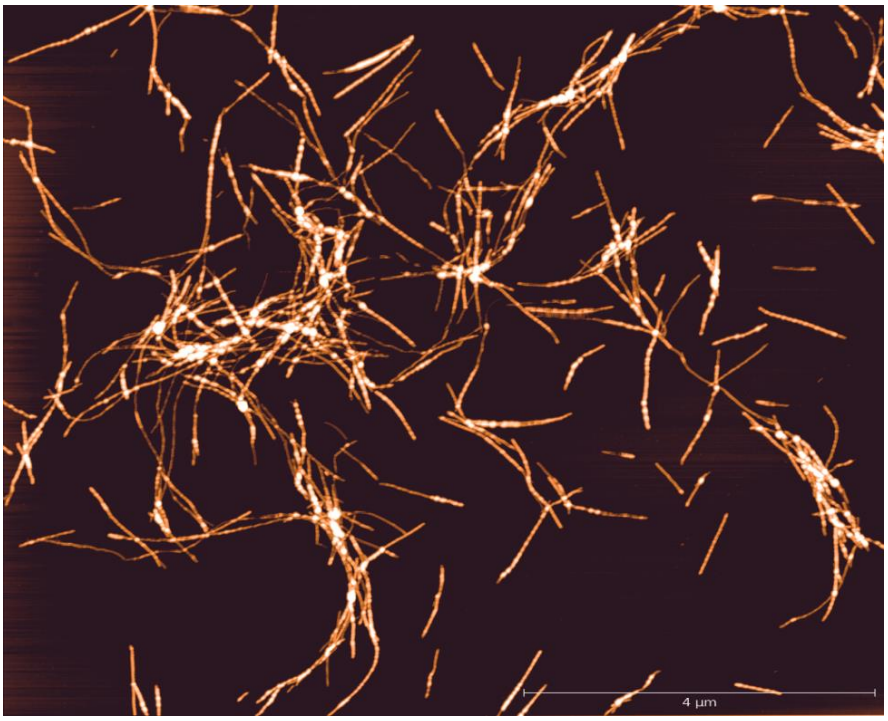



# Biofysikaliska studier av amyloida proteinfibrillers kompaktering

## Kartläggning av grundläggande mekanismer för plackbildning i Alzheimerdemens

*Kandidatarbete inom civilingenjörsprogrammen Kemiteknik och Bioteknik*
*Handledare: Elin Esbjörner Winters och David Lindberg*

Matilde Bengtsson
Jessy Nassif
Lisa Rundberg
Eneas Schmidt
Elin Sundin
Emelie Svensson

Institutionen för Kemi- och bioteknik,
Avdelningen för kemi och biokemi
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2014
KBTX01-14-08

## Sammanfattning

Alzheimerdemens (AD) är en åldersrelaterad sjukdom vars förekomst har ökat drastiskt med ökad medellivslängd. Mekanismerna bakom sjukdomens uppkomst är ännu relativt okända. AD karaktäriseras av att felveckade proteiner bildar proteinrika aggregat i form av senila plack som ansamlas i hjärnan. Placken består till största delen av amyloida fibriller av proteinet amyloid-β. Syftet med det här projektet är att kartlägga andra biologiska komponenter som finns ansamlade i placken och sedan att undersöka hur dessa kan påverka amyloida fibrillers förmåga att kompaktera *in vitro*. Vi har gjort en litteraturstudie för att kartlägga vilka komponenter som återfinns i plack, den visade att det bland annat finns flera proteiner, metalljoner och glukosaminoglykaner. Vi valde därefter att undersöka ett flertal salter, glukosaminoglykanen heparin samt modellproteinet bovint serumalbumin (BSA). Vi studerade även hur amyloida fibrillers kompaktering påverkas av thioflavin-T (ThT) eftersom det är ett av de vanligast förekommande färgämnena inom amyloidforskning.

Vi använde linjär dikroism, cirkulär dikroism, fluorescensspektroskopi, atomkraftsmikroskopi och dynamisk ljusspridning för att biofysikaliskt karaktärisera hur amyloida fibriller påverkas av de utvalda komponenterna. I försöken användes amyloida fibriller av modellproteinet bovint insulin. Vi fann att metalljoner som inte är monovaleta har en stor effekt på kompakteringen och detta gäller även för deras respektive motjoner. Försöken för heparin visar på möjligheter till en kompakterande effekt, men experimenten är inte entydiga. Detta skulle kunna bero på att heparin är en stor, styv molekyl som är extremt negativt laddad och svår att analysera. Proteinet som undersöktes, BSA, ökade också kompaktering av fibrillerna. Våra studier tyder på att ThT inte påverkar kompakteringen nämnvärt och det är därför lämpligt att fortsätta använda det som fibrillspecifikt färgämne.

## Abstract

The lifespan of human beings has increased significantly in the last decades. As a consequence, age-related diseases such as Alzheimer's dementia (AD) are becoming one of society's biggest strains. The mechanisms causing the disease are yet to be explored. One of the characteristics of AD is protein misfolding which causes aggregation of monomeric proteins into amyloid fibrils. These fibrils can further densify into aggregates in the shape of senile plaques that accumulates in the brain tissue. In AD the amyloid fibrils are composed of the protein amyloid-β (Aβ). The aim for this project is to identify other biological components that are present in senile plaques and to investigate how they affect the compaction ability of amyloid fibrils *in vitro*. A literature study was made to determine other biological components present in senile plaques. The study concluded that, other than Aβ, a number of proteins, metal ions and glycosaminoglycans (GAGs) could be found in the plaques of patients with AD. Several salts, the GAG heparin and the model protein bovine serum albumin (BSA) were chosen to be investigated further. In addition to the study of the biological components and their impact on amyloid fibrils, the effect of the dye thioflavin-T (ThT) was also investigated. The reason for the investigation of ThT was that ThT-fluorescence was used as one of the methods to analyze the compacting effect that the biological components exert on the fibrils. ThT is one of the most commonly used dyes in amyloid research and it is therefore crucial to know the effect it has on amyloid fibril compaction.

We used linear dichroism, circular dichroism, fluorescence spectroscopy, atomic force microscopy, and dynamic light scattering to biophysically characterize how amyloid fibrils are affected by the chosen components. In the experimental study the protein bovine insulin were used as a model for amyloid fibrils. We concluded that non-monovalent metal ions have a significant impact on the degree of compaction which is also true for their counterions. Heparin is a large, stiff molecule which is highly charged and as a result it was difficult to examine; despite this it has a possible effect on the compaction of the fibrils. The protein that we investigated, BSA, also showed a significant effect on the degree of compaction. Our studies of ThT showed that the dye had a minor impact on the compaction and is therefore a suitable dye for further studies on amyloid fibril compaction.

This report is written in Swedish.

# Innehållsförteckning

1 Inledning ..... 1
1.1 Syfte med projektet ..... 1
1.2 Avgränsning ..... 1
2 Teori: Amyloida fibrillers förekomst och biofysikaliska metoder för att undersöka kompaktering ..... 2
2.1 Senila plack ..... 2
2.2 Amyloida fibriller ..... 2
2.3 Insulin som modellprotein för fibrillbildning ..... 3
2.4 Kompakterande molekyler ..... 4
2.5 Biofysikaliska analysmetoder ..... 4
2.5.1 Linjär dikroism ..... 4
2.5.2 Cirkulär dikroism ..... 5
2.5.3 Fluorescensspektroskopi ..... 6
2.5.4 Atomkraftsmikroskopi ..... 6
2.5.5 Centrifugering ..... 7
2.5.6 Dynamisk ljusspridning ..... 7
3 Utförande: Analysmetodernas tillämpning ..... 8
3.1 Material ..... 8
3.2 Preparation av insulinfibriller ..... 8
3.3 Linjär dikroism ..... 8
3.4 Circulär dikroism ..... 9
3.5 Fluorescensspektroskopi ..... 9
3.6 Atomkraftsmikroskopi ..... 9
3.7 Centrifugering ..... 9
3.8 Dynamisk ljusspridning ..... 9
4 Resultat från litteraturstudien ..... 9
4.1 Metaller ..... 11
4.2 Glukosaminoglykaner ..... 12
4.3 Proteiner ..... 12
4.4 Vidare utredning av de utvalda komponenterna ..... 13
5 Experimentella resultat ..... 13
5.1 Preparation av insulinfibriller ..... 14
5.2 Inverkan på insulinfibrillernas kompakteringsgrad ..... 16
5.2.1 Thioflavin-T ..... 16

5.2.2 Salter ..... 17
5.2.3 Heparin ..... 21
5.2.4 Bovint serumalbumin ..... 22
5.2.5 Sammanfattning av experimentella resultat ..... 23
6 Diskussion: De olika komponenternas påverkan av kompakteringsgraden ..... 24
7 Slutsatser ..... 27
8 Rekommendationer för vidare försök ..... 27
9 Källförteckning ..... 28

# 1 Inledning

Varje år diagnosticeras 17 500 människor i Sverige med Alzheimerdemens (AD). Denna och liknande neurodegenerativa sjukdomar såsom Parkinsons sjukdom är åldersrelaterade, vilket leder till att förekomsten av dem har ökat drastiskt i takt med att befolkningens medellivslängd ökar, både i industrialiserade länder och i utvecklingsländer[1].

AD medför att hjärncellerna förtvinar och successivt dör, vilket speciellt drabbar områden i hjärnan som styr minnesfunktion, språklig förmåga, rumslig orientering och praktiska färdigheter. Typiskt för den här sortens demens är att patientens tillstånd försämras gradvis i takt med att hjärnskadan sprider sig[2]. Demenssjukdomar är idag den fjärde vanligaste dödsorsaken i västvärlden och det saknas botemedel. Detta gör att sjukdomarna, förutom att förorsaka stort lidande för de drabbade även är ekonomiskt kostsamma för samhället, särskilt eftersom patienter med demens har ett mycket omfattande vårdbehov[1].

AD och liknande neurodegenerativa sjukdomar karaktäriseras av att felveckade proteiner bildar aggregat som ansamlas i hjärnan. Aggregaten består av trådlika proteinpolymerer med högt β-flakinnehåll och kallas amyloida fibriller. Fibrillerna associerar och kompakteras i hjärnan, i AD benämns dessa kompakterade proteinrika strukturer senila plack. Amyloida fibriller är företrädelsevis linjära polymerer med lång persistenslängd, det vill säga de är styva. För att bilda plack måste de sannolikt kompakteras genom att böjas och lindas runt varandra. Hur detta sker och vilka molekylära faktorer som kan påverka kompakteringsgraden är inte utforskat. Plack innehåller dock inte bara proteinfibriller utan också bland annat lipider, andra proteiner och metaller[3]. En hypotes är att dessa molekyler har en effekt på kompakteringsgraden. En utgångspunkt för det här projektet är misstanken att även ThT kan ge upphov till kompaktering, något som skulle kunna påverka tolkningen av resultat[4].

## 1.1 Syfte med projektet

Syftet är att studera hur amyloida proteinfibriller kompakteras. Målet med projektet är att först identifiera och klassificera ämnen som inlagras i senila plack för att sedan, med biofysikaliska tekniker, undersöka hur olika typer av ämnen kan påverka i vilken utsträckning amyloida proteinfibriller kan kompakteras *in vitro,* som en modell för hur plackbildning kan ske i hjärnan. Målsättningen är att kartlägga viktiga fysikalkemiska egenskaper hos olika molekyler som kan underlätta kompakteringen av amyloida fibriller i hjärnan och därmed bidra till att öka den molekylära förståelsen av sjukdomsförloppet i AD.

## 1.2 Avgränsning

Projektet innefattar biofysikaliska studier av kompaktering av amyloida fibriller i närvaro av biologiskt relevanta molekyler samt det organiska färgämnet ThT. Studien är begränsad till *in vitro* försök för att kunna studera enskilda processer i detalj. Projektet innefattar därför inte någon analys av biologiska prover. Ett begränsat antal representativa ämnen har valts ut för att belysa olika egenskaper såsom storlek, laddning och struktur.

# 2 Teori: Amyloida fibrillers förekomst och biofysikaliska metoder för att undersöka kompaktering

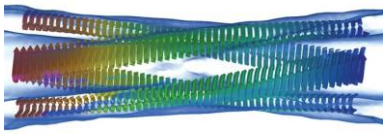
Aggregation av proteinmonomerer till amyloida fibriller har en stark koppling till många neurodegenerativa sjukdomar. Uppbyggnaden av amyloida fibriller initieras av att monomerer associerar till varandra och bildar oligomerkärnor, följt av att kärnorna förlängs till fibriller i en elongeringsprocess. Amyloida fibriller återfinns i senila plack tillsammans med en mängd andra biologiska komponenter som skulle kunna underlätta kompaktering av amyloida fibriller.

## 2.1 Senila plack

Hos personer med Alzheimerdemens är det proteinet amyloid-β (Aβ) som bildar de amyloida fibriller som kompakteras till senila plack i hjärnan[4]. Plack är runda sammanhängande inlagringar till skillnad från de avlånga fibrillerna [5]. Senila plack är väldigt komplexa och deras sammansättning varierar. De finns i flera olika former beroende på hur långt gången sjukdomen är, de kan kallas diffusa, primitiva, klassiska eller helt kompakterade. Det finns även olika varianter av Aβ-peptider, den vanligaste är $Aβ_{40}$ medan $Aβ_{42}$ är den vanligast förekommande i plack. Aβ bildas genom en klyvning av proteinet amyloid precursor protein (APP). De nedsänkta siffrorna beskriver hur många aminosyror peptiden innehåller, den enda skillnaden mellan $Aβ_{42}$ och $Aβ_{40}$ är således att $Aβ_{42}$ är två aminosyror längre. $Aβ_{42}$ finns både i de diffusa och i de mer utvecklade klassiska placken. Mer utvecklade plack innehåller också den mer lösliga $Aβ_{40}$-peptiden och en del andra komponenter[6]. $Aβ_{42}$ har en teoretisk isoelektrisk punkt på 5,31 vilket innebär att den är negativt laddad i kroppen och har ett positivt GRAVY-värde vilket innebär att den är hydrofob[7, 8]. Mekanismerna för hur Aβ-peptider kompakteras och bildar plack är inte utforskade och det är därmed inte heller klarlagt hur de molekyler som återfinns koaggregerade med de amyloida fibrillerna i plack påverkar kompakteringen av fibrillerna.

## 2.2 Amyloida fibriller

Amyloida fibriller utgörs av proteiner som bildat trådlika polymerstrukturer med högt β-flakinnehåll (se **figur 1**). De består av 5-6 stycken så kallade protofilament som är ihoptvinnade längs med fibrillens axel[9]. Protofilamenten är ungefär 3 nm i diameter och består av peptidkedjor som bildat en regelbunden β-flakstruktur. Avståndet mellan β-flaken är ungefär 0,47 nm och strukturen stabiliseras av ett stort antal vätebindningar, vilket gör att amyloida fibriller anses vara den termodynamiskt mest stabila proteinkonformationen. Protofilamenten är ihoptvinnade så att β-flaken hamnar vinkelrätt mot fibrillaxeln. Amyloida fibriller är vanligtvis runt 10 nm i diameter och från 100 nm till flera µm långa[10].



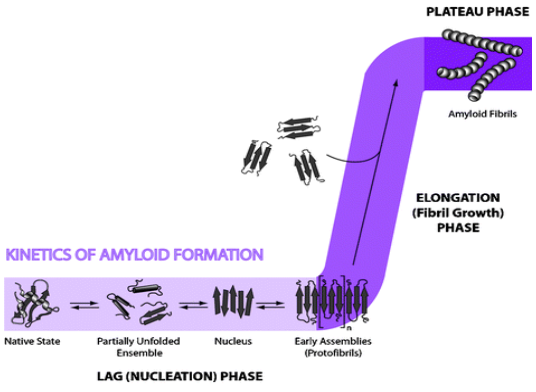
Figur 1. Amyloid fibrill, visar β-flak strukturen och hur protofilamenten är ihoptvinnade[11].

Proteiner är viktiga för de allra flesta reglerings- och kontrollmekanismerna i kroppens celler**,** det är därför centralt för i princip alla biokemiska processer som pågår i levande celler att de molekyler som ingår kan anta funktionella strukturer. Proteinerna behöver alltså ha en specifik tertiärstruktur. Ibland misslyckas cellerna med att vecka proteiner korrekt eller med att bibehålla deras struktur vilket kan leda till fibrillbildning. Det är även en central aspekt i proteinhomeostasen att behålla

proteiner i ett lösligt tillstånd för att undvika fibrillbildning. Cellulär stress och åldrande ökar mängden icke-funktionella proteiner och kan leda till en mängd olika sjukdomar[12].

De flesta proteiner kan bilda amyloida fibriller, oberoende av vilken aminosyrasekvens de har[3]. Fibriller är termodynamiskt mycket stabila under en mängd olika betingelser och det är den relativa stabiliteten för olika strukturer som tillsammans med kinetiska faktorer blir avgörande för om fibriller bildas [12]. Fibriller bildas vanligtvis under destabiliserande förhållanden, exempelvis bildar modellproteinet insulin fibriller vid lågt pH och hög temperatur. De flesta proteiner bildar inte fibriller under normala fysiologiska betingelser, när detta ändå händer är det ofta associerat med sjukdom. Amyloida fibriller kan även, under förutsättning att de bildas under kontrollerade former, ha en funktionell biologisk roll; exempelvis använder bakterien *Escherichia coli* fibriller av proteinet curlin för att kolonisera inerta ytor och binda till andra proteiner[3]. Det är känt att fibriller uppvisar likartade egenskaper oavsett vilket protein de består av [13]. Denna likhet mellan olika fibrillers egenskaper möjliggör användandet av modellprotein för biofysikaliska studier. Utöver Aβ har även det fibrillbildande proteinet α-synuklein hittats hos AD-drabbade patienter. Detta protein är mer frekvent förekommande i de neurodegenerativa sjukdomarna Parkinsons sjukdom och Lewykroppsdemens[14].

Amyloida fibriller bildas genom en polymerisationsreaktion som sker i tre faser; kärnbildningsfas (nucleation phase), tillväxtfas (elongation phase) och jämviktsfas (plateau phase)[15](se **figur 2**). Under kärnbildningsfasen byggs monomerer av proteinet ihop till oligomerkärnor som har en sådan konformation att fibriller kan börja växa. Kärnbildningsfasen kallas också för lagfasen eftersom kärnbildningen är termodynamiskt ogynnsam och sker långsamt. När oligomerkärnorna bildats rekryterar de fler monomerer. Under tillväxtfasen har tillräckligt många elongeringskompetenta oligomerkärnor bildats för att katalysera en signifikant fibrillbildning; denna sker genom att monomerer rekryteras och förlänger oligomerkärnorna till fibriller. Denna del av reaktionen är termodynamiskt gynnsam och sker ofta mycket snabbare än lagfasen[16]. Aβ har i monomerform ingen tertiärstruktur och bildar därmed lättare amyloida fibriller än proteiner som har en tertiärstruktur. De oligomerer av Aβ som bildas under lagfasen är de som tros vara mest toxiska[17].




**Figur 2. Schematisk bild för uppbyggnaden av amyloida fibriller. Under lagfasen bildar proteinet oligomerkärnor genom reaktion mellan monomerer, fibriller bildas sedan genom en elongeringsprocess[18].**

## 2.3 Insulin som modellprotein för fibrillbildning

I projektet har vi använt oss av bovint insulin som modellprotein. Insulin har inte någon direkt koppling till neurodegenerativa sjukdomar men det är ett billigt och kommersiellt tillgängligt protein

som lätt bildar fibriller under destabiliserande förhållanden. Dessa egenskaper gör insulin till ett vanligt modellprotein inom amyloidforskning.

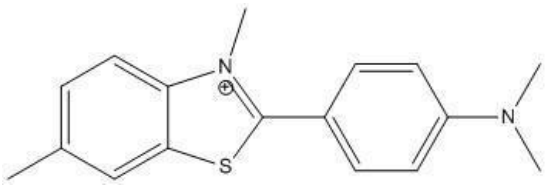
Insulin är ett hormon som består av två peptidkedjor uppbyggda av 51 aminosyror (aa) som utsöndras i bukspottkörteln [19]. Dess uppgift är att reglera cellens upptag och lagring av glukos, aminosyror, fettsyror samt att hämma nedbrytning av glykogen, fett och protein[20]. Bovint insulin har molekylvikten 5, 73 kDa och en isoelektrisk punkt (pI) motsvarande 5,3[21]. Proteiner har en positiv nettoladdning vid ett pH under pI[22]. Detta gör att insulin har en positiv nettoladdning vid pH-värdet 2,2 som är det pH vi använder oss av i projektet.

