- och lysozymfibriller med CD, men vi visade tydligt att det finns strukturella skillnader mellan dem med avseende på bindningen av ANS och därmed alltså med avseende på deras ythydrofobicitet. För att vidare studera de strukturella skillnaderna skulle FTIR kunna användas (Zandomenighi, 2004). Denna metod fanns tyvärr inte tillgänglig under detta projekt.

Vi visade att det finns skillnader mellan hur ThT och ANS binder till de olika modellfibrillerna och fann att ANS har andra bindningssäten utöver den β -flakstruktur som ThT binder till på de amyloida fibrillerna. I studierna visade vi, med hjälp av ANS, att de två modellfibrillerna är strukturellt olika i det avseende att de har olika typer av hydrofoba ytor. Vi kunde dessutom visa att ANS binder orienterat till lysozymfibriller men inte till insulinfibriller. Detta är intressant eftersom det tyder på att lysozymfibriller har hydrofoba fåror i fibrillens β -flakstruktur men att så inte är fallet för insulin. Studierna med ThT visade att ThT binder lika starkt till insulin- och lysozymfibriller men att ThT däremot har fler bindningssäten på lysozymfibriller. I framtida studier skulle det vara intressant att jämföra ThT och ANS med andra typer av amyloida fibriller för att erhålla mer information om både färgämnenas och fibrillernas egenskaper.

Vi fann att de sju nya färgämnen α CN-DIR, DIR, OTB-SO₃, MGT-1, MGT-2, MGT-3 och MG-BisT-Alkyne binder till amyloida fibriller på ett likartat sätt som ThT och de nya färgämnen har därför potential som prober för amyloiddetektion. Av dessa anser vi att α CN-

DIR, DIR, MGT-2 och MGT-3 är mest intressanta för vidare studier. α CN-DIR och DIR är lovande som nya färgämnen för studier av amyloida fibriller baserat på att de har ett längre λ_{\max} än ThT samt att våra fluorescensstudier visar att de har en fibrillspecificitet som har potential i framtida studier. MGT-2 och MGT-3 är intressanta eftersom de har både en positiv och en negativ LD-signal samt att deras molekylstrukturer är avsevärt större och mer komplexa relativt ThT. Detta skulle kanske kunna utnyttjas för att erhålla mer detaljerad information om fibrillens struktur. Dessutom skiljer sig LD-spektrana åt för MGT-3 med insulin- respektive lysozymfibriller (**figur 20**), där en tänkbar förklaring är att den del av MGT-3 som ger upphov till den negativa LD-signalen orienterar sig olika med insulin- respektive lysozymfibriller.

Nästa steg i utvärderingen av dessa fyra färgämnen skulle vara att ytterligare karaktärisera dem samt undersöka deras interaktion med flera typer av amyloidbildande proteiner, till exempel amyloid- β som orsakar Alzheimersdemens. Det faktum att en oväntat stor andel av de testade proteinbindande färgämnena även binder till amyloida fibriller medför att denna typ av färgämnen bör utvärderas för interaktion till amyloida fibriller. För att utföra storskaliga studier på flera sådana färgämnen eventuella bindning till amyloida fibriller vore ett high-throughput screening-verktyg önskvärt. Våra studier har visat att LD, med vissa begränsningar, fungerar relativt bra för detta ändamål.

7 Källförteckning

- Bruce Armitage, professor, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA. Opublicerat material.
- Arnaudov, L.N. och de Vries, R. (2005) Thermally Induced Fibrillar Aggregation of Hen Egg White Lysozyme. *Biophysical Journal*, vol. 88, nr 1, ss. 515-526.
- Biancalana, M. och Koide, S. (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1804, nr 7, ss. 1405-1412.
- Bolognesi, B. et al. (2010) ANS Binding Reveals Common Features of Cytotoxic Amyloid Species. *ACS Chemical Biology*, vol. 5, nr 8, ss. 735-740.
- Buell, A.K. et al. (2011) Probing small molecule binding to amyloid fibrils. *Phys. Chem. Chem. Phys*, vol. 13, nr 45, ss. 244-252.
- Bulheller, B. et al. (2009). Flow linear dichroism of some prototypical proteins, *Journal of the American chemical society*, vol. 131, nr 37, ss. 13305-13314.
- Burrows, A. (2009) *Chemistry³: Introducing inorganic, organic and physical chemistry*. Oxford: Oxford University Press.
- Carlsson, N., Kitts, C., Åkerman, B. (2012) Spectroscopic characterization of Coomassie blue and its binding to amyloid fibrils. *Analytical Biochemistry*, vol. 420, nr 1, ss. 33-40.
- Childers, S. et al. (2009). Templating Molecular Arrays in Amyloid's Cross- β Grooves, *Journal of American Chemical Society*, vol. 131, nr 29, ss. 10165-10172.
- Chiti, F. och Dobson, C.M. (2006) Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *The Annual Review of Biochemistry*, vol. 75, ss. 333-66.
- Cohen, A.S., och Calkins, E. (1959) Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins, *Nature*, vol. 183, nr 4669, ss. 1202-1203.
- Cohen, S. et al. (2011) Nucleated polymerization with secondary pathways. I. Time evolution of the principal moments, *The Journal of chemical physics*, vol. 135, nr 6, ss. 065105-1-065105-16.
- Conchello, J.A. och Lichtman, J.W. Fluorescence microscopy, *Nature Methods*, vol. 2, nr 12, ss. 910-919.