## 2.4 Kompakterande molekyler

I senila plack finns som tidigare nämnts en mängd olika biologiskt relevanta komponenter utöver de amyloida fibriller som är associerade till sjukdom. Vår litteraturstudie (se avsnitt 4) visar att AD-plack bland annat innehåller metalljoner[23], glukosaminoglykaner (GAGs)[24, 25] och proteiner[26]. Dessa komponenter skulle kunna underlätta kompakteringen av amyloida fibriller till senila plack.

Det finns en mängd olika substanser som används för infärgning av prov. Vid infärgning av amyloida fibriller används till exempel thioflavin-T (ThT), 1-anilinonaftalen-8-sulfonat (ANS) eller kongorött varav ThT är en av de vanligast förekommande amyloidfärgämnena för att undersöka förekomsten av felveckade proteinaggregat både *in vitro* och *in vivo*[27], därför anser vi att det är viktigt att undersöka hur ThT påverkar kompakteringensgraden. Vi använder förändringar i ThT-flourescens för att mäta hur biologiska komponenter interagerar med fibrillerna.

ThT är ett benzothiazole salt (se **figur 3**) vars emission ökar drastiskt när det binder till amyloida fibriller[28]. En stor fördel med ThT är att färgämnet interagerar med alla typer av amyloida fibriller, oavsett vilka aminosyror de består av[29]. Detta eftersom färgämnet binder till den sekundära β-flakstrukturen oberoende av den primära strukturen hos proteiner. ThT binder endast till multimeriska fibrillstrukturer och inte till β-flakrika domäner hos naturliga proteiner[15].




Figur 3. Strukturen för det organiska färgämnet Thioflavin-T.

## 2.5 Biofysikaliska analysmetoder

Ett flertal biofysikaliska analysmetoder har utvecklats för att undersöka biomolekylers struktur, morfologi och fysikaliska egenskaper. I det här projektet har vi tillämpat metoderna linjär dikroism, cirkulär dikroism, fluorescensspektroskopi, atomkraftsmikroskopi, centrifugering och dynamisk ljusspridning för att studera amyloida insulinfibrillers kompakteringsgrad.

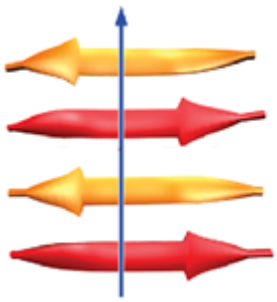
### 2.5.1 Linjär dikroism

Linjär dikroism (LD) är en spektroskopisk teknik som kan användas för att studera struktur och orientering av molekylerna i ett prov. LD används ofta för att undersöka struktur samt ligandinteraktioner hos polymera biologiska makromolekyler som till exempel DNA. Det är också en bra metod för att undersöka membranpeptiders inbindning till membraner[30]. Metoden mäter

skillnaden i absorption av linjärpolariserat ljus som infaller parallellt och vinkelrätt mot en orienteringsaxel i provet [30]:

$$\mathrm{LD} = \mathrm{A}_{\parallel} - \mathrm{A}_{\perp}$$

För att man ska kunna mäta LD måste molekylerna i provet vara orienterade, detta kan beroende på provets natur åstadkommas med till exempel visköst flöde, elektriskt- eller magnetiskt fält[30]. I detta arbete har vi använt oss av en Couette-cell från Applied photophysics för att åstadkomma visköst flöde. Cellen består av en cylindrisk kvartskyvett med en central kvartsstav. Provet placeras i kyvetten och staven förs ner i mitten på cylindern. Kyvetten är kopplad till en motor och roterar under hela mätningen. Data från en typisk LD-mätning består av ett spektrum som visar skillnad i absorption (Delta A) som funktion av våglängd (nm) (se **figur 10C**). **Figur 4** visar β-flakens position i en fibrill och hur ljuset absorberas av peptidbindingarna[31].



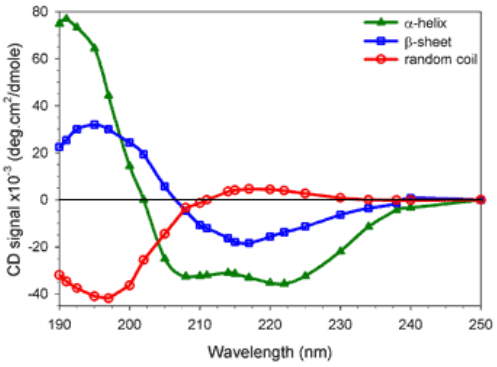
**Figur 4. β-flakens position i en fibrill, den vinkelräta pilen visar hur ljuset absorberas av peptidbindningarna (modifierad från Bulheller, 2009).**

### 2.5.2 Cirkulär dikroism

Cirkulär dikroism (CD) är liksom LD en spektroskopisk metod baserad på absorption av polariserat ljus. CD används bland annat för att undersöka kiraliteten hos organiska molekyler samt för att bestämma sekundärstrukturen hos proteiner. Det sistnämnda innefattar analys av andelen α-helix, β-flak och oordnade strukturer (random coil) [32]. Beroende på molekylens kiralitet absorberas det polariserade ljuset i varierande utsträckning och ger upphov till ett karakteristiskt spektrum[33]. CD kan mäta alla sorters biologiska molekyler så länge de är kirala eller befinner sig i en kiral miljö[34]. En av skillnaderna mellan LD och CD är att i CD behöver molekylerna inte orienteras under mätningen. Metoden mäter skillnaden i absorption mellan vänster- och högercirkulärpolariserat ljus[30]:

$$\mathrm{CD} = \mathrm{A}_{\mathrm{V}} - \mathrm{A}_{\mathrm{H}}$$

Data från en typisk CD-mätning på proteiner presenteras i ett spektrum som visar absorption (deg·cm$^2$/dmole) mot våglängd (nm) (se **figur 5**). Sekundärstrukturen kan bestämmas utifrån CD- spektrumets form i intervallet 190-250 nm, vid dessa våglängder är det peptidbindningarna som absorberar ljuset. α-helix, β-flak och slumpmässiga strukturer ger var och en upphov till karakteristiska spekta[34]. Proteiner bestående av β-flak ger upphov till en positiv topp vid 195 nm följt av en negativ topp vid 215 nm, medan proteiner bestående av α-helix ger upphov till en hög positiv topp vid 190 nm följt av två negativa toppar vid 208 respektive 222 nm och slumpmässiga strukturer har en negativ topp vid 196 nm och en positiv topp vid 216 nm.




Figur 5. Karakteristiskt CD-spektrum för α-helix, β-flak och slumpmässiga strukturer [34].

### 2.5.3 Fluorescensspektroskopi

Fluorescensspektroskopi har många kemiska, biologiska och medicinska tillämpningar. Intensitetsmätningar kan ge information om en mängd olika processer såsom interaktion mellan färgämnen och molekyler i ett lösningsmedel, rotationsdiffusion av makromolekyler, avstånd mellan bindningssites på makromolekyler, konformationsförändringar och bindningsinteraktioner[35].

Provet belyses av en ljuskälla vars ljus absorberas av en fluorofor. Apparaturen innehåller en monokromator som endast släpper igenom ljus från ljuskällan av den våglängd som exciterar fluoroforen. Vid denna excitation överförs en elektron från högsta besatta molekylorbitalen (HOMO) till lägsta obesatta molekylorbitalen (LUMO). Eftersom detta är ett energetiskt instabilt tillstånd återgår elektronen till HOMO och emitterar en foton. En molekyl i exciterat tillstånd förlorar även en del av sin excitationsenergi genom en strålningslös överföring[36]. Emissionen är av lägre energi, vilket innebär att den har en längre våglängd än excitationsljuset, därför kan det emitterade ljuset separeras från det exciterande ljuset från ljuskällan. Detta sker med en dikroisk spegel följt av ett filter innan detektion[37]. Data från en fluorescensmätning presenteras generellt som ett emissionsspektrum, vilket är en graf av fluorescensintensitet mot våglängd[37]. Omvänt kan emissionsintensiteten från ett färgämne användas som ett mått på hur mycket av färgämnet som bundit till analyten.

Fluorescensspektroskopi i kombination med en fluorofor kan användas för att kvantifiera mängden analyt i ett prov. Vanligen delas fluoroforer upp i två klasser, de som fluorescerar naturligt och de som tillförs till ett prov som inte uppvisar de önskade spektrala egenskaperna i sig självt. Den vanligaste klassen av fluoroforer är fluorescenta indikatorer, vilket innebär att deras spektrala egenskaper är känsliga för substansen som analyseras[35]. I protein är de aromatiska aminosyrorna tyrosin och tryptofan de mest betydande naturliga fluorescenta grupperna. Även fenylalanin fluorescerar men dess emission är svårare att detektera. Insulin innehåller fyra tyrosin och tre fenylalanin[36]. Vi har använt den fibrillspecifika fluoroforen ThT för att undersöka fibrillerna med fluorescensspektroskopi.

### 2.5.4 Atomkraftsmikroskopi

Atomkraftsmikroskopi (AFM) ger information om en ytas struktur och kan användas för att ge en bild av morfologin hos insulinfibrillerna. AFM är därför ett viktigt verktyg i vår studie för att direkt se om fibrillerna har kompakterats efter tillsats av olika komponenter. Metoden är särskilt känslig i höjdled och ger därför framförallt information om ett objekts höjd. AFM kan även användas för att mäta fragmenteringsgraden, det sista av stegen i fibrillbildningen. Metoden skapar en koppling till

morfologiska förändringar till följd av kompaktering under påverkan av kemiska komponenter[12].

AFM använder sig av en kantilever, vilket är en liten arm med en spets. Krafter från ytan av provet påverkar änden av spetsen när den kommer nära ytan. Dessa krafter som bland annat innefattar Van der Waals och elektrostatiska krafter kan detekteras med laser[38 39].

Information om hur ytan ser ut kan fås på olika sätt, den teknik som vi använt oss av kallas för semikontaktmetoden och går ut på att spetsen får oscillera vid en känd frekvens och amplitud med hjälp av en piezoelektrisk skanner. Spetsen sänks mycket nära ytan, då verkar krafter om cirka 0,1 nN på den, vilket minskar oscilleringsfrekvensen och amplituden. Med denna metod undviks skada av både provet och spetsen och upplösningen i bilden är fortfarande nästan lika hög som när spetsen dras över ytan[38].

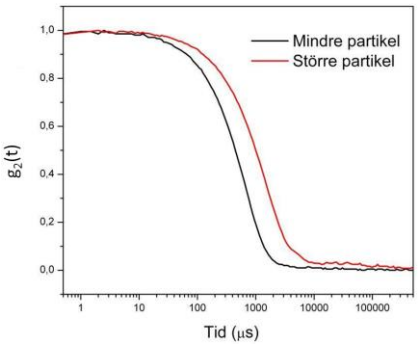
### 2.5.5 Centrifugering

Centrifugering används inom både medicin, biokemi, cell- och molekylärbiologi för att separera prover och för att undersöka partiklars fysikaliska egenskaper. Då ett prov centrifugeras utsätter man partiklarna i provet för en centrifugalkraft som är proportionell mot deras tyngd. Effekten från jordens gravitation förstärks eftersom centrifugalkraften får partiklarna att röra sig radialt bort från rotationsaxeln[40]. I detta projekt undersöks om metoden kan användas för kvantitativt bestämma mängden kompakterade aggregat under antagandet att deras förmåga att sedimentera då borde ha förändrats.

### 2.5.6 Dynamisk ljusspridning

Dynamisk ljusspridning (DLS), används för att mäta storlek och storleksdistribution hos molekyler och partiklar i lösning. De vanligaste användningsområdena för DLS är att karaktärisera emulsioner, partiklar eller makromolekyler. Metoden utnyttjar att partiklarnas brownska rörelsehastighet innehåller information om deras storlek[41].

I en DLS-mätning riktas en laserstråle av en våglängd som inte absorberas mot provet. När laserstrålen träffar partiklarna i provet sprids ljuset. Partiklarnas brownska rörelse får laserstrålen att splittras i olika intensiteter, förändringarna i ljusspridningen mäts av en fotondetektor vid en känd vinkel**.** Utifrån dessa intensitetsförändringar kan en korrelationsfunktion, $g_2(t)$, tas fram som beskriver skillnader i intensitet av det spridda ljuset med tiden. Korrelationsfunktionen kan användas för att beräkna en diffusionskonstant för provet som tillsammans med Stokes-Einsteins ekvation kan användas för att bestämma partiklarnas storlek. Ekvationen utgår ifrån att partiklarna är sfäriska och monodispersa. Varken linjära eller kompakterade fibriller är helt sfäriska, därför används DLS inte för att bestämma den exakta storleken på fibrillerna i det här projektet, istället används korrelationsfunktionens form för att undersöka relativa förändringar i fibrillernas storlek. Stora partiklar diffunderar långsammare än små partiklar vilket leder till att korrelationsfunktionen minskar långsammare för stora partiklar än för små partiklar; detta resulterar i att kurvan förskjuts åt höger vilket illustreras i **figur 6**[42]. För att ytterligare kunna jämföra resultat från olika mätningar har vi dessutom valt att rapportera korrelationsfunktionens halveringstid avsatt mot koncentrationen av de tillsatta komponenterna för att tydligare visualisera förskjutningar mot längre korrelationstid och större aggregatstorlek. Förutom korrelationsfunktionen gör DLS instruments mjukvara också en uppskattning av på provets polydispersitet i form av polydispersitetsindex (PDI). Ett PDI över 0,7 tyder på väldigt hög partikelstorleksdistribution medan ett PDI under 0,1 tyder på extremt monodispersa partiklar[41].




**Figur 6. De mindre partiklarna är 10 µM fibriller och de större partiklarna är 10 µM fibriller i närvaro av 8,0 mM järnnitrat. Det går att se att fibrillerna i närvaro av järnnitrat är större eftersom det sker en förskjutning mot längre korrelationstid.**

# 3 Utförande: Analysmetodernas tillämpning

Under projektets gång utvecklar vi metodik för att kunna studera hur fibrillerna kompakteras. Vi visar att LD kan användas för att studera förändringar i fibrillernas linjäritet (orientering) medan CD ger information om sekundärstrukturförändringar. Fluorescensspektrometri används för att se hur ThT-fluorescensen förändras vilket kan indikera dels hur andra molekyler kompetitivt interagerar med fibrillerna och dels kan indikera kompaktering eftersom en kompakterad fibrill kan antas ha färre bindningssäten för ThT. AFM tillämpas för att avbilda fibrillerna och därmed få ett direkt mått på deras morfologi. DLS används för att undersöka hur storleksfördelningen ändras under kompaktering. De olika komponenterna prepareras och undersöks under samma förhållanden och med samma analysmetoder för att erhålla jämförbara resultat.

## 3.1 Material

Bufferten som används i de experimentella försöken består av glycin och saltsyra (Gly-HCl). Den framställs genom att man först blandar en lösning av 0,1 M glycin med en lösning av 0,1 M HCl. 50 ml av glycin-lösningen och 44 ml av HCl-lösningen i en 100 ml mätkolv som fylls upp till 100 ml med milli-Q-vatten och pH-värdet justeras till exakt 2,2 med en stark syra.

Följande salter används i de exprimentella försöken: kopparsulfat, kopparklorid, natriumsulfat, natriumklorid och järnnitrat. Andra ämnen som användes var bovint insulin, heparin (Serva) och BSA. AFM utfördes på micadiskar (Ted Pella) och med spetsar av modellen: NSG01, Golden Silicon Probes (NT-MDT). Om inget annat anges kommer kemikalierna från Sigma Aldrich.

## 3.2 Preparation av insulinfibriller

Insulinfibriller prepareras genom att 2,0 mg insulin vägs upp i ett eppendorfrör och löses i 1,0 ml Gly-HCl buffert. Eppendorfröret placeras i ett värmeblock med temperaturen 60$^{o}$C under 24 timmar, varav skakning (800 rpm) pågår i en timme. Vi har även preparerat insulinfibriller på ovan nämnda sätt med skillnaden att de olika komponenterna tillsattes i lösningen av monomert insulin innan provröret placeras i värmeblocket. Efter det att monomererna aggregerat till insulinfibriller bestäms koncentrationen med en NanoDrop3300 absorptionsspektrometer.

## 3.3 Linjär dikroism

LD-mätningarna utförs i en Chirascan LD-spektrometer från Applied Photophysics. Provet orienteras i en fabriksframställd variant av Couettes flödescell med volymen 250 µl och väglängden 0,5 mm.

Absorbansen mäts inom olika våglängdsintervall beroende på vilket prov som finns i cellen. Det bredaste intervallet som mäts är mellan 190-550 nm vilket krävs när ThT finns i provet, eftersom ThT har sitt absorptionsmaximum vid 440 nm. Vid samtliga mätningar används en koncentration av 10 µM fibriller.

## 3.4 Circulär dikroism

CD-mätningarna utförs liksom LD-mätningarna i en Chirascan CD-spektrometer framtagen av Applied Photophysics. I mätningarna används en kvartskyvett med väglängden 1 mm och volymen 200 µl. Absorbansen mäts i intervallet 190-300 nm. Vid samtliga mätningar används en koncentration bestående av 30 µM fibriller.

## 3.5 Fluorescensspektroskopi

Fluorescensmätningarna utförs med en Varian Cary Eclipse fluorescensspektrometer i en 1 cm kvartskyvett. Provet exciteras med en våglängd av 440 nm. Fluorescensintensiteten mäts mellan 450 och 600 nm. Vid samtliga mätningar är fibrillkoncentrationen 10 µM och ThT-koncentrationen 1 µM med undantag av den mätning då ThT undersöks.

## 3.6 Atomkraftsmikroskopi

Fibrillerna avbildas i ett atomkraftsmikroskop av modellen NTEGRA Prima (NT-MDT). När nya prover ska prepareras avlägsnas först det övre lagret på micaplattans yta. 10 µl prov tillsätts sedan den nya ytan och får stå i tio minuter, detta tillåter insulinfibrillerna att binda till ytan. Plattan sköljs sedan under tio sekunder med milli-Q-vatten för att tvätta bort saltkristaller. Provet torkas därefter med kvävgas. Försöken utförs med en koncentration av 5,0 µM fibriller om inget annat anges.

## 3.7 Centrifugering

I centrifugeringsförsöken används en bordcentrifug av modell MiniSpin från Eppendorf. Koncentrationen av fibriller i supernatanten innan och efter centrifugeringen bestäms genom att mäta absorbansen vid 276 nm i en NanoDrop3300 absorptionsspektrometer från Thermo scientific. Vid samtliga mätningar används en fibrillkoncentration av 50 µM.

## 3.8 Dynamisk ljusspridning

I DLS-mätningarna används en Zetasizer Nano range från Malvern med engångskyvetter av typen UV-Cuvette micro. Vinkeln där Zetasizer Nano range detekterar ljussplittringen är 172◦. Innan DLS-mätningar görs filtreras eventuella makroskopiskapartiklar bort från bufferten genom ett membranfilter (Whatman, ME25). Vid samtliga mätningar används en koncentration av 10 µM fibriller.

# 4 Resultat från litteraturstudien

Innan den experimentella delen av projektet påbörjas gör vi en kartläggning av vilka komponenter, förutom det kompakterade proteinet amyloid-β som återfinns i senila plack hos patienter med AD. Detta görs för att avgöra vilka komponenter som kan vara relevanta att undersöka med avseende på deras förmåga att kompaktera amyloida fibriller *in vitro*. I arbetet använder vi oss av söktjänsterna Google Scholar, PubMed, Biological Science, Protparam och SciFinder för att hitta relevanta publikationer. I litteraturstudien inkluderas även information om komponenternas funktioner i hjärnan, deras storlek, laddning och hydrofobicitet. Nedan i **tabell 1** redogör vi för den relevanta information som vi hittat om de olika komponenterna.