- Elsheimi, W. M., Mohammad, I. A. och Elsayed, A.A. (2010) Wide-angle x-ray scattering as a probe for insulin denaturation. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 46, nr 5, ss. 471-477.
- Esbjörner, E.K. et al. (2007). Tryptophan orientation in model lipid membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 361, nr 3, ss. 645-650.
- Esbjörner, E.K., forskarasistent, Chalmers Tekniska Högskola, Göteborg, Sverige. Opublicerat material.
- Gill, S.C. och von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, vol. 182, nr 2, ss. 319-326.
- Greenfield, N. (2007) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, vol. 1, nr 6, ss. 2876-2890.
- Greenfield, N. och Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, vol. 8, nr 10, ss. 4108-4116.
- Groenning, M. et al. (2007) Study on the binding of Thioflavin T to β -sheet-rich and non- β -sheet cavities. *Journal of Structural Biology*, vol. 158, nr 3, ss. 358-369.
- Groenning, M. et al. (2007) Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, vol. 159, nr 3, ss. 483-497.
- Hawe, A., Sutter, M. och Jiskoot, W. (2008) Extrinsic Fluorescent Dyes as Tool for Protein Characterization. *Pharmaceutical Research*, vol. 25, nr 7, ss. 1487-1499.
- Haezebrouck, P, Morozova, L. och Van Cauwelaert, F. (1991) The thermal stability of equine and pigeon lysozymes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 43, nr 2, ss. 395.
- Jaimohan, S.M., Naresh, M.D. och Mandal, A.B. (under tryckning) Crystal structure of Bovine Insulin (Hexameric form). *Protein Database*.
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2ZP6#>. (2012-05-11)
- Kelly, J. W. (1998) The Environmental Dependency of Protein Folding Best Explains Prion and Amyloid diseases. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, nr 3, ss. 930-932.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. och Price, N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1751, nr 2, ss. 119-139.
- Kinoshita, A. et al. (2003) Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes, *Journal of Cell Science*, vol. 116, nr 16, ss. 3339-3346.
- Krebs, M.R.H., Bromley, E.H.C. och Donald, A.M., (2004) The binding of Thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications, *Journal of Structural Biology*, vol. 149, nr 1, ss. 30-37.
- Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer.
- Mališauskas, M. et al. (2003) Amyloid Protofilaments from the Calcium-binding Protein Equine Lysozyme: Formation of Ring and Linear Structures Depends on pH and Metal Ion Concentration, *Journal of Molecular Biology*, vol 330, nr 4, ss. 879-890.
- Mathis, C.A., et al. (2002) A Lipophilic Thioflavin-T Derivative for Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Amyloid in Brain, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 12, nr 3, ss. 295-298.
- Nielsen, L. et al. (2000) Studies of the Structure of Insulin Fibrils by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Electron Microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 90, nr 1, ss. 29-37.
- Nilsson, M.R. (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, vol. 34, nr 1, ss. 151-160.
- Nordén, B, Kubista, M och Kurucsev, T. (1992) Linear dichroism spectroscopy of nucleic acids, *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 25, nr 1, ss. 51-170.

- Phillips, D.C. (1967) The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. *National Academy of Science*, vol. 57, nr 3, ss. 483-495.
- Radley, J.A. och Grant, J. (1935) *Fluorescence analysis in ultra-violet light*. D. Van Nostrand Company, Inc.
- Rodger, A. och Nordén, B. (1997) *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. Oxford: University Press.
- Serpell, L. C. et al. (2000) Protofilament substructure of amyloid fibrils, *Journal of Molecular Biology*, vol. 300, nr 5, ss. 1033-1039.
- Sipe, J. D. och Cohen, A. S. (2000) Review: History of the Amyloid Fibril. *Journal of Structural Biology*, vol. 130, nr 2-3, ss. 88-98.
- Sluzky, V. et al. (1991) Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88, nr 21, ss. 9377-9381.
- Sunde, M. och Blake, C. (1997) The Structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Advances in Protein Chemistry*, vol. 50, ss. 123-158.
- Vassar, P.S. och Culling C.F.A. (1959) Fluorescent stains with special reference to amyloid and connective tissues, *Archives of pathology & laboratory medicine*, vol. 68, ss. 487-494.
- Virchow, R. (1854) Zur cellulose-frage. *Vzrchows Archive*, vol. 6, ss. 415-426.
- Wigenius, J. et al. (2011) Interactions between a luminescent conjugated polyelectrolyte and amyloid fibrils investigated with flow linear dichroism spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 408, nr 1, ss.115-119.
- Whitmore, L. och Wallace, B.A. (2007) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, vol. 89, nr 5, ss. 392-400.
- Workman, J. och Springsteen, A. (1998) *Applied Spectroscopy*. Academic Press.
- Yaron, D., biträdande professor, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA. Opublicerat material.
- Yu, X. C. och Strobel, H. W. (1996) Interactions of 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) and cytochrome P450 2B1: Role of ANS as an effector as well as a reporter group. *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 162, nr 2, ss. 89-95.
- Zandomenighi, G. et al. (2004) FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science*, vol. 13, nr 12, ss. 3314-3321.