**Tabell 1. Biologiska komponenter i plack med information om storlek, laddning och hydrofobicitet. Ett positivt GRAVY indikerar att proteinet är hydrofobt, ett negativt innebär att proteinet är hydrofilt. Då pH-värdet överstiger proteinets pI-värde innebär det att proteinet är negativt laddat och då pH-värdet är under proteinets pI-värde är det positivt laddat. Alla proteiner är angivna med sina engelska namn.**

| **Metaller** | **Jonradie (pm)[43]** | **Laddning** | |
|---|---|---|---|
| Mn(II) | 70 | 2+ | |
| Cu(II) | 73 | 2+ | |
| Zn(II) | 74 | 2+ | |
| Al(III) | 53 | 3+ | |
| Fe(III) | 60 | 3+ | |
| **Glukosaminoglykaner** | **Molekylvikt (kDa)*** | **Laddning/molekyl** | **Hydrofobicitet** |
| Heparin | 16-19 [44] | -83** | Hydrofil[37] |
| Hyaluronsyra | 200-10000 [45] | - | Hydrofil[46] |
| kondroitinsulfat | 10-100[47] | - | Hydrofil[48] |
| **Proteiner** | **Molekylvikt[7] (kDa)** | **Teoretisk laddning[7] (pI)** | **Hydrofobicitet[7] (GRAVY)** |
| Collagen I, α-1 | 94,8 | 9,29 | -0,881 |
| Fibrinogen, gamma | 48,5 | 5,24 | -0,682 |
| Calcium ATPase 2 | 114 | 5,23 | 0,097 |
| Heat shock protein HSP 90-β | 83,1 | 4,96 | -0,682 |
| Coronin-1A | 50,9 | 6,25 | -0,324 |
| tau | 78,8 | 6,26 | -0,885 |
| Glial fibrillary acid protein | 49,9 | 5,42 | -0,773 |
| Vimentin | 53,5 | 5,05 | -0,829 |
| 14-3-3 β/α | 28,1 | 4,76 | -0,729 |
| 14-3-3 ε | 29,2 | 4,63 | -0,540 |
| 14-3-3 ζ/δ | 27,7 | 4,73 | -0,621 |
| Clathrin heavy chain 2 | 187 | 5,57 | -0,154 |
| Dynamin 1 | 81,9 | 6,37 | -0,259 |
| Cytoplasmic dynein 1 chain 1 | 532 | 6,01 | -0,341 |
| 6-phosphofructokinase type C | 85,6 | 7,50 | -0,146 |
| Amyloid-β A4 protein | 85,2 | 4,72 | -0,631 |
| α-1-Antitrypsin | 44,3 | 5,31 | -0,302 |
| V-type proton ATPase subunit a isoform 1 | 96,4 | 6,01 | 0,009 |
| V-type proton ATPase subunit B, Brain isoform | 56,5 | 5,57 | -0,160 |
| V-type proton ATPase subunit D | 28,3 | 9,36 | -0,444 |
| V-type proton ATPase subunit E 1 | 26,0 | 7,93 | -0,543 |
| Cathepsin D | 37,9 | 5,60 | -0,049 |
| Cystatin B | 11,1 | 6,96 | -0,546 |
| Cystatin C | 13,3 | 8,75 | -0,510 |
| Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 | 118 | 5,49 | -0,269 |
| Vacuolar ATPase subunit H | 55,9 | 6,07 | -0,368 |
| **Lipider** | **Molekylvikt (kDa)** | **Laddning** | **Hydrofobicitet** |
| Kolesterol | 0,39 [49] | | Amfifil[50] |
| Apolipoprotein E | 34,2 | 5,52 (pI) | -0,727 |

*Det är svårt att räkna ut en molekylvikt på GAGs eftersom det är polymerer vars storlek och uppbyggnad varierar.

**Uträknat baserat på molekylvikten 16 kDa, från ungefärlig struktur och vid pH 2,2.

## 4.1 Metaller

Lovell gjorde 1997 en studie på AD-patienter som visade att kopparjoner, järnjoner och zinkjoner finns i högre halt i senila plack än i frisk vävnad[51]. Detta styrks av Raileys studie från 2011 där både koppar och järn hittats i amyloida plack i hjärnan hos AD-patienter[23]. Metalljoner bidrar till många viktiga funktioner i hjärnan, däribland nervtransmission, muskelsammandragningar och syretransport. Metallenzymer som innehåller järn eller koppar utgör en central roll i metabola vägar inom nervceller, till exempel är de involverade i syntesen av signalsubstanser och i skyddandet av neuroner. Ett underskott av järn och koppar är skadligt men om metallerna ackumuleras i överskott kan de också bidra till neurodegenerativa sjukdomar [52]. *In vitro* studier tyder på att järn och koppar interagerar med proteiner som kan kopplas till AD, eftersom att det finns bindningssäten för metalljoner på Aβ[53].

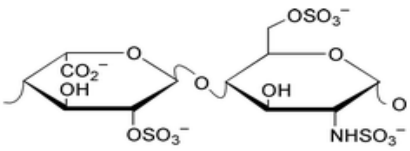
Koppar är ett essentiellt grundämne och behövs för att cellen ska kunna utföra sina biologiska funktioner[52]. Dess absorption, fördelning och utsöndring är noga reglerad på grund av att koppar är starkt toxiskt under oxidativ stress. Förändringar i kroppens kopparhomeostas har upptäckts i samband med AD, särskilt hos äldre människor. Det har också rapporterats att kolesteroloxidation aktiveras av Aβ-Cu komplex vilket leder till neurodegenerativa effekter[54]. Koppar har kopplats direkt till plackbildningen, både i modellorganismer och *in vitro*[54]. APP har en balanserande verkan på kopparkoncentrationen i celler eftersom det fungerar som ett metallprotein som har bindningssäten för kopparjoner. Koppar har visats reducera nivån av Aβ genom att binda till bindningsäten på APP[56]. Det verkar finnas ett omvänt förhållande mellan höga kopparnivåer och produktion samt ackumulation av Aβ där studier visar att personer drabbade av AD har en brist på koppar. En slutsats är att höga nivåer av koppar i plack respektive låga cellulära nivåer av koppar skulle kunna bidra till utvecklande av AD[57]. Koppar är ett essentiellt grundämne och behövs för att cellen ska kunna utföra sina biologiska funktioner[52]. Dess absorption, fördelning och utsöndring är noga reglerad på grund av att koppar är starkt toxiskt under oxidativ stress. Förändringar i kroppens kopparhomeostas har upptäckts i samband med AD, särskilt hos äldre människor. Det har också rapporterats att kolesteroloxidation aktiveras av Aβ-Cu komplex vilket leder till neurodegenerativa effekter[54]. Koppar har kopplats direkt till plackbildningen, både i modellorganismer och *in vitro*[54]. APP har en balanserande verkan på kopparkoncentrationen i celler eftersom det fungerar som ett metallprotein som har bindningssäten för kopparjoner. Koppar har visats reducera nivån av Aβ genom att binda till bindningsäten på APP[56]. Det verkar finnas ett omvänt förhållande mellan höga kopparnivåer, produktion samt ackumulation av Aβ där studier visar att personer drabbade av AD har en brist på koppar. En slutsats är att höga nivåer av koppar i plack respektive låga cellulära nivåer av koppar skulle kunna bidra till utvecklande av AD[57].

Järn är en essentiell komponent för många funktioner i centrala nervsystemet, bland annat vid DNA-syntes, neurotransmission och i den mitokondriella elektrontransporten. Järnhomeostas är viktigt eftersom ett överskott eller underskott av järn kan försämra de normala cellfunktionerna och leda till celldöd. Järn är också en nyckelkomponent för många proteiner som är viktiga i hjärnan. Nivån av järn i hjärnan kontrolleras av blodhjärnbarriären och särskilda järnbärande proteiner. Ökad nivå av järn förekommer hos AD patienter i gliaceller och plack. Studier har visat att det finns fem gånger så mycket järn i plack jämfört med i dess omgivning[58]. Järnets roll i sjukdomsförloppet för AD är fortfarande oklar, men man vet att Aβ och järn är involverade i bildandet av fria radikaler och därmed bidrar till ökad oxidativ stress[53].

## 4.2 Glukosaminoglykaner

Det har hittats flera olika GAGs i senila plack, bland annat kondroitinsulfat, heparansulfat, keratansulfat och heparin[24, 25]. Heparansulfat verkar dessutom kunna öka aggregeringen av Aβ-fibriller i fibrilleringsrekationer *in vitro*[24].

GAGs är polysackarider med viktiga funktioner för kroppens extracellulära matris och basala lamina. De består vanligtvis av repeterande disackarider; en av monosackariderna i disackariden är alltid en aminosackarid som innehåller en aminogrupp och den andra är alltid en uronsyra. Disackariderna är oftast sulferade eller karboxylerade vilket gör att GAGs är de mest negativt laddade molekyler som kroppen producerar[37]. GAGs är uppbyggda av långa kedjor av disackarider utan förgreningspunkter och tar ofta väldigt stor plats eftersom de inte kan kompakteras så tätt, detta på grund av deras styvhet och starkt hydrofila egenskaper. Det finns fyra huvudgrupper av GAGs; hyaluronsyra, kondroitinsulfat, dermatansulfat, keratansulfat samt heparansulfat varav kondroitinsulfat och dermatansulfat är i samma grupp. Heparansulfat består huvudsakligen av iduronsyra och aminosackariden *N*-acetylglukosaminsulfat eller *N*-sulfoglukosamin (se **figur 7**). En hypersulferad form av heparansulfat kallas heparin och är en av de vanligast förekommande sulferade GAG (sGAG) i till exempel råttans hjärna[25].




**Figur 7. Den huvudsakliga repeterande disackariden hos heparin består av iduronsyra och N-sulfoglukosamin (modifierad från Rabenstein, 2002). Strukturen är här avsevärt förenklad då strukturen för heparin är den mest komplexa bland alla GAGs.**

Bindningen av heparin till proteiner är oftast elektrostatisk eftersom det negativt laddade heparinet kan binda ospecifikt till positivt laddade domäner på proteiner, detta används bland annat för att rena proteiner i heparin-affinitetkromatografi. Det har dock visat sig att det finns domäner på heparin som binder specifikt till ett stort antal proteiner[59]. Heparin har inte någon känd bindningsdomän på bovint insulin[60].

## 4.3 Proteiner

Liao visade i en studie från 2004 att ett tjugotal proteiner förekommer i större mängd i senila plack än i en frisk hjärna[26]. Aβ är det främsta proteinet i senila plack och det enda protein som förekommer i en så extremt ökad kvantitet som 80 gånger högre än i frisk vävnad. Protein-proteininteraktioner är vanligt i biologisk vävnad, det är därför naturligt att placken innehåller många proteiner. Proteiner är dessutom den främsta makromolekylära beståndsdelen i cellen och de utför majoriteten av dess funktioner. Ur ett kemiskt perspektiv är proteiner i särklass de mest strukturellt komplexa och funktionellt raffinerade molekylerna[37]. En mängd olika proteiner återfinns i plack, vilket tyder på att flera cellulära mekanismer är inblandade i utvecklingen av sjukdomen. Förutom Aβ förekommer bland annat chaperoner, proteiner som vanligtvis återfinns i cellskelettet, inflammatoriska proteiner, kinaser, membranproteiner samt proteolytiska proteiner i ökad mängd i senila plack[26]. Intressant är att de flesta proteiner som enligt vår undersökning (se **tabell 1**) förekommer i plack har ett negativt GRAVY-index och därmed är övervägande hydrofila även om Aβ-peptiden är hydrofil. Detta ger en indikation om att elektrostatiska interaktioner troligen är viktiga i plack.

## 4.4 Vidare utredning av de utvalda komponenterna

Baserat på litteraturstudien väljer vi att undersöka fem salter, en sGAG och ett protein. Jonerna i salterna kan förväntas interagera elektrostatiskt med amyloida fibriller eftersom dessa har en nettoladdning. Dessutom har det rapporterats att det finns specifika bindningsäten för metalljoner på Aβ och det är därför intressant att utforska motsvarande möjliga bindningssäten på insulin. Vi väljer att undersöka natriumsulfat, kopparsulfat, kopparklorid, natriumklorid och järnnitrat vilket ger en kombination av flera olika valenser hos metalljonerna och deras motjoner vilket gör det möjligt att belysa både elektrostatiska och möjligen mer bindningsspecifika effekter. Den form av järn som interagerar mest med Aβ är $Fe^{2+}$ [61], men eftersom vi redan valt ett salt med tvåvärda katjoner ($Cu^{2+}$) väljer vi att använda $Fe^{3+}$ för att inkludera ett salt med trevärda metalljoner i vår studie. Vi inkluderar även ett natriumkloridsalt eftersom det är intressant att undersöka envärda metalljoners påverkan på kompakteringen. Eftersom metalljoner tillsätts i form av salt finns det motjoner närvarande och vi behöver därför ta hänsyn till Schultze-Hardys regel (SHs-regel), $CCC \propto \frac{1}{z^6}$ som beskriver hur den kritiska koagulationskoncentrationen (CCC) är starkt beroende av motjonens laddning (z)[62]. SHs-regel baseras på DLVO-teorin för kolloida system, vilket innebär att en högre laddning hos motjonerna leder till en större kompaktering. Enligt teorin fås växelverkan mellan partiklar genom en kombination av Van der Waalskrafter (attraherande) och elektrostatiska dubbelskiktskrafter (repellerande). Om summan av krafterna är positiv resulterar det i ett elektrostatiskt stabilt system, vilket inte nödvändigtvis innebär att det är termodynamiskt stabilt.

Vidare väljer vi att analysera heparin eftersom den är en av de sGAGs som finns i högst koncentration i till exempelvis råttans hjärna[25]. Heparin är dessutom en av den mest negativt laddade molekylerna i kroppen[25, 37] och det är därför intressant att undersöka dess elektrostatiska interaktioner i jämförelse med de joner vi valt ovan. Det har rapporterats att heparin markant ökar utbytet av Aβ fibriller vid försök *in vitro*[24]**.** Heparin har också visats ha en påverkan på hastigheten för fibrillbildning och utbytet av α-synukleinfibriller *in vitro*[63].

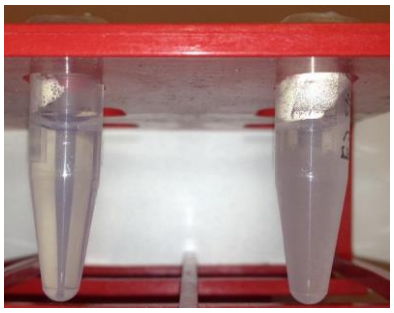
Vi väljer att inkludera modellproteinet bovint serumalbumin (BSA) för att studera proteiners påverkan på kompakteringen av amyloida fibriller. Proteinets fysikalkemiska egenskaper får här representera proteiner generellt och gör det möjligt att på ett enkelt sätt undersöka hur en proteinmolekyl skiljer sig från metallsalter och sGAGs i sina interaktioner med amyloida fibriller. BSA är vanligt i biokemiska applikationer är väl studerat och lätt att rena[49]. BSAs molmassa är 66,2kDa[64] och den består av 607 aa, vilket är i samma storleksordning som många av de proteiner som återfinns i senila plack. BSAs GRAVY-värde är -0,429 vilket innebär att den är hydrofil och även i detta avseende en god representant för många av proteinerna som hittats i plack[7] (se **tabell 1**). Vår bufferts sura pH innebär att BSA är positivt laddad och har denaturerats.

# 5 Experimentella resultat

Insulinfibrillerna har först undersökts separat för att kartlägga deras normala egenskaper. Dessa mätningar fungerar sedan som referens för jämförelser med prover där de biologiskt relevanta komponenterna har tillsatts. Vi har observerat att monomert insulin aggregerar mest effektivt till fibriller om provet initialt skakas, eftersom gelbildningen då reduceras. Våra försök visar att fibrillerna interagerar mer då salter finns närvarande under fibrillbildningen.

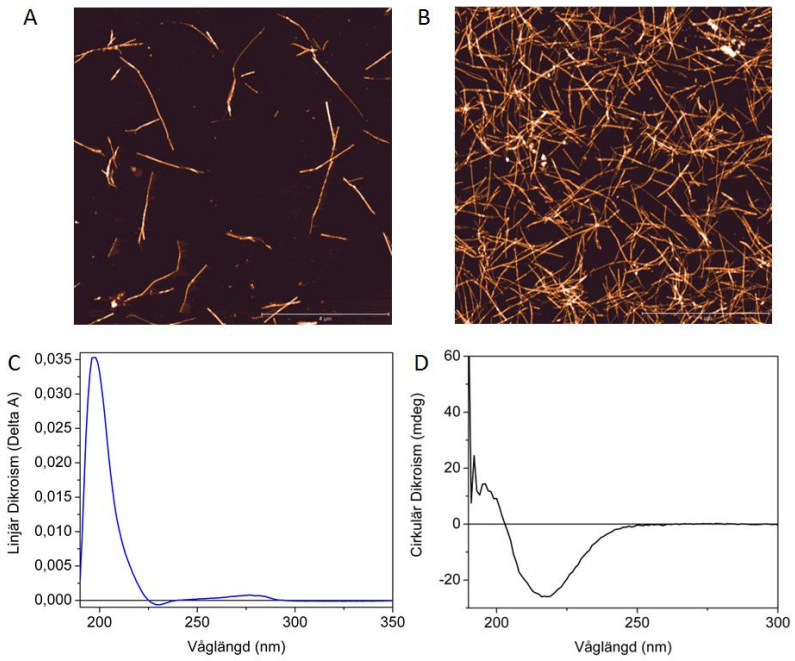
## 5.1 Preparation av insulinfibriller

Det är viktigt att utveckla ett reproducerbart protokoll för preparation av insulinfibriller för att erhålla resultat som är jämförbara. Under planeringsfasen av projektet diskuterar vi huruvida vi ska skaka proteinerna under inkuberingstiden eller inte. Skakningen antas påskynda bildningen av fibrillerna men leder också till att de blir kortare, vilket kan resultera i att fibrillerna inte orienteras lika väl i den flödescell som används för att mäta linjär dikroism. Vi beslutar oss först för att skaka proven i en timme för att initiera aggregation och stänger sedan av skakningen för att öka sannolikheten för att erhålla långa fibriller. Därefter undersöker vi alternativet att preparera insulinfibrillerna helt utan skakning under aggregationsfasen, det bildas då en väsentlig mängd olösliga gelklumpar i proven. Då det visar sig vara svårt att separera gelklumparna från fibrillerna i provet och eftersom gelklumparna ger upphov till ljusspridning i spektroskopiska experiment väljer vi i fortsättningen att skaka proven under inledningen av aggregationen. **Figur 8** visar två prov där den ena har skakats och den andra inte har skakats. Det är tydligt att provet som skakats är klarare än provet som inte skakats, då det inte innehåller gel. När man skakar provet bildas det inte gelklumpar vilket skulle kunna bero på att skakningen leder till fragmentering och att fibrillerna därmed får en effektivare och mer reproducerbar fibrillbildning. Det skulle också kunna vara så att skakningen innebär att fibrillerna inte sedimenterar under början av fibrillbildningen.



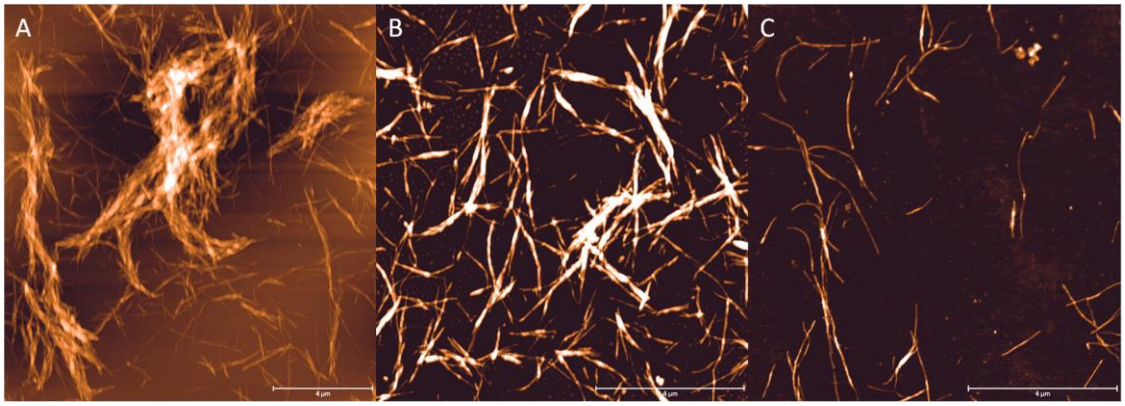
**Figur 8. Till vänster: Prov med insulinfibriller som preparerats genom att provet har skakats i en timme och upphettats i värmeblock ca 24 timmar. Till höger: insulinfibriller som inte har skakats men upphettats i värmeblock ca 24 timmar.**

Insulinfibrillerna karaktäriseras med hjälp av AFM, LD och CD. **Figur 9A**, **B** visar typiska AFM-bilder på insulinfibriller adsorberade på micaytan. Proverna med en låg respektive hög insulinkoncentration har preparerats för att tydligt visa deras morfologi. Insulinfibrillerna vi studerar har en typisk höjd på 10 nm och är 3 µm långa. Det är tydligt att fibrillerna inte interagerar starkt med varandra och att de inte klumpar ihop sig till större aggregat. Samtliga AFM-bilder i denna rapport finns förstorade i **bilaga 2**. I **figur 9C** visas ett typiskt LD-spektrum för insulinfibriller. Spektrumet stämmer bra överens med tidigare publicerade LD-spektra på insulin och man kan observera tre toppar[31]. Vid 276 nm och 230 nm absorberar den aromatiska sidokedjan tyrosin ljus. Den positiva toppen vid 276 nm innebär att sidokedjan absorberar ljuset när dess kortaxel är parallell med orienteringsaxeln medan den negativa toppen vid 230 nm innebär att sidokedjans långaxel absorberar ljuset vinkelrätt mot orienteringsaxeln. Toppen vid 200 nm visar peptidbindningarna som absorberar ljus parallellt med orienteringsaxeln. Denna signal är starkast på grund av det höga antalet peptidbindningar i ett protein och vi använder därför den signalen som ett mått på hur stor andel av fibrillerna som är orienterade. I **Figur 9D** visas ett typiskt CD-spektrum för insulinfibriller och dess sekundärstruktur. Vi observerar att insulinfibrillerna har ett högt β-flakinnehåll. (se **figur 5**).




**Figur 9. A) AFM-bild med 1,0 µM insulinfibriller. B) AFM-bild av 10 µM insulinfibriller. Vid majoriteten av AFM-bildtagningarna används 5,0 µM insulinfibriller medan 10 µM fibriller används vid ett fåtal försök. C) LD-spektrum av insulinfibriller. D) CD-spektrum av insulinfibriller.**

I nästa steg prepareras insulinfibrillerna med några av salterna tillsatta direkt till det monomera insulinet för att modellera det förlopp som troligtvis sker vid plackbildning i hjärnan där komponenterna är närvarande från början. Det är svårt att kvantitativt jämföra den information som erhålls när fibrillerna tillverkas i närvaro av komponenterna, därför har bara ett fåtal försök gjorts för att demonstrera att kompaktering sker. AFM-bilderna visar kompakteringsgraden hos fibrillerna och även hur fibrillerna tenderar att binda till varandra. Det går att se om fibrillerna associerar lateralt (på längden) eller om de bildar klumpar. Det är tydligt att fibrillerna i **figur 10A** har bildat stora aggregat i närvaro av kopparsulfat i jämförelse med referensbilderna för insulinfibriller (se **figur 9**). I **Figur 10B** ser man att natriumsulfat också påverkar attraktionen mellan fibrillerna, men att det inte bildas lika stora aggregat som när man tillsätter kopparsulfat**.** Vid tillsats av kopparklorid (se **figur 10C**) går det att observera en viss interaktion mellan fibrillerna i jämförelse med **figur 9A** som har motsvarande koncentration. Koncentrationen är en viktig faktor för hur stora aggregat fibrillerna bildar. Det är svårt att analysera dessa prover med andra analysmetoder än AFM eftersom det blir viss skillnad på fibrillerna mellan preparationstillfällena (se **bilaga 2, figur 2**) och om komponenterna tillsats från början så finns det därmed inget rättvisande referensprov med endast fibriller att jämföra med. Det är inte heller alltid möjligt att göra en noggrann koncentrationsbestämning eftersom att salterna absorberar ljus.




**Figur 10. Salter som tillsats till monomert insulin innan fibrillbildning initierats. A) 2,0 g/l insulin och 0,6 mM kopparsulfat, spädd 10ggr. B) 2,0 g/l insulin och 0,6 mM natriumsulfat, spädd 20ggr. C) 2,0 g/l insulin och 0,6 mM kopparklorid, spädd 100ggr.**

## 5.2 Inverkan på insulinfibrillernas kompakteringsgrad

Vi har observerat att tillsats av biologiskt relevanta komponenter till fibriller påverkar deras kompaktering på olika sätt och i olika grad. Senila plack innehåller metaller, sGAGs och proteiner, men det är inte utforskat vilken roll dessa utgör i kompakteringen av amyloida fibriller. I den här studien använder vi oss bland annat av fluorescensspektroskopi för att karaktärisera hur de utvalda komponenterna interagerar med insulinfibriller. Förändringar i ThT-flourescens används som ett mått på hur utvalda biologiska komponenter interagerar med fibrillerna. Detta tillsammans med att ThT är ett av de vanligast förekommande färgämnena vid undersökning av amyloida fibriller gör att vi anser att det är viktigt att undersöka hur ThT påverkar kompakteringsgraden.

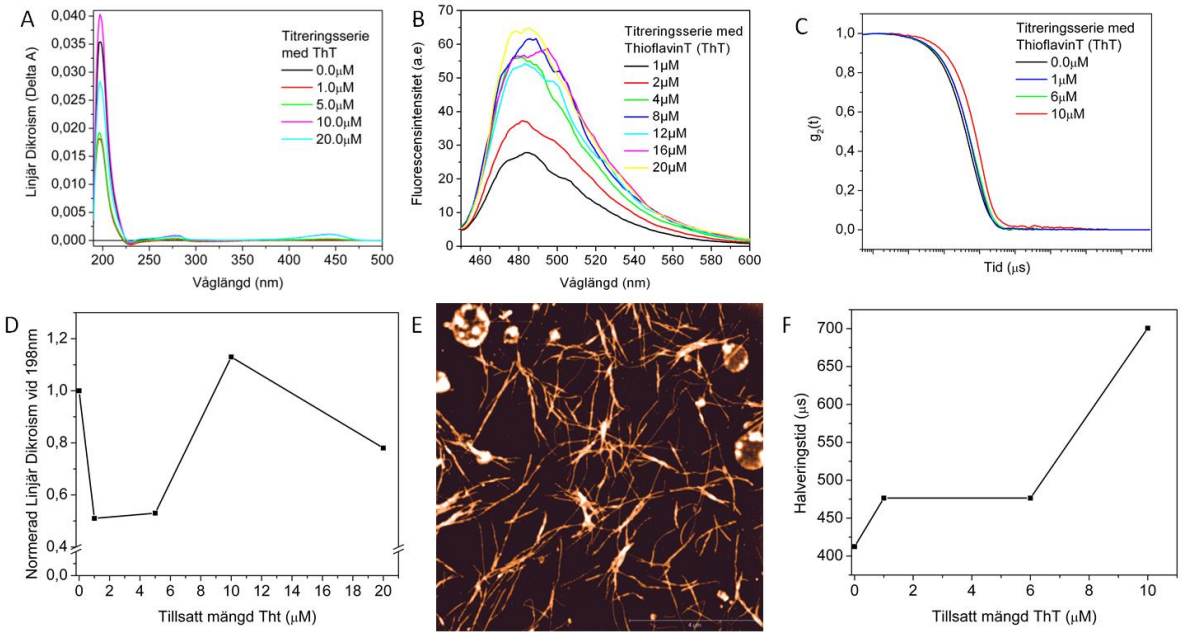
### 5.2.1 Thioflavin-T

En viktig del av det här projektet är att utreda en tidigare observation om att det amyloidbindande färgämnet ThT kompakterar fibriller[4]. Vi använder oss av de tidigare beskrivna analysmetoderna (se avsnitt 2.5) för att undersöka hur fibrillerna beter sig i närvaro av ThT.

I **figur 11A** ser man att ThT bundit till fibrillerna eftersom det ger upphov till en positiv topp vid 440 nm där bundet ThT absorberar. LD-signalen påverkas kraftigt vid tillsats av ökande mängd ThT, men det går inte att urskilja något tydligt mönster (se **figur 11D**). **Figur 11B** visar fluorescensspektrum vid olika ThT-koncentrationer och man ser att lösningen som innehåller 20 µM fibriller når mättnad vid tillsats av 12 µM ThT. Utifrån dessa resultat gjordes ett försök med 10 µM insulinfibriller vid en låg ThT-koncentration (1,0 µM) och en då lösningen var mättad (6,0 µM) för att undersöka vid vilken koncentration emissionskurvorna var mest separerade (se **bilaga 2, figur 3**). Våra resultat visar att 1,0 µM gav tydligast separation och denna koncentration används därför i resterande mätningar. I DLS syns ingen förändring av fibrillernas storlek förrän 10 µM ThT har tillsats då en svag förskjutning mot längre korrelationstid kan observeras (**figur 11C, F**). PDI-värdena från DLS-mätningen är något lägre för provet med 10 µM ThT än för övriga koncentrationer (se **Bilaga 2, tabell 1**). Samtliga koncentrationer inklusive 0 µM har dock låga PDI-värden vilket gör det svårt att dra slutsatser kring fibrillernas kompaktering utifrån dessa. Sammantaget ger mätningarna ingen entydig bild av att närvaron av ThT leder till någon större kompaktering av fibriller.

AFM-bilden i **figur 11E** visar hur fibrillernas morfologi påverkas när ThT tillsätts. Bilderna indikerar på en svag kompaktering av fibrillerna genom att associera lateralt, vilket skulle kunna leda till en ökad persistenslängd vid tillsats av ThT. Detta syns dock inte i LD.

Vi testade inledningsvis även om centrifugering skulle kunna användas för att separera kompakterade och icke-kompakterade fibriller och därmed ge ett kvantitativt mått på kompakteringsgraden. I referensprovet, där ingen komponent tillsätts till fibrillerna, finns 70 % av fibrillerna i supernatanten efter centrifugering. När ThT tillsätts till fibrillerna finns 100 % av fibrillerna i supernatanten efter centrifugering. Eftersom detta anses vara orimligt drogs slutsatsen att centrifugering inte är tillräckligt för att separera kompakterade och icke-kompakterade fibriller och resultaten för de andra komponenterna inkluderas inte i *Experimentella resultat*, men redovisas i **bilaga 2, figur 4.**




**Figur 11. A) Titrering med ThT i LD. B) Titrering med ThT i fluorescensspektrometer. C) Titrering med ThT i DLS. D) Normerade maxvärden av LD-mätning vid 198 nm. E) AFM-bild med 3,0 µM ThT. F) Halveringstid från DLS mätning mot tillsatt mängd ThT.**

### 5.2.2 Salter

Eftersom metalljoner är vanligt förekommande i plack är det intressant att studera hur dessa påverkar fibrillerna. Vi tillsätter dessa i form av metallsalter, därför skulle både metalljonerna och deras respektive motjoner kunna interagera med fibrillerna. Insulinfibriller har vid pH 2,2 en positiv nettoladdning, men det utesluter inte specifika interaktioner mellan metalljonerna och proteinet. Vi har valt att analysera fem olika salter, vilket ger oss ett antal kombinationer av metalljoner och motjoner som bör göra det möjligt att avgöra vilka komponent som interagerar med insulinfibriller.

**Figur 12A** visar hur LD-signalen ändras när man tillsätter ett antal olika salter till insulinfibrillerna. Kopparsulfat ger först en ökning av signalen vid låg koncentration (0,6 mM) för att sedan ge en minskande signal med högre koncentrationer (se **figur 13A**). Ökningen skulle kunna bero på att en liten koncentration av kopparsulfat gör att fibrillerna uppträder mer utsträckta i flödet, vilket borde ge högre signal. Det skulle också kunna bero på att några fibriller först associerar lateralt, vilket borde göra att fibrillerna blir styvare och därmed får längre persistenslängd och bättre orienteringsförmåga. AFM-bilden (se **figur 14A**) bekräftar att lateral association verkar förekomma. När koncentrationen av kopparsulfat ökar ytterligare fortsätter LD-signalen att minska, vilket tyder på att fibrillerna är sämre orienterade i flödet, detta skulle kunna bero på kompaktering. Bortsett från den initiala ökningen av LD-signalen så förändras LD-signalen på ett snarlikt sätt vid tillsats av natriumsulfat

(se **figur 13A**). AFM-bilden bekräftar att fibrillerna kompakteras även i detta fall (se **figur 14C**). Denna jämförelse gör det troligt att det är sulfatjonerna som i första hand ger upphov till kompakteringen.

**Figur 12B** visar att de olika salterna antingen kan öka eller minska ThTs fluorescensintensitet. Resultatet med kopparsulfat och natriumsulfat blir motsatt det förväntade i fluorescensmätningen, när de tillsätts ökar fluorescensen kraftigt vilket tyder på att något händer med fibrillerna. Utifrån tidigare LD-analys kompakterar kopparsulfat och natriumsulfat fibrillerna på ett likartat sätt, emissionen från ThT borde därför rimligen minska eftersom färre ThT-molekyler kan binda till fibrillerna då färre inbindningssäten är tillgängliga i kompakterade fibriller (se **figur 13B**). Vi vet inte varför detta sker, en möjlig förklaring kan vara att de kompakterade fibrillerna binder färre antal ThT-molekyler, men att varje inbunden molekyl har en starkare emission i närvaro av sulfatjoner. CD-mätningen visar att β-flaksignalen minskar vid tillsats av kopparsulfat (se **bilaga 2**, **figur 1A**), vilket tyder på att stora aggregat har bildats som antingen fällts ut ur lösningen eller sprider mycket ljus. Signalen förskjuts svagt mot längre våglängd i CD-mätningen när natriumsulfat tillsätts (se **bilaga 2**, **figur 1B**), detta tyder på att fibrillernas sekundärstruktur har förändrats av kompakteringen. Utifrån dessa resultat borde man få mindre inbindning av ThT till fibrillerna, eftersom ThT binder specifikt till β-flakstrukturen i amyloida fibriller. Vår studie tyder alltså på att metallernas motjoner skulle kunna vara orsaken till en ökad fluorescensintensitet.

**Figur 12C** visar korrelationsfunktionen från DLS-experimenten och ger en indikation på vad som händer med fibrillaggregatens storlek efter tillsats av de olika salterna. När kopparsulfat tillsätts resulterar det i en tydlig trend där ökande koncentration resulterar i en längre korrelationstid och därmed bildning av större aggregat. I början och i slutet av kurvan kan man observera att det finns störningar i kurvans form som tyder på att polydispersiteten i provet har ökat, detta är en ytterligare indikation på att det har bildats större aggregat. Även försöken med natriumsulfat gav liknande resultat och tyder på att insulinaggregaten blivit större. **Figur 13C** visar korrelationsfunktionens halveringstid avsatt mot koncentrationen av de tillsatta salterna för att tydligare visualisera förskjutningen mot längre korrelationstid.

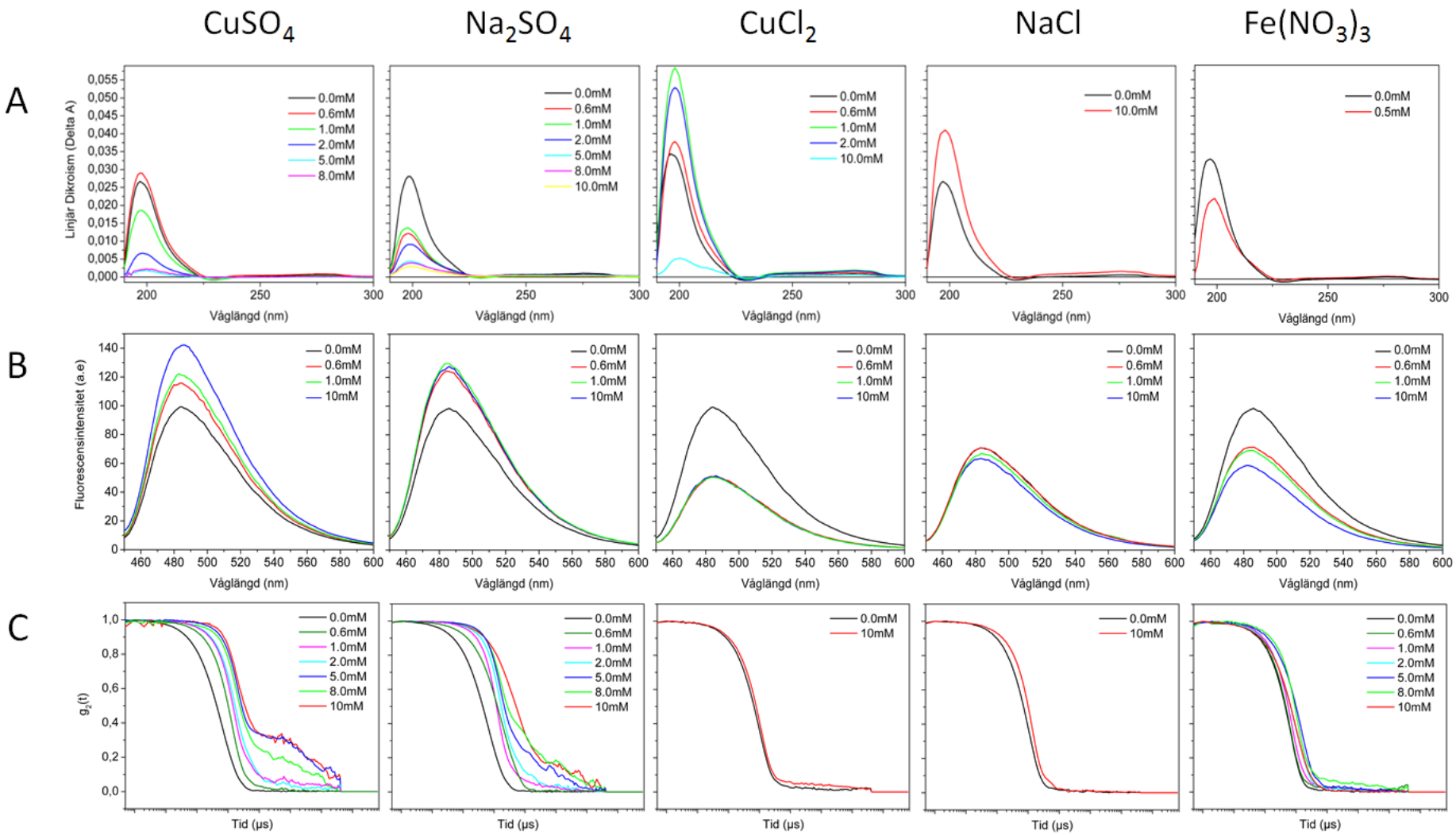
När natriumklorid tillsätts syns ingen effekt på kompakteringen utifrån LD-analysen. Signalen från fibriller i närvaro av natriumklorid är högre än signalen från enbart fibriller, de verkar alltså sträckas ut eller få ökad persistenslängd men inte ökad kompaktering (se **figur 12A**). Detta tyder på att varken natriumjoner eller kloridjoner har någon större inverkan på kompakteringen, den kompaktering som sker när natriumsulfat tillsätts beror som tidigare nämnts troligtvis på sulfatjonerna. När kopparklorid tillsätts minskar LD-signalen på liknande sätt som för kopparsulfat, men inte lika mycket (se **figur 13A**). Eftersom kloridjonerna i natriumklorid inte verkar kompaktera insulinfibrillerna så tyder detta ändå på att kopparjonerna faktiskt också har en viss effekt på kompakteringen, oavsett motjon. Eftersom emissionsintensiteten inte påverkas när natriumkloridsaltet tillsätts styrks slutsatsen av att motjonen spelar en viktig roll (se **figur 13B**). När kopparklorid tillsätts minskar emissionsintensiteten i enighet med den ursprungliga teorin, vilket styrker hypotesen att det är sulfatjonen som bidrar till ökad emissionsintensitet i kopparsulfatsaltet (se **figur 13B**). CD-mätningen visar att β-flak strukturen finns kvar då kopparklorid tillsätts (se **bilaga 2**, **figur 1C**). I DLS-mätningarna syns ingen förändring i korrelationstiden som påvisar att fibrillernas storlek har ändrats, varken då kopparklorid eller natriumklorid tillsätts (se **figur 12C**).

När järnnitrat undersöks används endast en koncentration av 0,5 mM i LD. Det är inte möjligt att

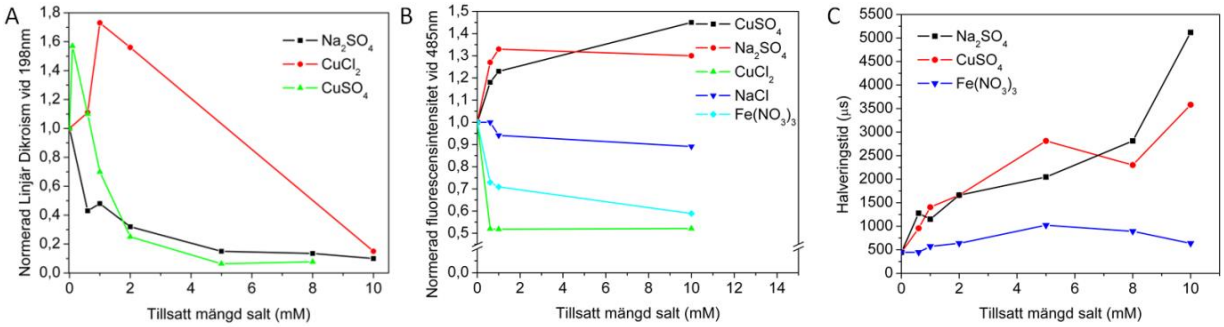
undersöka högre koncentrationer eftersom järnjoner absorberar mycket ljus i det relevanta våglängdsområdet. Vi observerar att järnnitrat har en minskande effekt på LD-signalen (se **figur 12A**) vilket tyder på att fibrillerna har kompakterats. I fluorescensmätningarna ser vi att järnnitrat liksom kopparklorid ger minskad emissionsintensitet till skillnad från kopparsulfat och natriumsulfat. Den minskade emissionsintensiteten tror vi beror på att fibrillerna kompakterats. Eftersom vi tidigare konstaterat att en ökad fluorescensintensitet beror av motjonerna drar vi slutsatsen att fibrillerna kompakterats på grund av järnjonerna och inte den monovalenta nitratjonen (se **figur 12B**, **13B**). I DLS-mätningen kan man se en svag förskjutning mot längre korrelationstider för koncentrationer upp till 5,0 mM (se **figur 12C**) vilket innebär att större aggregat har bildats. I **figur 12C** går det att se tecken på att tillsatsen av 8,0 mM kan ha påverkat kompakteringen. När korrelationsfunktionen närmar sig noll kan man se en störning liknande de som observerats för proven med kopparsulfat och natriumsulfat, vilket tyder på att provet innehåller aggregat av varierande storlek. Halveringstiden visar att fibrillerna inte bildat större komplex när koncentrationen höjs till 10 mM järnnitrat (se **figur 13C**).

Genom att använda AFM visualiserar vi insulinfibrillerna och kan därmed kvalitativt avgöra om de uppträder som enskilda fibriller eller i kompakterad form, vilket är ett värdefullt komplement till de andra analysmetoderna. I **Figur 14B**, **C** ser man att kopparsulfat respektive natriumsulfat visar på en kompakteringsprocess där fibrillerna tillsammans skapar tjockare och längre strukturer. Vi observerar att kopparsulfat och natriumsulfat liknar varandra, därför dras slutsatsen även här att det är sulfatjonen som orsakar kompakteringen. **Figur 14A, B** ger också en väldigt tydlig förklaring av det som observeras i LD-analysen; Fibrillerna interagerar främst genom lateral association, vilket troligen gör att de fortfarande är linjerade i flödescellen som används för LD-mätningarna.
I **figur 14D** ser man att kopparklorid är en svagt bidragande faktor till kompaktering, jämfört med referensproven (**figur 9**). **Figur 14E** är mycket likt referensprovet, vilket tyder på att natriumklorid inte bidrar till ökad kompaktering av fibrillerna. I **figur 14F** har fibrillernas kompaktering ökat, det är troligen järnjonerna som orsakar detta.

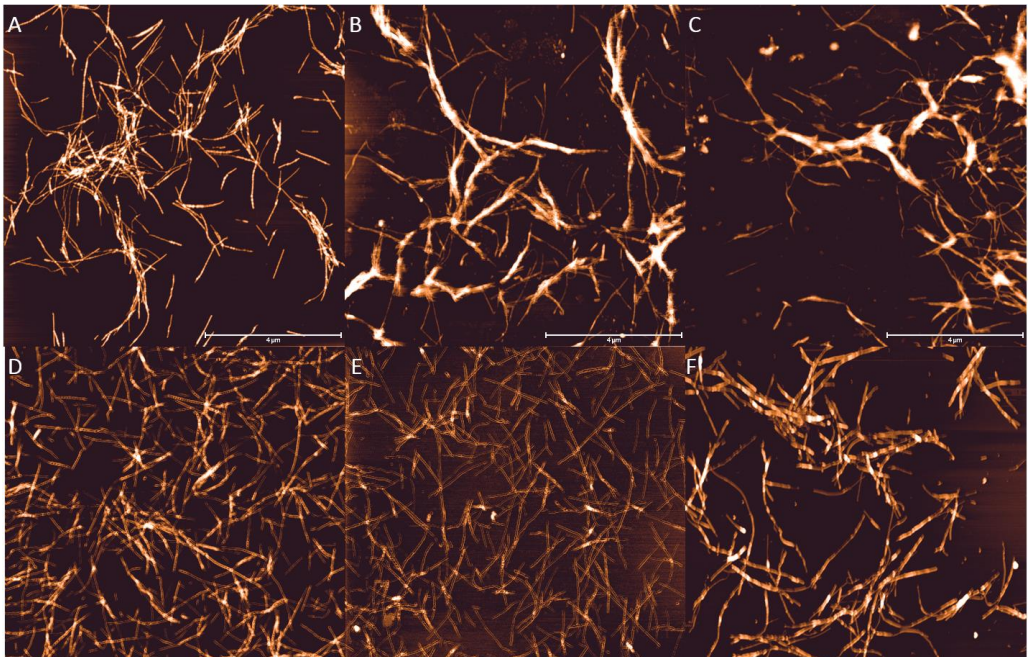
Fibriller blir mindre lateralt associerade då kopparsulfat tillsätts efter det att aggregationen till fibriller har skett jämfört med då den tillsätts till monomert insulin (se **figur 10A** och **14A**, **B**). Liknande tendenser är möjliga att observera för natriumsulfat, men fibrillerna bildar inte lika stora aggregat (se **figur 10B** och **14C**). När salterna tillsätts till fibrillerna resulterar det i mer nätverksliknande morfologi i de båda fallen. Försöken med kopparklorid tyder på att saltet har en större inverkan på fibrillerna då det tillsätts till monomert insulin (se **figur 10C** och **14D**).




**Figur 12. Kompaktering av insulinfibriller vid tillsats av olika metallsalter. Rad A) LD-spektrum av insulinfibriller med salterna. Vid tillsats av högre koncentrationer av kopparsulfat, natriumsulfat och kopparklorid syns en tydlig minskning av LD-signalen vid 200 nm. Vid tillsats av järnnitrat syns också en minskning av signalen vid 200 nm men när natriumklorid tillsätts ökar istället signalen. Rad B) Fluorescensspektrum av insulinfibriller med salterna. Emissionsintensiteten ökar vid 485 nm när kopparsulfat och natriumsulfat tillsätts, men minskar vid tillsats av järnnitrat och kopparklorid. När natriumklorid tillsätts påverkas inte ThT-signalen nämnvärt. Rad C) Normerade korrelationsfunktioner från DLS-mätningarna med insulinfibriller och salterna. När koncentrationen av kopparsulfat, natriumsulfat och järnnitrat ökar blir korrelationstiden längre och det blir störningar i slutet av mätningen. Vid tillsats av natriumklorid och kopparklorid händer inget anmärkningsvärt.**




**Figur 13. Normerade maxvärden, signalförändring mot tillsatt mängd salt. A) Maxvärden från LD-mätning vid 198 nm. B) Maxvärden från fluorescensmätning vid 485 nm. C) Halveringstid från mätning med DLS.**



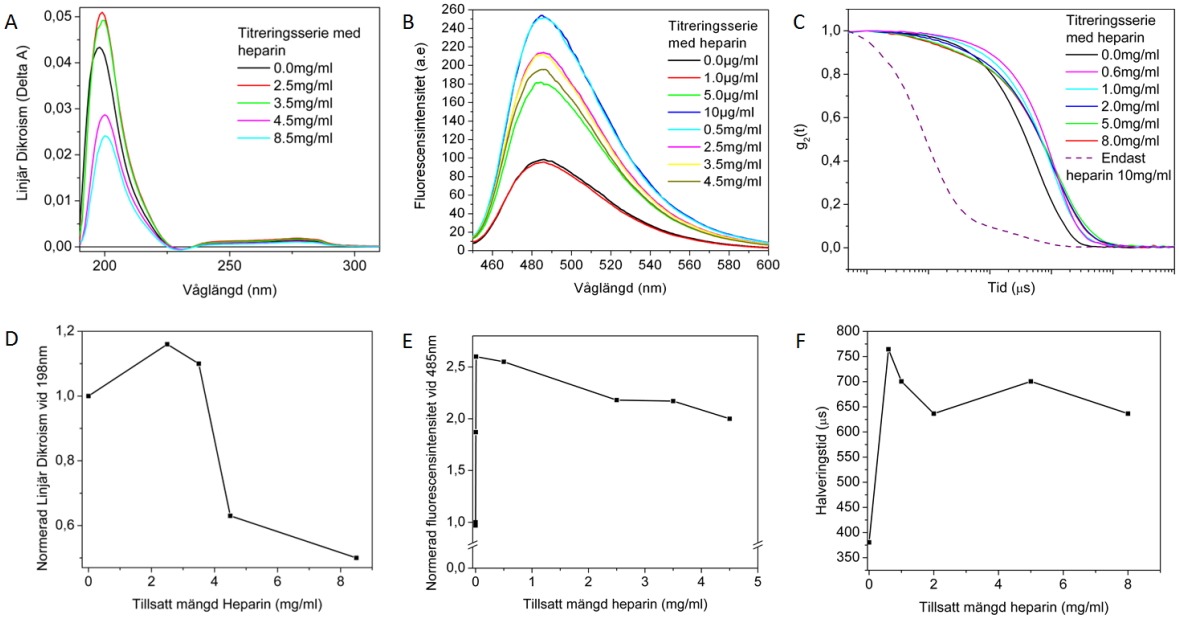

**Figur 14. AFM-bild med A) 10 µM fibriller och 0,6 mM kopparsulfat. B) 1,0 mM kopparsulfat. C) 1,0 mM natriumsulfat. D) 0,3 mM kopparklorid. E) 0,3 mM natriumklorid. F) 2,5 mM järnnitrat.**

### 5.2.3 Heparin

Heparin är som tidigare nämnt en biologiskt relevant komponent som finns i senila plack. Vi har valt att analysera heparins påverkan på fibrillerna eftersom det är en av de vanligast förekommande glukosaminoglykanerna i till exempel råttans hjärna.

I LD-spektrumet (**figur 15A)** ser man att LD-signalen ökar vid lägre koncentrationer heparin för att sedan minska med högre koncentrationer (se **figur 15D**). På samma sätt som i försöken med kopparsulfat antas detta bero på att en liten koncentration av heparin får fibrillerna att uppträda mer utsträckta i flödet, vilket resulterar i en högre LD-signal. En annan tänkbar orsak är att några fibriller först associerar lateralt utan att kompakteras, vilket borde göra att fibrillerna blir styvare och därmed får längre persistenslängd. Vid en koncentration på 4,5 mg/ml har LD-signalen minskat till hälften vilket tyder på att heparin har en kraftigt kompakterande effekt. Vid ytterligare tillsats av heparin sker inte någon fortsatt minskning av LD-signalen, mättnad har uppnåtts. Fluorescensmätningarna resulterar i en mycket kraftig intensitetsökning (se **figur 15B**). Fluorescensen ökar först stadigt med ökande koncentration heparin, upp till ca 0,5 mg/ml och börjar sedan avta vid ytterligare tillsats

(se **figur 15E**). Samtliga försök med DLS tyder på att tillsats av heparin ger en effekt men inget tydligt mönster kan observeras (se **figur 15F**). När man betraktar DLS resultaten bör man ta hänsyn till att heparin är en relativt stor partikel. Till skillnad från ThT och salt kommer heparinpartiklarna i sig sprida ljus och ha en egen korrelationskurva, denna kan ses som en streckad linje i **figur 15C**. Den kraftiga ljusspridningen från heparinpartiklarna skulle kunna vara en bidragande orsak till att DLS-försöken inte visat på en ökad kompaktering vid ökad tillsats av heparin. En annan tänkbar orsak är att samma formändringar som påverkar LD-resultaten även påverkar fibrillernas brownska rörelse. Det var inte möjligt att avbilda insulinfibriller i närvaro av heparin med AFM. Detta beror på att heparin är väldigt negativt laddat och när det interagerar med insulinfibrillerna kan fibrillerna inte längre binda till den svagt negativt laddade micaytan.



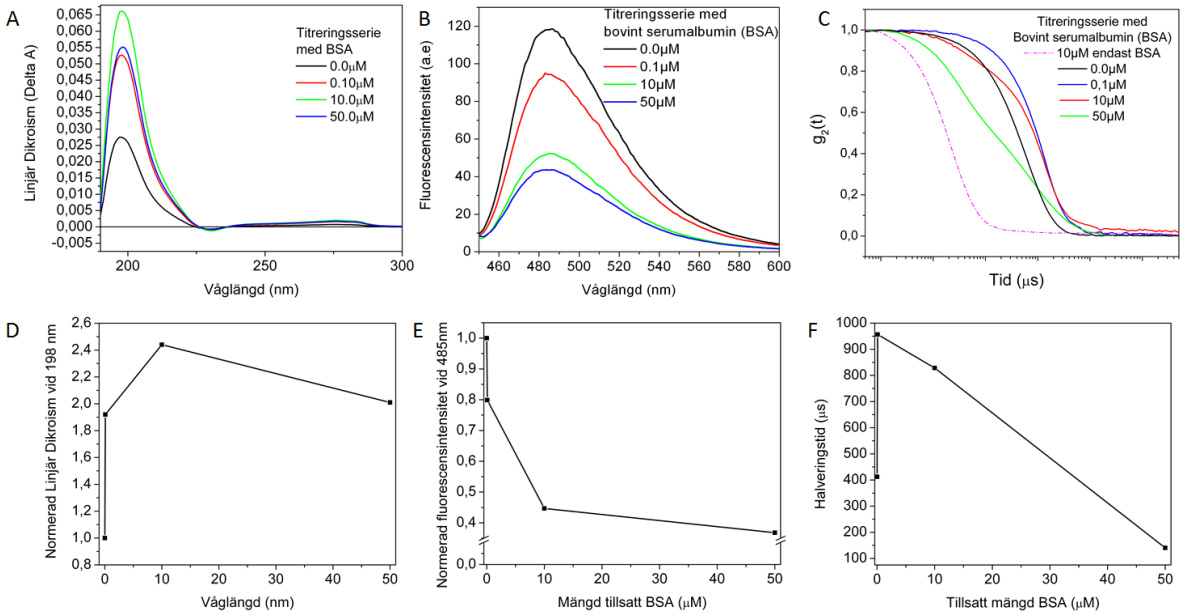

**Figur 15. A) LD-spektrum av titrering med heparin. B) Fluorescensspektrum av titrering med heparin. C) Normerad korrelationsfunktion från DLS-mätningar av titrering med heparin. D) Normerade maxvärden från LD-spektrumet mot tillsatt mängd heparin vid 198 nm. E) Normerade maxvärden från fluorescensspektrum mot tillsatt mängd heparin vid 485 nm. F) Halveringstid från DLS-mätningar mot tillsatt mängd heparin.**

### 5.2.4 Bovint serumalbumin

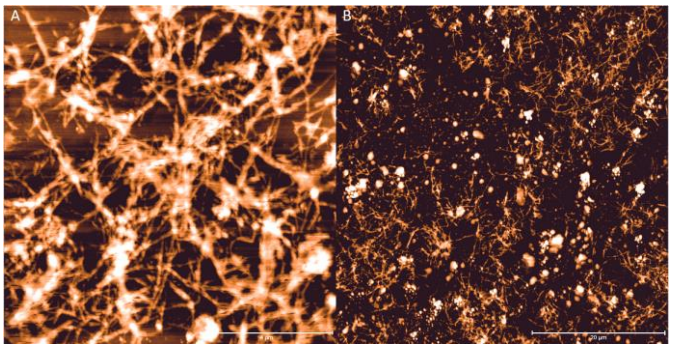
Det finns en mängd olika proteiner i plack och det är därför troligt att de påverkar fibrillernas kompaktering. I projektet testas påverkan av modellproteinet BSA.

Resultaten från experimenten med BSA visas i **figur 16**. Utifrån LD-analysen kan vi konstatera att BSA interagerar med insulinfibrillerna, men att detta inte direkt leder till kompaktering eftersom LD-signalen först ökar kraftigt för att sedan minska med ökande koncentration BSA (se **figur 16A, D**). Det kan bero på att BSA gör så att fibrillerna sträcks ut väldigt mycket och därför går det inte att se någon kompaktering från LD-spektrumet. Det kan också vara så att fibrillerna associerar lateralt så att persistenslängden ökar avsevärt. I AFM ser det ut som att fibrillerna adsorberas i ett nätverk på micaytan och att även BSA adsorberar till ytan (se **figur 17**). Bilden visar alltså inte enbart fibrillernas morfologi vilket gör att det blir en viss svårighet att observera detta i AFM. BSA gav ett kraftigt utslag i fluorescensspektrumet (**figur 16B**). En tydlig trend kan ses i titreringsserien där ThT-intensiteten minskar med ökande koncentration BSA (se **figur 16E**), vilket skulle kunna tyda på att fibrillernas kompakteringsgrad ökar. Det kan också bero på att BSA konkurrerar ut ThT-molekylerna genom att binda med högre affinitet till fibrillerna.  DLS-mätningarna tyder också på att fibrillerna kompakteras i

närvaro av BSA. Detta ser man tydligt i korrelationfunktionens förskjutning (se **figur 16C)** vilket också förtydligas i **figur 16F,** där man ser att halveringstiden ökar kraftigt då 0,1 µM BSA tillsätts. Anmärkningsvärt är att korrelationsfunktionerna för de prov som innehåller 10 µM och 50 µM BSA har en annan form än vad som är typiskt för de DLS-mätningar vi gjort. Det ser ut som att bidraget från BSA-molekylerna blir stort vid 10 och 50 µM, detta beroende av BSA-molekylernas storlek i kombination med de höga koncentrationer av BSA som används.




**Figur 16. A) LD-spektrum av titrering med BSA. B) Fluorescensspektrum av titrering med BSA. C) Normerad korrelationsfunktion från DLS-mätningar av titrering med heparin. D) Normerade maxvärden från LD-spektrum mot tillsatt mängd heparin vid 198 nm. E) Normerade maxvärden från fluorescensspektrum mot tillsatt mängd heparin vid 485 nm. F) Halveringstid från DLS-mätningar mot tillsatt mängd BSA.**




**Figur 17. 5,0 µM BSA A) 10x10µm. B) 50x50µm.**

### 5.2.5 Sammanfattning av experimentella resultat

**Tabell 2** sammanfattar hur de utvalda komponenterna påverkar fibrillernas kompaktering i vår studie. Det är tydligt att många av salterna har en distinkt påverkan på fibrillernas kompakteringsgrad. Om ThT har någon effekt så är den väldigt liten och vi ser därför inget problem med att fortsätta använda det som fibrillspecifikt färgämne vid fluorescensmätningar. Kopparsulfat och natriumsulfat har en stark effekt som går att observera med alla mätmetoder. Experimenten med kopparklorid tyder på en liten kompakterande förmåga medan försöken med natriumklorid däremot inte visar på någon kompakterande effekt. Järnnitrat har en ganska stor kompakterande förmåga. Heparin ger lite varierande resultat med de olika mätmetoderna, vilket kan bero på att den

är extremt negativt laddad. BSA verkar kompaktera fibrillerna men på ett lite annat sätt, vilket kan bero på dess storlek.

**Tabell 2. En jämförelse av de utvalda komponenternas kompakterande förmåga. Den kompakterande förmågan har graderats på en skala från 0 till +++, där 0 betyder att inga tecken på kompaktering har observerats medan +++ betyder att en mycket stor kompakterande förmåga observerats. De mätningar som inte har genomförts betecknas med – och EA (Ej Analyserbart) betyder att resultaten inte kar kunnat kopplas till ökad kompaktering.**

| | Metoder | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Komponenter** | LD | Fluorescens | DLS** | AFM | CD*** |
| **ThT** | EA | - | + | + | - |
| **Kopparsulfat** | +++ | +++ | +++ | +++ | + |
| **Natriumsulfat** | ++ | +++ | +++ | +++ | + |
| **Kopparklorid** | ++ | +++ | 0 | + | 0 |
| **Natriumklorid** | 0 | 0 | + | 0 | - |
| **Järnnitrat** | +* | ++ | ++ | ++ | - |
| **Heparin** | ++ | EA | + | - | - |
| **BSA** | 0 | +++ | ++ | +++ | - |

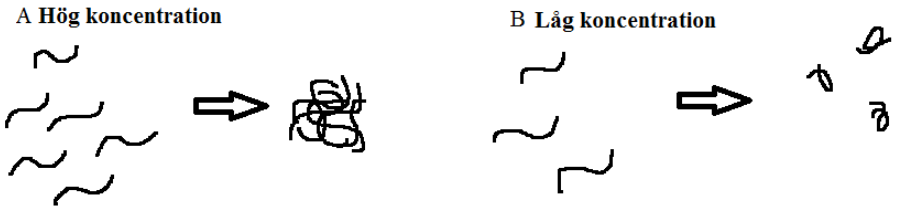
*Järnnitrat absorberar mycket i UV-området och är därför endast möjlig att undersöka vid låga koncentrationer i LD.

** DLS-graderingen är baserad på en jämförelse av förändring i korrelationsfunktion, dels förlängd korrelationstid och dels störningar då korrelationsfunktionen närmar sig noll. Förändringen i korrelationsfunktionens halveringstid visualiseras i ett stapeldiagram för att ytterligare förenkla jämförelsen av komponenternas effekt på fibrillaggregatens storlek (se **bilaga 2, figur 5**).

*** CD-spektra visas i **bilaga 2, figur 1**.

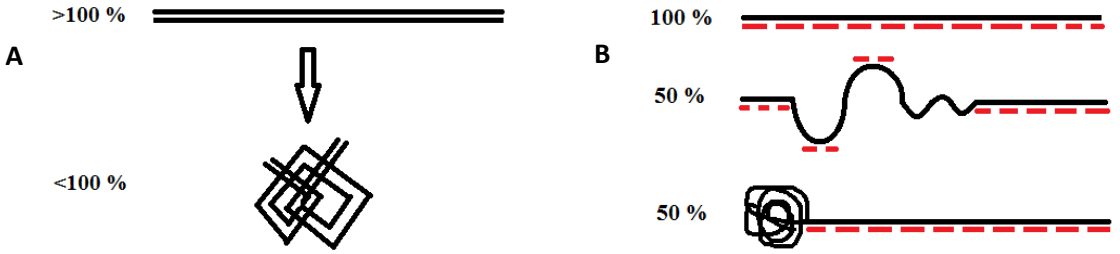
# 6 Diskussion: De olika komponenternas påverkan av kompakteringsgraden

Målsättningen med det här projektet har varit att kartlägga komponenter som återfinns i amyloida plack och som kan tänkas underlätta kompakteringen av de amyloida fibriller som är huvudkomponenten i dessa plack. Syftet var att få mer kunskap kring hur plack kan bildas i hjärnan genom experimentell karaktärisering av grundläggande mekanismer för kompaktering av amyloida fibriller. Detta kan i förlängningen bidra till en ökad molekylär förståelse av sjukdomsförloppet vid AD. Amyloida fibriller har en linjär polymerstruktur med högt β-flakinnehåll. När senila plack bildas krävs det därför att fibrillerna kompakteras. Vår studie visar att persistenslängden hos fibrillerna påverkas av olika kompakterande biologiskt relevanta komponenter som återfinns i plack. Resultaten tyder på att fibrillerna företrädelsevis kompakteras genom att flera fibriller interagerar och lindas runt varandra (se **figur 18A**), vi har inte observerat att enskilda fibriller bildat individuella aggregat. Detta beror förmodligen på att vi har höga koncentrationer av fibriller i våra försök vilket går att se i **figur 9B**. Om experimenten utförts med lägre koncentrationen hade det varit mer sannolikt att fibrillerna bildat individuella aggregat istället (se **figur 18B**). Detta fenomen är väl studerat för DNA-kompaktering där låga koncentrationer leder till monomolekylära aggregat medan höga koncentrationer resulterar i multimolekylära aggregat[65].




Figur 18. Föreslagen kompakteringsmekanism av fibriller vid A) Hög koncentration respektive B) Låg koncentration.

**Figur 19A** visar att vi tror att lateral association sker som ett förstadium till kompaktering. Vi drog slutsatsen efter att vi observerat sådana tendenser i AFM-bilderna och eftersom signalen oftast först ökar i LD-spektrumen. Vid ytterligare tillsats kompakteras fibrillerna enligt **figur 14A, B** och **13A**. När fibrillerna är i lösning är de 100 % linjära endast i teorin, i praktiken är de böjliga kedjor (se **figur 19B**).




Figur 19. A) Fibrillerna associerar först lateralt för att sedan kompakteras till större aggregat. B) Hur fibrillerna teoretiskt skulle kunna se ut när de är i lösning. I verkligheten är de förmodligen inte 100 % linjära utan liknar med större sannolikhet den mellersta bilden där 50 % är linjär. För att underlätta visualisering av linjäriteten kan man tänka sig att häften av fibrillen är linjär och resten kraftigt kompakterad (nedre bilden).

Vi har genom en litteraturstudie analyserat egenskaper hos de komponenter som finns i plack för att utreda vilka som är betydande för kompakteringsgraden hos amyloida fibriller. I litteraturstudien kategoriserade vi biologiskt relevanta komponenter i termer av storlek och fysikaliska egenskaper såsom laddning och hydrofobicitet som skulle kunna ha betydelse för komponenternas kompakterande förmåga. Vi drog slutsatsen att laddning är den viktigaste egenskapen hos kompakterande komponenter.

Insulin är positivt laddad vid pH 2,2 vilket innebär att det interagerar elektrostatiskt med negativt laddade komponenter som exempelvis heparin och motjoner. När salter undersöktes var det troligt att insulinfibrillerna främst skulle interagera elektrostatiskt med de negativt laddade motjonerna. Vi tror att motjonerna kan skärma fibrillernas laddning och därmed både underlätta interaktion mellan metalljoner och fibriller och även mellan fibrillerna. Våra experiment tyder på att motjoner med högre laddning har större effekt på kompakteringen. Det kan förklaras med SHs-regel som beskriver att då en viss koncentration av ett lågmolekylärt salt tillsätts, så koagulerar kolloida systemet på grund av motjonerna (se avsnitt 4.4). Detta förklarar varför tvåvärda negativt laddade motjoner har så mycket mer effekt än envärda joner som inte har någon märkbar effekt. Utifrån denna teori är det osannolikt att nitratjoner påverkar fibrillernas kompaktering, den oväntat stora effekten från järnnitrat beror därmed troligtvis på järnjonerna. Vi tror att detta skulle kunna ske enligt SHs-regeln för negativt laddade Aβ-fibriller och metalljoner i hjärnan. Metalljonernas effekt på kompakteringen verkar också till viss del bero av laddningen. Envärda joner har inte någon effekt medan både kopparjoner ($Cu^{2+}$) och järnjoner ($Fe^{3+}$) påverkar fibrillernas kompaktering. Trots att kopparjonerna har en lägre laddning visar våra försök på att de har lika stor effekt på kompakteringen som järnjonerna. Detta tyder på att det finns sekvensspecifika interaktioner utöver de elektrostatiska

mellan metalljonerna och insulinfibrillerna. Metalljoner borde därför ha en stor effekt på kompakteringen av Aβ-fibriller om både elektrostatiska interaktioner och sekvensspecifika interaktioner kan ske simultant mellan metalljoner och Aβ-fibriller i hjärnan.

Vi undersökte hur de amyloida fibrillernas kompaktering påverkas av glukosaminoglykanen heparin. Vi uppnådde olika resultat med olika metoder, vilket innebär att det är möjligt att heparin har en kompakterande effekt. Heparin har inte någon känd bindningsdomän på bovint insulin[60] och den är extremt negativt laddad, vilket tyder på att elektrostatisk interaktion med insulinfibrillerna är mest sannolik. En anledning till att heparin inte uppvisar en markant kompakterande effekt skulle kunna vara att den är en stor molekyl och därmed är mindre effektiv än negativa joner på att skärma fibrillerna så att de kompakteras. Heparin är också en väldigt hydrofil och styv molekyl som har svårt att kompakteras, därför befinner den sig hellre i det hydrofila lösningsmedlet än interagerar med de hydrofoba insulinfibrillerna, vilket gör att kompaktering blir ännu mer osannolik. I LD-mätningarna krävdes 4,5 mg/ml heparin för att signalen skulle minska så att fibrillerna blev mindre linjära, vilket motsvarar 2 laddningar per insulinmonomer. I DLS-mätningarna krävdes 0,6 mg/ml för att större aggregat skulle bildas, detta motsvarar 0,3 laddningar per insulinmonomer. Det krävs ungefär 1,0 mM tillsats av sulfatsalterna för att erhålla liknande resultat som för heparin i LD- och DLS-mätningarna. Detta motsvarar 100 sulfatjoner per insulinmonomer och 200 laddningar, vilket innebär att det krävs färre antal laddningar för att nå samma kompaktering från heparin som från jonerna. Det tillförs inte lika många laddningar vid försöken med heparin, detta kan vara orsaken till att det inte ger lika stor effekt som motjonerna.

Proteiners påverkan undersöktes genom att tillsätta BSA som visade sig ha en starkt kompakterande effekt på de amyloida fibrillerna, detta var tydligt i samtliga analysmetoder med undantag av LD. Det är troligt att biokemiska protein-proteininteraktioner sker mellan BSA och insulinfibriller, vilket vi också tror skulle kunna vara fallet mellan en mängd andra proteiner och Aβ. Vi tror att elektrostatiska interaktioner spelar en mindre roll i denna växelverkan eftersom både insulinfibrillerna och BSA är positivt laddade. BSA är hydrofil och trivs bättre i lösningsmedlet än vid fibrillerna, så detta kan inte vara anledningen till kompakteringen. Någon typ av biokemisk protein-protein interaktioner är därför den mest troliga anledningen till att fibrillerna kompakteras.

Vår studie tyder på att små molekyler som exempelvis koppar med en jonradie på 73 pm har en kompakterande påverkan i relativt höga koncentrationer (0,6-10 mM) medan det är tillräckligt att låga koncentrationer (0,1-50 µM) av stora molekyler som exempelvis BSA (Stokes radie 3,48 nm[66]) tillsätts för att påverka kompakteringsgraden. Storleken verkar dock inte vara helt avgörande eftersom både stora och små molekyler kan ha en kompakterande effekt, samt att heparin som är en stor polymer inte har en jättetydlig kompakterande effekt.

Ingen forskning har tidigare gjorts kring mekanismer för kompaktering av amyloida fibriller. Vi har utvecklat tillämpningen av de biofysikaliska analysmetoderna som har använts och försökt kombinera dem för att erhålla så mycket information som möjligt om kompakteringen. Ibland ger de olika analysmetoderna en motsägelsefull bild av kompakteringsgraden, vilket är förklarligt eftersom metoderna mäter olika egenskaper hos fibrillerna och belyser olika aspekter av kompaktering. Mätmetoderna kompletterar generellt varandra väl och ger då en nyanserad bild av fibrillerna. De flesta mätningarna med LD överensstämmer med de övriga metoderna. Några fördelar med denna mätmetod är att proverna är enkla att förbereda och att det är en snabb analys. LD-spektrum har

bidragit till att vi har fått en ökad förståelse kring att kompakteringen sker i flera steg eftersom signalen oftast initialt ökat för att sedan minska. En nackdel är att skillnaden i spektrumet blir ganska liten för olika koncentrationer vilket gör att det inte alltid blir tydliga trender. Vidare måste nya prover förberedas mellan varje mätning, vilket är tidskrävande men nödvändigt eftersom fibrillerna inte får snurras för länge på grund av risk för mekanisk fragmentering. Mätningar med CD ger enbart information om fibrillernas sekundärstruktur. Vid analys med salter är det enkelt att se om β-flakstrukturen förändras, medan BSA och heparin har en egen sekundärstruktur vilket gör att det är svårare att undersöka deras effekt på fibrillerna. CD-mätningar ger ingen direkt information om fibrillernas kompaktering men kan användas som ett komplement till de andra metoderna. Analys med fluorescensspektrometern ger ofta väl separerade spektrum för olika koncentrationer. En fördel med denna mätmetod är att den resulterar i tydliga trender. Hänsyn behöver tas till att komponenterna alltid undersöks i kombination med ThT. AFM är en mycket bra metod för att undersöka morfologin hos fibrillerna. Det går att se vilken typ av kompaktering som har skett, vilket utmärker metoden. Mätningen är subjektiv eftersom intressanta delar av provplattan valdes ut för analys. Hänsyn behöver även tas till att fibrillerna inte längre är i lösning och därför möjligen skulle kunna bete sig och se annorlunda ut. AFM är dock en väletablerad metod för att studera fibriller och bör därför ge en representativ bild. En nackdel med AFM är att en mätning tar lång tid att utföra för att få högupplösta bilder. Från DLS-mätningar går det tydligt att se om en förändring i fibrillaggregatens storlek har skett. Det är däremot svårt att se trender för olika koncentrationer, vilket kan bero på att kompakteringen inte sker så att den brownska rörelsen påverkas linjärt och därmed gör inte heller halveringstiden det.

# 7 Slutsatser

Det finns många komponenter förutom Aβ i senila plack hos AD-patienter. Vi har undersökt ett fåtal av dessa och dragit slutsatsen att vissa av dem underlättar kompakteringen av fibrillerna. Metalljoner som inte är monovalenta har en stor effekt på kompakteringen, detta gäller också för deras respektive motjoner. Heparin har en liten kompakterande effekt men fler GAGs måste undersökas för att man ska kunna dra en entydig slutsats. Fler proteiner måste också undersökas för att man ska kunna dra en tydligare slutsats, våra resultat tyder dock på att de kan ha en avsevärd påverkan på kompakteringsgraden. En misstanke var att ThT skulle ge upphov till kompaktering av fibrillerna, detta kan inte bekräftas från våra försök därför anser vi att det är lämpligt att fortsätta använda ThT som fibrillspecifikt färgämne.

# 8 Rekommendationer för vidare försök

Vårt projekt kan ses som en inledande studie om hur amyloida fibriller kompakteras och kan användas som riktlinje för fler försök. Försök behöver göras med andra proteinfibriller som återfinns i plack och under förhållanden som är mer likt det i hjärnan.

För att göra det möjligt att studera sGAGs påverkan på fibriller med hjälp av AFM anser vi att det behövs en ytbehandling på provplattan som är neutral eller något positivt laddad, eftersom sGAGs är så negativt laddade att de troligtvis repellerar från micaytan i våra försök**.** Eftersom vi endast gjort försök med modellproteinet BSA är det nödvändigt att testa fler proteiner i vidare försök. Det finns information om vilka andra protein som ansamlas i AD-drabbad hjärnvävnad och de skulle alla vara intressanta att undersöka (**tabell 1**). Tidsaspekten har inte undersökts ordentligt i projektet, detta

kan vara en viktig faktor som påverkar resultaten. Ett problem under projektet var att skapa lösningar med fibriller av samma koncentration, detta på grund av att en NanoDrop användes för majoriteten av absorptionsbestämningarna. En lösning på detta skulle vara att använda en kraftfull spektrofotometer som gör mer noggranna mätningar. Det är möjligt att detta också skulle ge tydligare och mer tillförlitliga resultat i centrifugeringsförsöken.

# 9 Källförteckning


1. Alzheimerföreningen http://www.alzheimerforeningen.se/demenssjukdomar/. (accessed 13 feb).
2. Demenscentrum http://www.demenscentrum.se/Fakta-om-demens/Demenssjukdomarna/. (accessed 17 mars).
3. Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **2006,** *75*, 333-66.
4. Glenner, G. G.; Wong, C. W., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. *Biochem Biophys Res Commun* **2012,** *425* (3), 534-9.
5. NATIONALENCYKLOPEDIN http://www.ne.se.
6. Armstrong, R. A., The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* **2009,** *47* (4), 289-99.
7. Bioinformatics, S. S. I. o. http://web.expasy.org/protparam/. (accessed 15 maj).
8. Kyte, J.; Doolittle, R. F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **1982,** *157* (1), 105-32.
9. Stromer, T.; Serpell, L. C., Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril. *Microsc Res Tech* **2005,** *67* (3-4), 210-7.
10. Tycko, R., Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Q Rev Biophys* **2006,** *39* (1), 1-55.
11. Dobson, C. M., Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci* **1999,** *24* (9), 329-32.
12. Vendruscolo, M.; Knowles, T. P.; Dobson, C. M., Protein solubility and protein homeostasis: a generic view of protein misfolding disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011,** *3* (12).
13. Sunde, M.; Serpell, L. C.; Bartlam, M.; Fraser, P. E.; Pepys, M. B.; Blake, C. C., Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* **1997,** *273* (3), 729-39.
14. Lannfelt, L. http://www.berzelii.uu.se/swedish/forskning/alzheimers_sjukdom.html. (accessed 16 maj).
15. Nielsen, L.; Khurana, R.; Coats, A.; Frokjaer, S.; Brange, J.; Vyas, S.; Uversky, V. N.; Fink, A. L., Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* **2001,** *40* (20), 6036-46.
16. Kumar, S.; Walter, J., Phosphorylation of amyloid beta (Aβ) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* **2011,** *3* (8), 803-12.
17. Möller, R. http://www.kilu.lu.se/english/research/portratt/risto_cukalevski/. (accessed 28 feb).
18. Wilson, M. R.; Yerbury, J. J.; Poon, S., Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol Biosyst* **2008,** *4* (1), 42-52.
19. Insulin.se http://www.insulin.se/Startsida_insulin/Insulinbehandling/. (accessed 25 mars).
20. kunskap, W. u. http://sv.swewe.com/word_show.htm/?82998_1&Insulin. (accessed 12 maj).
21. Sigma-Aldrich http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/i6634pis.pdf%C2%A0(accessed 19 maj).
22. Distribution, M. W. http://isoelectric.ovh.org/index.html. (accessed 12 maj).
23. Railey, A. M.; Groeber, C. M.; Flinn, J. M., The effect of metals on spatial memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2011,** *24* (2), 375-81.

24. Castillo, G. M.; Lukito, W.; Wight, T. N.; Snow, A. D., The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation. *J Neurochem* **1999,** *72* (4), 1681-7.
25. Díaz-Nido, J.; Wandosell, F.; Avila, J., Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides* **2002,** *23* (7), 1323-32.
26. Liao, L.; Cheng, D.; Wang, J.; Duong, D. M.; Losik, T. G.; Gearing, M.; Rees, H. D.; Lah, J. J.; Levey, A. I.; Peng, J., Proteomic characterization of postmortem amyloid plaques isolated by laser capture microdissection. *J Biol Chem* **2004,** *279* (35), 37061-8.
27. Assay-Protocol http://www.assay-protocol.com/biochemistry/protein-fibrils/thioflavin-t-spectroscopic-assay. (accessed 13 feb).
28. Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R.; Singh, S., Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol* **2005,** *151* (3), 229-38.
29. Biancalana, M.; Koide, S., Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* **2010,** *1804* (7), 1405-12.
30. Nordén, R. o. D., *Linear Dichroism and Circular Dichroism, Cambridge*. RSC: 2010.
31. Wigenius, J.; Andersson, M. R.; Esbjörner, E. K.; Westerlund, F., Interactions between a luminescent conjugated polyelectrolyte and amyloid fibrils investigated with flow linear dichroism spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **2011,** *408* (1), 115-9.
32. Bulheller, B. M.; Rodger, A.; Hirst, J. D., Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys* **2007,** *9* (17), 2020-35.
33. Bulheller, B. M.; Rodger, A.; Hicks, M. R.; Dafforn, T. R.; Serpell, L. C.; Marshall, K. E.; Bromley, E. H.; King, P. J.; Channon, K. J.; Woolfson, D. N.; Hirst, J. D., Flow linear dichroism of some prototypical proteins. *J Am Chem Soc* **2009,** *131* (37), 13305-14.
34. Kahn, G. N. http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/. (accessed 14 april).
35. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2007.
36. Christopher K. Mathews, K. E. v. H., Dean R. Appling, Spencer R Anthony-Cahill, *BIOCHEMISTRY*. 2000.
37. Bruce Alberts, A. J., Julia Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of the Cell*. 2007; p
38. A/S, D. D. M. E. http://www.dme-spm.com/funktion.html. (accessed 20 mars).
39. Butt, H. J., Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophys J* **1991,** *60* (6), 1438-44.
40. AB, A. http://www.axeb.se/media/dokument/Centrifug_20080410.pdf. (accessed 25 feb).
41. Ltd, M. I. http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/%C2%A0(accessed 5 mars).
42. LS-instruments http://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/. (accessed 27 april).
43. Wells, A. F., *Structural Inorganic Chemistry*. 5th ed.; Oxford University Press: 1984.
44. Technology, W. http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=10644. (accessed 16 maj).
45. Hari Garg, C. H., *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. 2004.
46. J. Necas, L. B., P. Brauner, J. Kolar *Hyaluronic acid (hyaluronan)*; 2008.
47. International, T. R. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/chondroitin_508.pdf. (accessed 16 maj).
48. Lee, C. T.; Huang, C. P.; Lee, Y. D., Preparation of amphiphilic poly(L-lactide)-graft-chondroitin sulfate copolymer self-aggregates and its aggregation behavior. *Biomacromolecules* **2006,** *7* (4), 1179-86.
49. Sigma-Aldrich http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i6634?lang=en&region=SE. (accessed 5 feb).
50. Diwan, J. J. https://http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/lipid.htm - Cholesterol. (accessed 16 maj).

51. Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R., Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* **1998,** *158* (1), 47-52.
52. Crichton, R., Dexter, D., & Ward, R., Metal based neurodegenerative disease— From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Coordination Chemistry Reviews* **2008,** *252*, 1189-1199.
53. Falangola, M. F.; Lee, S. P.; Nixon, R. A.; Duff, K.; Helpern, J. A., Histological co-localization of iron in Abeta plaques of PS/APP transgenic mice. *Neurochem Res* **2005,** *30* (2), 201-5.
54. Yoshimoto, N.; Tasaki, M.; Shimanouchi, T.; Umakoshi, H.; Kuboi, R., Oxidation of cholesterol catalyzed by amyloid beta-peptide (Abeta)-Cu complex on lipid membrane. *J Biosci Bioeng* **2005,** *100* (4), 455-9.
55. Campbell, A., The role of aluminum and copper on neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2006,** *10* (2-3), 165-72; Pajonk, F. G.; Kessler, H.; Supprian, T.; Hamzei, P.; Bach, D.; Schweickhardt, J.; Herrmann, W.; Obeid, R.; Simons, A.; Falkai, P.; Multhaup, G.; Bayer, T. A., Cognitive decline correlates with low plasma concentrations of copper in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2005,** *8* (1), 23-7.
56. Kong, G. K.; Miles, L. A.; Crespi, G. A.; Morton, C. J.; Ng, H. L.; Barnham, K. J.; McKinstry, W. J.; Cappai, R.; Parker, M. W., Copper binding to the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *Eur Biophys J* **2008,** *37* (3), 269-79.
57. Bayer, T. A.; Multhaup, G., Involvement of amyloid beta precursor protein (AbetaPP) modulated copper homeostasis in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2005,** *8* (2), 201-6; discussion 209-15.
58. Ong, W. Y.; Farooqui, A. A., Iron, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2005,** *8* (2), 183-200; discussion 209-15.
59. Rabenstein, D. L., Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* **2002,** *19* (3), 312-31.
60. Conrad, H. E., *Heparin-Binding Proteins*. 1997.
61. Zatta, P.; Tognon, G.; Carampin, P., Melatonin prevents free radical formation due to the interaction between beta-amyloid peptides and metal ions [Al(III), Zn(II), Cu(II), Mn(II), Fe(II)]. *J Pineal Res* **2003,** *35* (2), 98-103.
62. Wall, S. *Yt- och Kolloidkemi*; 2012; p 17.
63. Cohlberg, J. A.; Li, J.; Uversky, V. N.; Fink, A. L., Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro. *Biochemistry* **2002,** *41* (5), 1502-11.
64. Huang, B. X.; Kim, H. Y.; Dass, C., Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2004,** *15* (8), 1237-47.
65. Mann, A.; Khan, M. A.; Shukla, V.; Ganguli, M., Atomic force microscopy reveals the assembly of potential DNA "nanocarriers" by poly-L-ornithine. *Biophys Chem* **2007,** *129* (2-3), 126-36.
66. Axelsson, I., Characterization of proteins and other macromolecules by agarose gel chromatography. *Journal of Chromatography A* **1978,** *152* (1), 21-32.

# Bilaga 1: Ordlista

**Alfasynuklein-** Ett protein som har skadlig inverkan på nervcellerna i hjärnan. Proteinet är orsaken till ett flertal nervrelaterade sjukdomar som Parkinsons sjukdom och vissa former av Alzheimers sjukdom

**Amyloid-** Benämning på vissa typer av mikroskopiskt iakttagbara inlagringar av onormal substans mellan cellerna i kroppsvävnader. Huvudkomponenten i inlagringarna är onormala olösliga fibriller som består av något av kroppens proteiner

**Basala lamina-** En viktig del av den extracellulära matrisen. Basal lamina separerar till exempel muskelceller och fettceller från stödjevävnad.

**Brownsk rörelse-** Små lätta föremål som är uppslammade i en vätska eller som svävar i en gas rör sig med oregelbundna rörelser, detta rörelsemönster har fått namnet Brownsk rörelse.

**Extracellulär matris-** Den del av vävnaden som inte består av celler kan kallas det extracellulära rummet vilket upptas av ett nätverk av makromolekyler som kallas den extracellulära matrisen.

**GRAVY-** (Grand average of hydropathicity), anger ett proteins löslighet. Positivt värde betyder att proteinet är hydrofobiskt och negativt värde betyder att proteinet är hydrofobiskt.

**Homeostas-** För att multicellulära organismer ska fungera är det viktigt att den miljö som omger cellerna hålls så konstant som möjligt. Homeostasis används ofta som samlingsbegrepp för de mekanismer som tillsammans verkar för att hålla miljön konstant.

***In vitro-*** Vitro är det latinska ordet för glas, experiment som görs in vitro har görs i konstgjord miljö.

***In vivo-*** Experiment som görs i levande vävnad.

**Korrelationsfunktionens halveringstid-** Tiden då korrelationsfunktionen från DLS-mätningarna når 0,5.

**Lewykroppsdemens-** Ett mellanting mellan AD och Parkinsons sjukdom. Den näst vanligaste neurodegenerative sjukdomen.

**Oxidativ stress-** Normalt råder balans mellan bildning och elimination av radikaler i kroppens vävnader, vilket medför att överskott av radikaler inte uppstår (eller är ringa). Om emellertid ett sådant överskott skulle uppkomma utsätts organismen för *oxidativ stress*, dvs. skadeverkningar genom att vissa molekyler oxideras så att deras funktion störs.

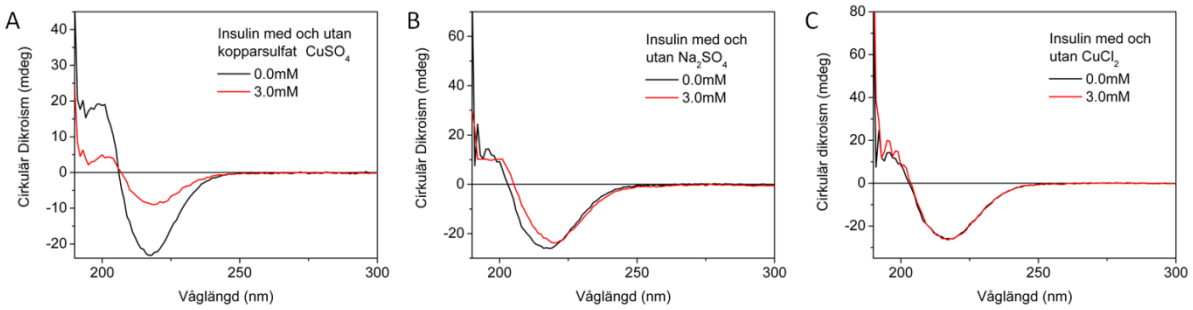
**Persistenslängd-** Mekaniska egenskaper som kvantifierar en polymers linjäritet.

**Stokes-Einstein relationen-** $D = \frac{kT}{f}$, där D är diffusions koefficient och k är Boltzmanns konstant. f kan beskrivas med Stokes lag som en funktion av vätskans viskositet (η)och partikelns radie (a) $f = 6\pi\eta a$, denna lag förutsätter att partikeln är sfärisk. Dessa funktioner ger oss en relation mellan diffusions koefficienten och vätskans viskositet.

# Bilaga 2: Övriga resultat

## CD-mätningar med salter

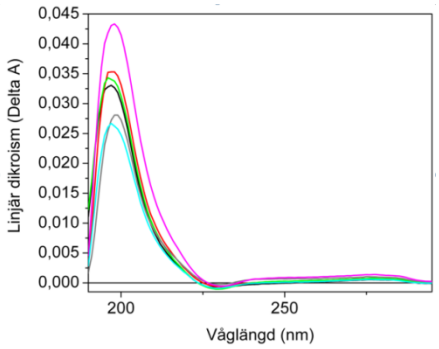
CD-spektrum med kopparsulfat, natriumsulfat och kopparklorid




**Figur 1. CD spektrum för insulinfibriller med och utan olika salter. A) Insulinfibriller med och utan kopparsulfat, sekundärstrukturen oförändrad. B) Insulinfibriller med och utan natriumsulfat, liten förskjutning åt höger som kan indikera förändring i antalet β-flak. C) Insulinfibriller med och utan kopparklorid, ingen större förändring observeras.**

## LD-mätning med fibriller

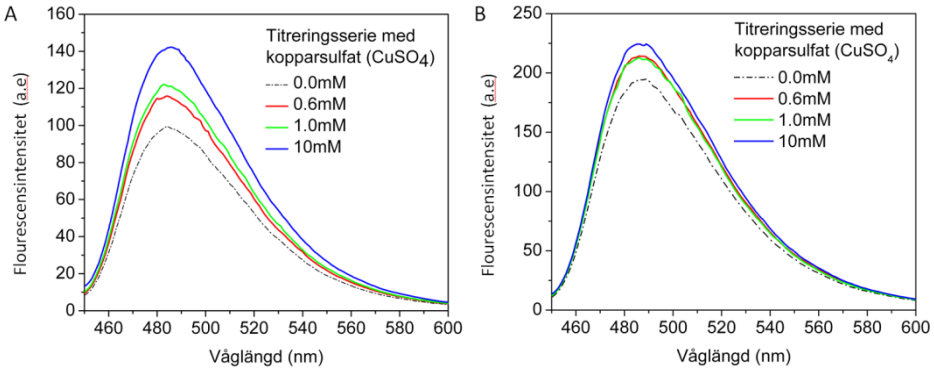
Eftersom vi preparerade nya fibriller varje vecka började vi alltid med att mäta ett prov bestående av endast fibriller, för att se om det blev någon skillnad mellan olika veckor. Det visade sig att det blev viss skillnad i absorption mellan olika veckor, detta beror antagligen på att fibrillerna är olika långa. Skillnaden mellan största och minsta värdet är så liten att detta inte ska påverka mätningarna eller resultatet.




**Figur 2. LD-mätning av fibriller olika veckor.**

## Fluorescenstitrering med kopparsulfat

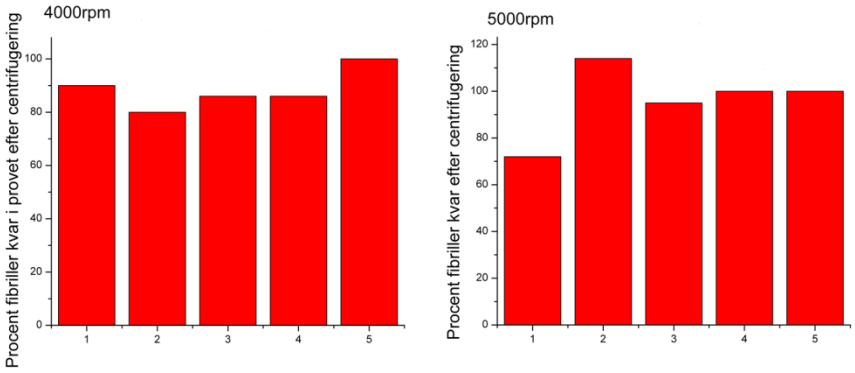
Titreringsserie med kopparsulfat för att bestämma vilken koncentration av ThT som ska användas för att undersöka de biologiska komponenterna. I A består provet av fibriller, kopparsulfat och 1 µM ThT och i B består provet av fibriller, kopparsulfat och 6,0 µM ThT. **Figur 3** visar att titreringskoncentrationerna vid tillsats av 1,0 µM ThT är tydligare separarerade än vid de olika kopparkoncentrationerna än vid tillsats av 6,0 µM ThT, därför används 1,0 µM ThT i fortsatta försök.




**Figur 3. Titreringsserie med kopparsulfat i fluorescensspektrometern visar ökad fluorescensintensitet vid ökad koncentration kopparsulfat och även ökad emission vid ökad koncentration ThT. A) Provet består av 10 µM fibriller och 1,0 µM ThT. B) Provet består av 10 µM fibriller och 6,0 µM ThT.**

## Centrifugering

Resultaten från Centrifugeringsförsöken tyder på att insulin fibrillerna aggregerar i mindre utsträckning då salter eller ThT tillsätts. När man tillsatt järnnitrat gav mätningen i NanoDrop en högre koncentration av fibriller i supernatanten än vad provet innehöll från början. Att koncentrationen höjs under centrifugeringen bedöms inte som troligt. Olika möjliga felkällor identifierades och försökte elimineras. En av dessa felkällor är koncentrationsskillnader i supernatanten, detta undviks genom att supernatanten pipetteras upp och blandas i ett nytt eppendorfrör innan 2,0 µM pipetteras upp och mäts.




**Figur 4. Resultat från de två centrifugeringsförsöken, vid 4000 rpm (till vänster) och 5000 rpm (till höger). Samtliga prov består av 50 µM fibriller och centrifugeras under 10 minuter; 1) endast fibriller. 2) fibriller med 600 µM järnnitrat. 3) fibriller med 600 µM kopparsulfat. 4) fibriller med 5,0 µM ThT. 5) fibriller med 50 µM ThT.**

## PDI

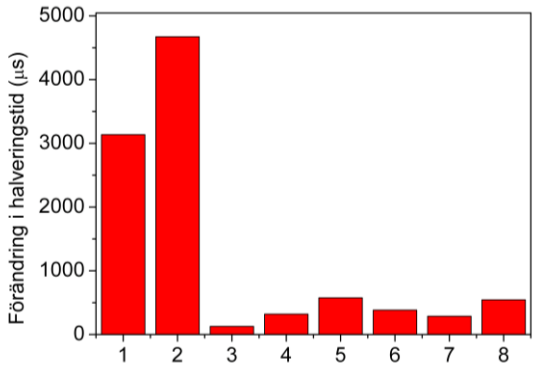
Tabell 1. Polydispersitets index (PDI) från DLS-mätningarna.

| Polydispersitets index (PDI) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tillsats** | **Konc.** | **PDI** | **Medelv.** | **Tillsats** | **Konc.** | **PDI** | **Medelv.** |
| **Kopparsulfat** | 0,0 mM | 0,453 | 0,473667 | **Natriumsulfat** | 0,0 mM | 0,453 | 0,473667 |
| | | 0,463 | | | | 0,463 | |
| | | 0,505 | | | | 0,505 | |
| | 0,6 mM | 0,166 | 0,1285 | | 0,6 mM | 0,532 | 0,572 |
| | | 0,091 | | | | 0,617 | |
| | 1,0 mM | 0,215 | 0,252 | | | 0,567 | |
| | | 0,289 | | | 1,0 mM | 0,026 | 0,109 |
| | 2,0 mM | 0,145 | 0,222 | | | 0,149 | |
| | | 0,299 | | | | 0,152 | |
| | 5,0 mM | 0,58 | 0,79 | | 2,0 mM | 0,35 | 0,326 |
| | | 1,0 | | | | 0,222 | |
| | 8,0 mM | 0,303 | 0,3145 | | | 0,406 | |
| | | 0,326 | | | 5,0 mM | 0,267 | 0,3085 |
| | 10 mM | 1,0 | 0,975 | | | 0,35 | |
| | | 0,95 | | | 8,0 mM | 0,249 | 0,2995 |
| | | | | | | 0,35 | |
| | | | | | 10 mM | 0,47 | 0,491667 |
| | | | | | | 0,46 | |
| | | | | | | 0,545 | |
| **Tillsats** | **Konc.** | **PDI** | **Medelv.** | **Tillsats** | **Konc.** | **PDI** | **Medelv.** |
| **Kopparklorid** | 0,0 mM | 0,202 | 0,184667 | **Natriumklorid** | 0,0 mM | 0,139 | 0,153333 |
| | | 0,205 | | | | 0,115 | |
| | | 0,147 | | | | 0,206 | |
| | 10 mM | 0,184 | 0,186333 | | 10 mM | 0,163 | 0,121 |
| | | 0,208 | | | | 0,085 | |
| | | 0,167 | | | | 0,115 | |
| **Tillsats** | **Konc.** | **PDI** | **Medelv.** | **Tillsats** | **Konc.** | **PDI** | **Medelv.** |
| **Järnnitrat** | 0,0 mM | 0,09 | 0,067 | **ThT** | 0,0 µM | 0,28 | 0,279 |
| | | 0,044 | | | | 0,27 | |
| | 0,6 mM | 0,119 | 0,104 | | | 0,287 | |
| | | 0,089 | | | 6,0 µM | 0,281 | 0,299333 |
| | 1,0 mM | 0,185 | 0,1805 | | | 0,298 | |
| | | 0,176 | | | | 0,319 | |
| | 2,0 mM | 0,274 | 0,222 | | 10 µM | 0,082 | 0,132 |
| | | 0,17 | | | | 0,147 | |
| | 5,0 mM | 0,175 | 0,103 | | | 0,167 | |
| | | 0,031 | | **Tillsats** | **Konc.** | **PDI** | **Medelv.** |
| | 8,0 mM | 0,032 | 0,142 | **Heparin** | 0,0 mg/ml | 0,326 | 0,3235 |
| | | 0,252 | | | | 0,321 | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10 mM | 0,354 | 0,377 | | 0,6 mg/ml | 0,201 | 0,1555 |
| | | 0,4 | | | | 0,11 | |
| **Tillsats** | **Konc.** | **PDI** | **Medelv.** | | 1,0 mg/ml | 0,316 | 0,306 |
| BSA | 0,0 mM | 0,391 | 0,391 | | | 0,296 | |
| | 0,1 mM | 0,195 | 0,1935 | | 2,0 mg/ml | 0,817 | 0,652 |
| | | 0,192 | | | | 0,487 | |
| | 10 mM | 0,404 | 0,452 | | 5,0 mg/ml | 0,621 | 0,6065 |
| | | 0,5 | | | | 0,592 | |
| | 50 mM | 0,854 | 0,883 | | 8,0 mg/ml | 0,578 | 0,5575 |
| | | 0,912 | | | | 0,537 | |

## Maximerad förändring i halveringstid från komponenterna

För att underlätta jämförelsen av effekten från samtliga komponenter visas i diagrammet nedan den största förändringen i halveringstid som varje komponent orsakat. Anledningen till att den största effekten har valts ut är bland annat på grund av BSA-resultaten där den höga koncentration vi valt att tillsätta tillsammans med BSA molekylens storlek, troligen påverkat resultaten.

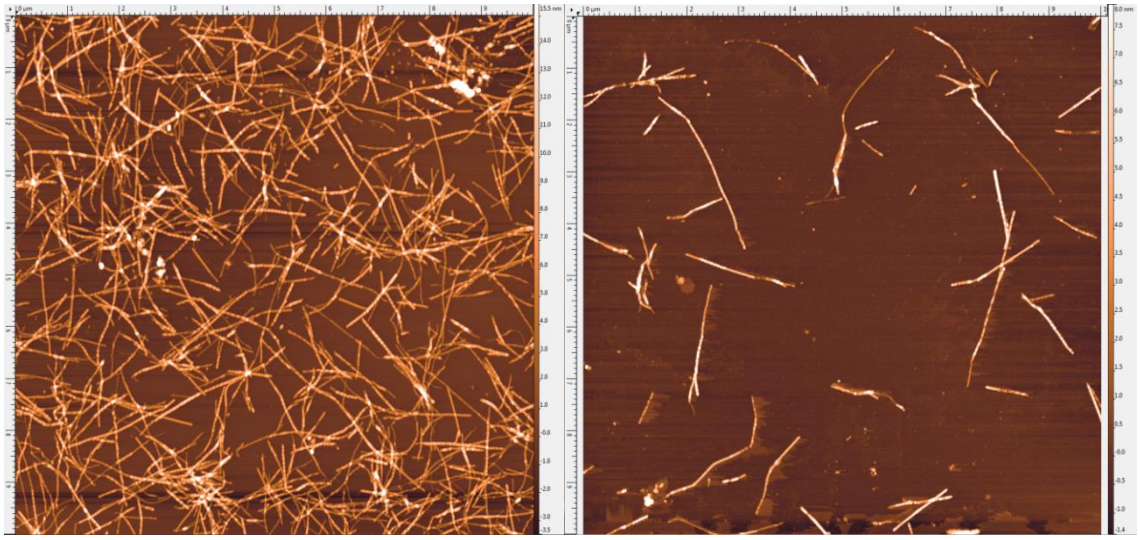



**Figur 5. Diagramet visar den förändring i halveringstid av korrelationsfunktionen som varje komponent maximalt har orsakat i DLS mätningarna. Halveringstiden för korrelationsfunktionen är en funktion av partiklarnas brownska rörelse och anses därför kunna ses som ett mått på storleksförändringen hos fibrillkomplexen. 1) Kopparsulfat 2) Natriumsulfat 3) Kopparklorid 4) Natriumklorid 5) Järnnitrat 6) Heparin 7) ThT 8) BSA.**

# AFM bilder

## Insulinfibriller

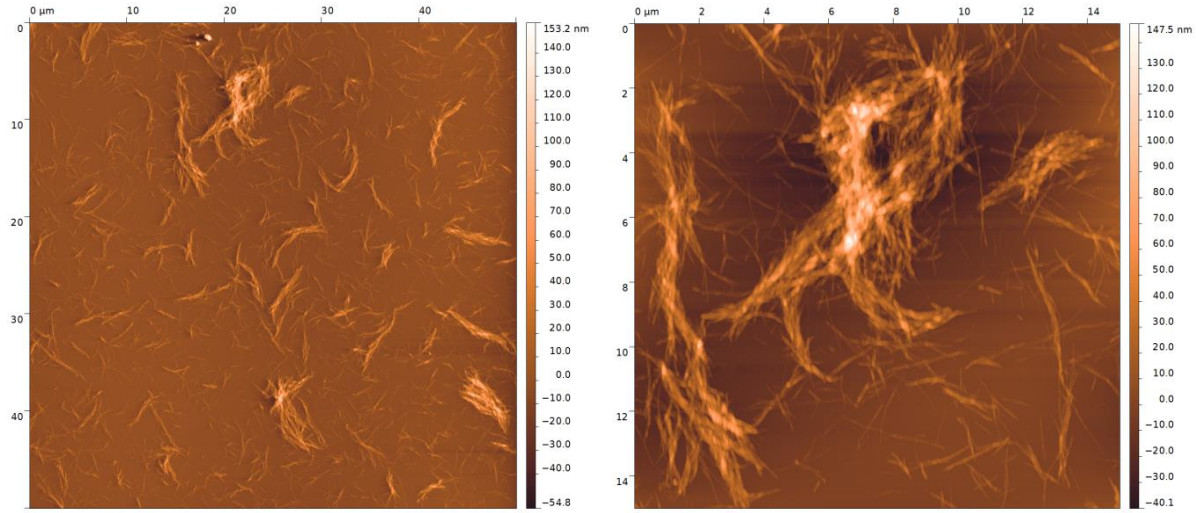
A B



Figur 6. A) 5,0 µM fibriller. 1024p skala 10x10 µm. B) 1,0 µM fibriller. 1024p skala 10x10 µm.

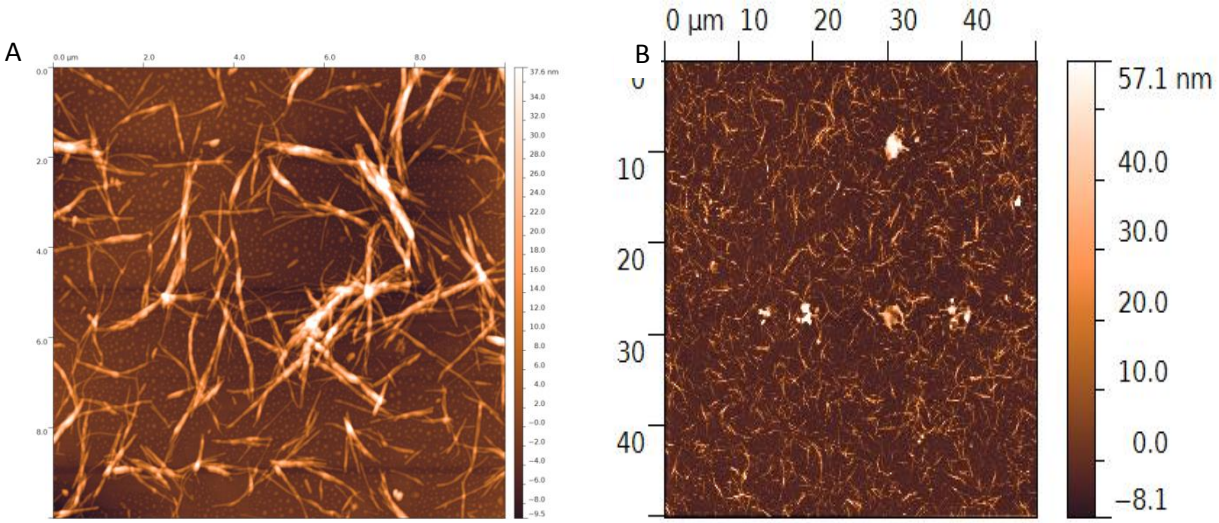
## Fibriller preparerade med kopparsulfat

A B



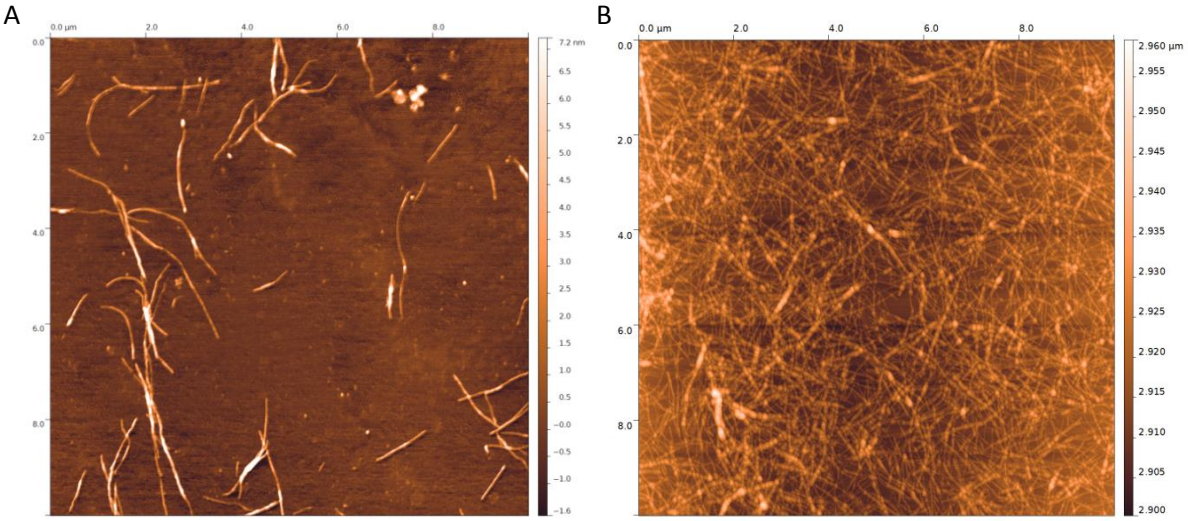

Figur 7. Kopparsulfat i monomert insulin (2,0 g/l insulin och 0,6 mM kopparsulfat, spädd 10 ggr).
A) 1024p skala 50x50 µm. B) 1024p skala 14,5x14,5µm.

## Fibriller preparerade med natriumsulfat



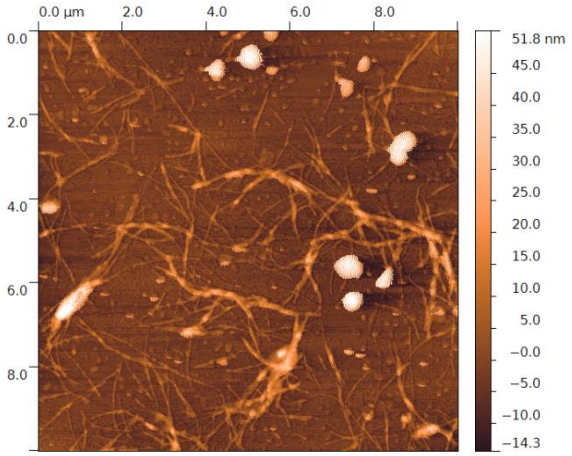

**Figur 8. Natriumsulfat i monomert insulin (2,0 g/l insulin och 0,6 mM Natriumsulfat, spädd 20 ggr). A) 1024p skala 10x10 µm. B) 256p skala 50x50 µm.**

## Fibriller preparerade med kopparklorid



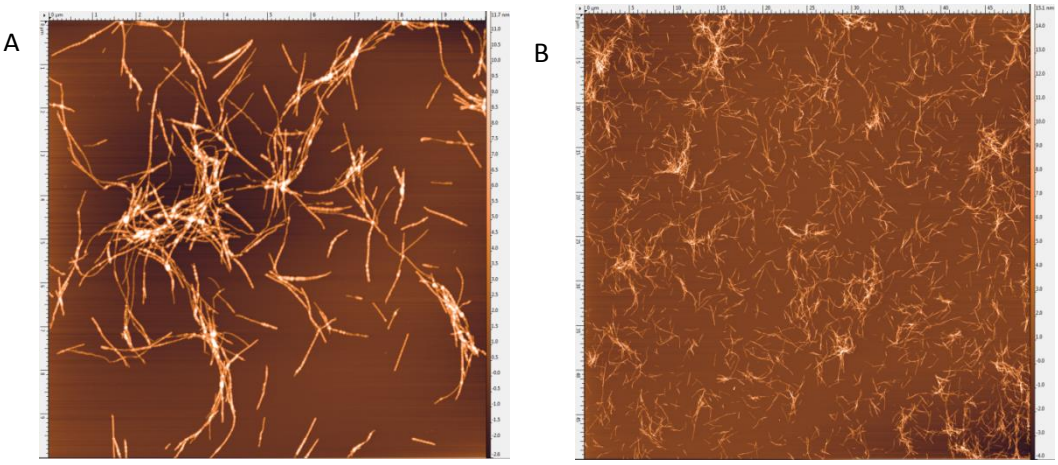

**Figur 9. A) Kopparklorid i monomert insulin (2,0 g/l insulin och 0,6 mM kopparklorid, spädd 100 ggr). 1024p skala 10x10 µm. B) Kopparklorid i monomert insulin (2,0 g/l insulin och 0,6 mM kopparklorid, spädd 10 ggr). 1024p skala 50x50 µm.**

## Fibriller med ThT

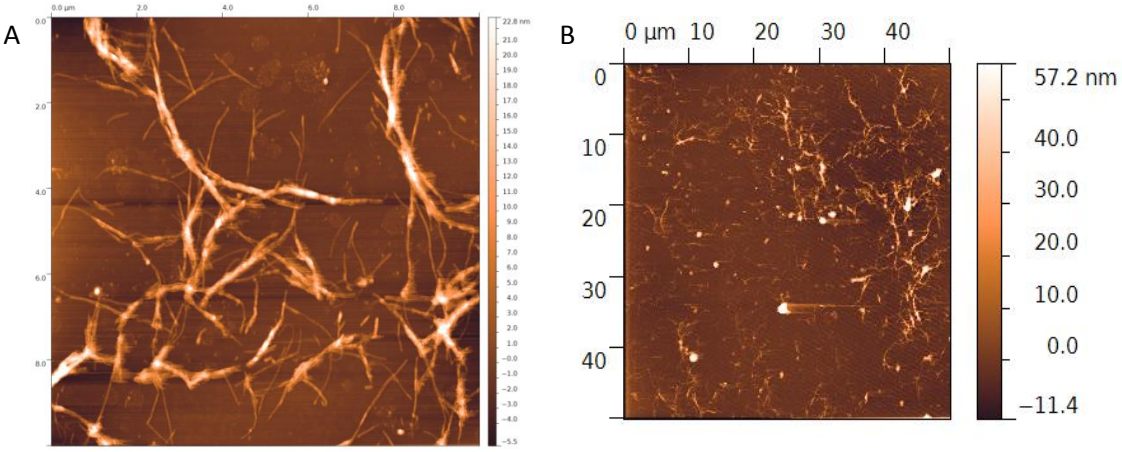



Figur 10. 5,0 µM fibriller och 3,0 µM ThT. 1024p skala 10x10 µm.

## Fibriller med kopparsulfat

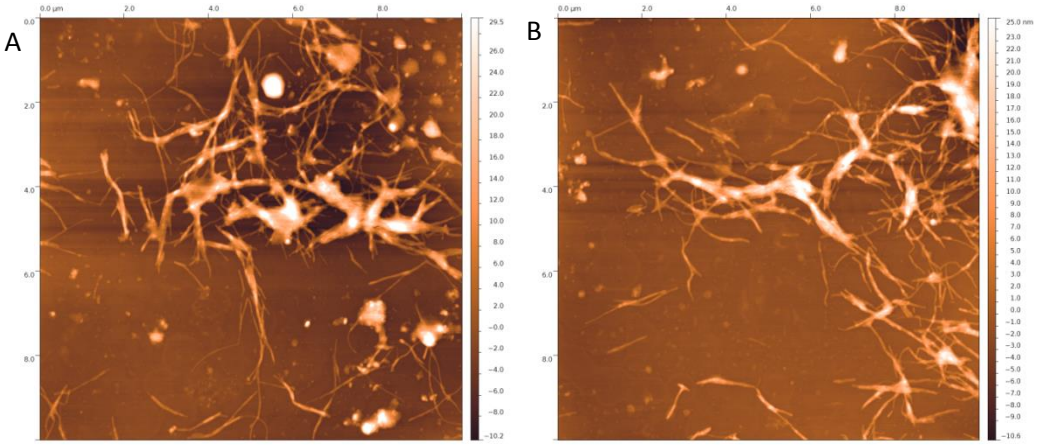



Figur 11. 10 µM fibriller och 0,6 mM kopparsulfat. A) 1024p skala 10x10 µm. B) 1024p skala 50x50 µm.



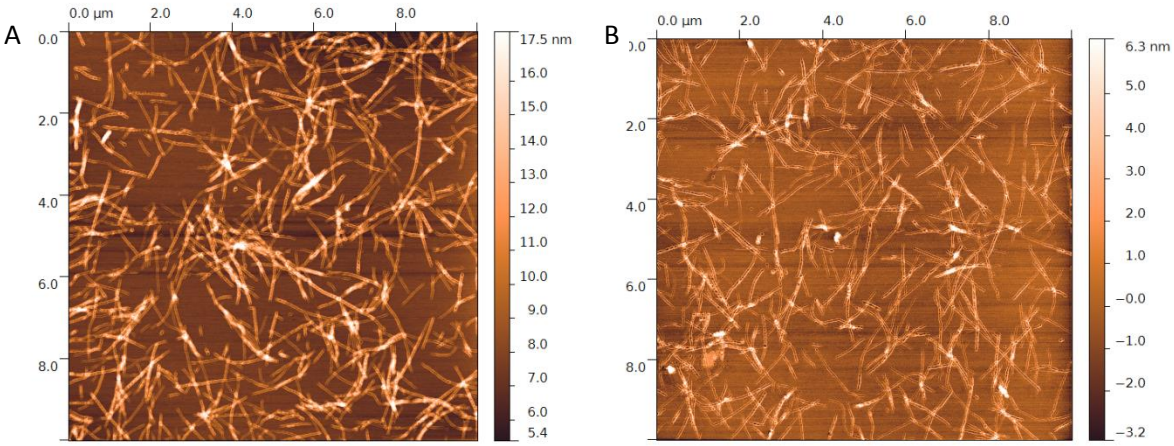

Figur 12. 5,0 µM fibriller och 1,0 mM kopparsulfat. A) 1024p skala 10x10 µm. B) 256p skala 50x50 µm.

## Fibriller med natriumsulfat



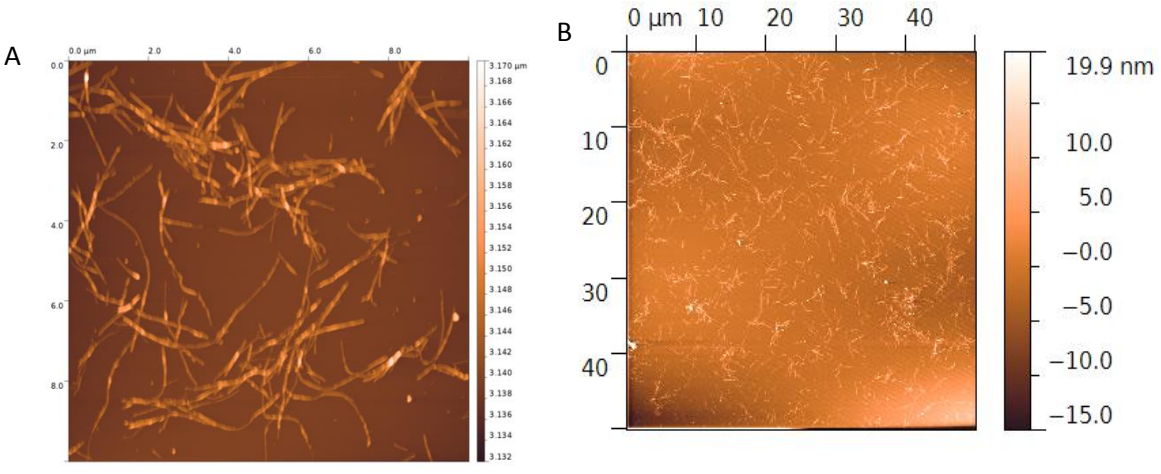

Figur 13. A) och B) 5,0 µM fibriller och 1,0 mM natriumsulfat. 1024p skala 10x10 µm.

## Fibriller med kopparklorid och natriumklorid



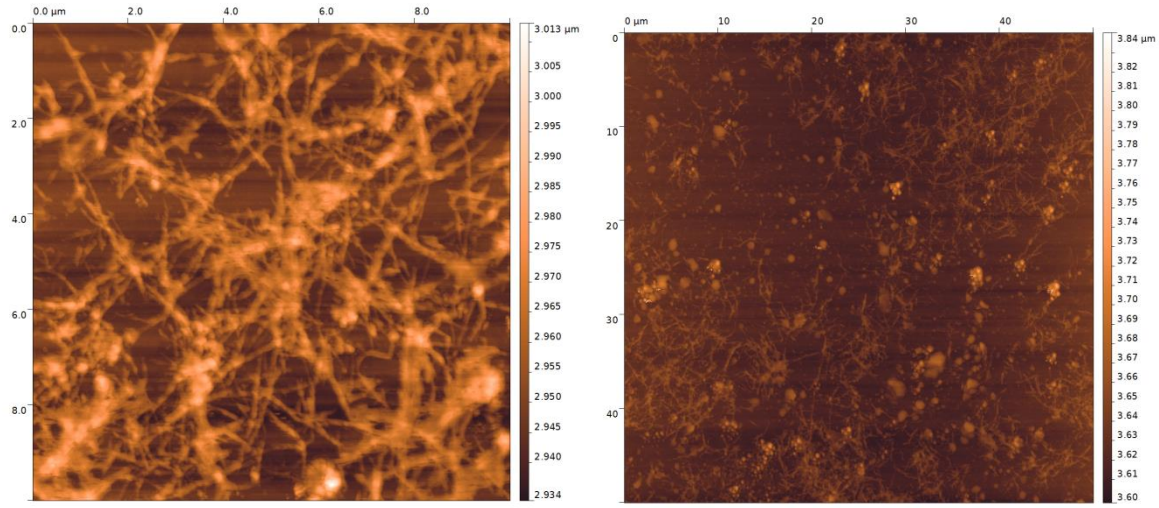

Figur 14. A) 5,0 µM fibriller med 0,3 mM kopparklorid. 512p skala 10x10 µm. B) 5,0 µM fibriller och 0,3 mM natriumklorid. 512p skala 10x10 µm.

## Fibriller med järnnitrat




Figur 15. 5,0 µM fibriller och 2,5 mM järnnitrat. A) 1024p skala 10x10 µm. B) 256p skala 50x50 µm.

## Fibriller med BSA




**Figur 16. 5,0 µM insulinfibriller med 5,0 µM BSA. A) 1024p skala 10x10µm. B) 1024p skala 50x50µm.**