UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja PIRC

# MOLEKULSKI MEHANIZEM VEZAVE $\alpha\text{-}SINUKLEINA$ NA LIPIDNE MEMBRANE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja PIRC

# MOLEKULSKI MEHANIZEM VEZAVE α-SINUKLEINA NA LIPIDNE MEMBRANE

DOKTORSKA DISERTACIJA

# THE MOLECULAR MECHANISM OF α-SYNUCLEIN BINDING TO MODEL LIPID MEMBRANES

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 7.12.2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Podiplomskem študiju bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje Biotehnologija. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrih in za somentorico doc. dr. Lea Pogačnik.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani) ter v laboratorijih Odseka za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo in Odseka za fiziko trdne snovi (Institut Jožef Stefan, Ljubljana). Del raziskav je potekal na Faculty of Pharmacy, University of Lisbon (Lizbona, Portugalska). Raziskave iz tega doktorskega dela so del raziskovalnega programa Biokemijska in biofizikalno-kemijska karakterizacija naravnih snovi (P4-0121) in raziskovalnega projekta Oligomeri amiloidogenih proteinov od a do ž; biofizikalne lastnosti, struktura, funkcija in medsebojne interakcije (J7-4050).

Mentorica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH

Somentorica: doc. dr. Lea POGAČNIK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Gregor ANDERLUH			
	Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo			
Član:	prof. dr. Peter MAČEK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo			
Članica:	izr. prof. dr. Eva ŽEROVNIK Institut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo			

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka: Katja PIRC

# KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 577.24+577.352:616.8(043)=163.6
- KG α-sinuklein / Parkinsonova bolezen / proteini / agregacija / fibrilacija / točkovne mutacije / tirozin / strukturne lastnosti / modelne lipidne membrane / lipidni dvosloj / CD spektroskopija / fluorescenčna anizotropija / diferenčna dinamična kalorimetrija / ureditveni parameter / krvno-možganska pregrada / flavonoidi / nikotin / nevroprotektivnost
- AV PIRC Katja, univ. dipl. mikr.
- SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/ POGAČNIK, Lea (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje Biotehnologija
- LI 2015
- IN MOLEKULSKI MEHANIZEM VEZAVE  $\alpha$ -SINUKLEINA NA LIPIDNE MEMBRANE
- TD Doktorska disertacija
- OP XVII, 127 str., 8 pregl., 60 sl., 8 pril., 356 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- $\alpha$ -Sinuklein je majhen nativno nezviti presinaptični protein, ki ima ključno vlogo pri AI nastanku Parkinsonove bolezni in drugih nevrodegenerativnih stanj. Patogeneza, ki jo povezujejo z  $\alpha$ -sinukleinom, naj bi bila posledica njegove fibrilacije, medtem ko je za njegovo fiziološko funkcijo verjetno najpomembnejša njegova vezava s sinaptičnimi vezikli. Z uporabo nativnega rekombinantnega α-sinukleina in njegovih mutantov Y39A ter Y(125,133,136)A smo preučevali mehanizem fibrilacije in interakcijo tega proteina z lipidnimi membranami. Predvidevamo, da so Tyr ostanki pomembni predvsem pri začetni stopnji fibrilacije, medtem ko se zdi njihova vloga pri interakciji proteina z membrano manj pomembna. Potrdili smo nastanek α-vijačnice ob vezavi  $\alpha$ -sinukleina na negativno nabite majhne enoslojne vezikle v tekoči neurejeni fazi. Nterminalni del se vsaj delno vstavi v membrano. Protein se ni vezal z nevtralnimi lipidi. Poleg elektrostatskih interakciji imajo pri interakciji α-sinukleina z membrano pomembno vlogo tudi hidrofobne interakcije. Mehanizem vezave α-sinukleina na membrano je prvenstveno odvisen od neto naboja lipidnih glav, površinskega naboja lipidnega dvosloja ter faznega stanja, v katerem se lipidi nahajajo. Predvidevamo, da ima α-sinuklein ureditveno funkcijo in termično stabilizira vezikle. Potrdili smo vezavo α-sinukleina z gangliozidom GM1. Pokazali smo tudi, da flavonoidi kvercetin, epigalokatehin galat in cianidin-3-glukozid inhibirajo fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina. Epigalokatehin galat in nikotin učinkovito prečkata model krvno-možganske pregrade in zaščitita kulturo nevronov pred oksidativno poškodbo.

## **KEY WORDS DOCUMENTATION**

- DN Dd
- DC UDC 577.24+577.352:616.8(043)=163.6
- CX α-synuclein / Parkinson's disease / proteins / aggregation / fibrillation / point mutations / tyrosin / structural properties / model lipid membranes / lipid bilayer / CD spectroscopy / fluorescent anisotropy / differential scanning calorimetry / order parameter / blood-brain barrier / flavonoids / nicotin / neuroprotection
- AU PIRC, Katja
- AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)/ POGAČNIK, Lea (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
- PY 2015
- TI THE MOLECULAR MECHANISM OF  $\alpha$ -Synuclein binding to lipid membranes
- DT Doctoral dissertation
- NO XVII, 127 p., 8 tab., 60 fig., 8 ann., 356 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB  $\alpha$ -Synuclein is a small natively unfolded presynaptic protein which is implicated in the onset of Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. It is assumed that  $\alpha$ -synuclein pathogenesis is associated with the process of fibrillation, while for its physiological function, its binding to synaptic vesicles seems to be of most importance. The present study investigates the mechanism of fibrillation and the lipid membrane binding of native recombinant  $\alpha$ -synuclein and their mutants, Y39A and Y(125,133,136)A. We propose that the Tyr residues are important in particular for the early event of fibrillation, while their role in the protein-membrane interactions seems to be less significant. We confirmed the formation of  $\alpha$ -helical structure upon binding of  $\alpha$ -synuclein to the negatively charged small unilamellar vesicles in the liquid disordered phase. N-terminal part of the protein is at least partially inserted into the membrane. This protein did not associate with neutral lipids. These results indicate that in addition to electrostatic interaction, hydrophobic interactions are also important in the association of  $\alpha$ -synuclein with membranes. The mechanism of  $\alpha$ synuclein binding to membrane is primarily dependent on the net charge of lipid heads, surface charge of the lipid bilayer, and the phase state of the lipids. We propose that  $\alpha$ -synuclein has an ordering function and thermally stabilizes vesicles. We have confirmed the binding of  $\alpha$ -synuclein with ganglioside GM1. We have also shown that the flavonoids quercetin, epigallocatechin gallate, and cyanidin-3-glucoside, inhibit α-synuclein fibrillation. Epigallocatechin gallate and nicotine are efficient in crossing the blood-brain barrier model and protect the neuron culture against oxidative damage.

#### **KAZALO VSEBINE**

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA KEY WORDS DOCUMENTATION KAZALO VSEBINE	III IV V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK KAZALO PRILOC	
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ODKRITJE $\alpha$ -SINUKLEINA	3
2.2 α-SINUKLEIN IN PARKINSONOVA BOLEZEN	3
2.2.1 Parkinsonova bolezen je tipična sinukleinopatija	3
2.2.2 Patogeneza α-sinukleina	4
2.2.2.1 Dokazi za vpletenost $\alpha$ -sinukleina v patogenezo Parkinsonove bolezni	4
2.2.2.2 $\alpha$ -Sinukiem in cenera sinit 2.3 LOKACHA IN FUNKCHA $\alpha$ -SINUKI FINA	4
2.5 LOKACIJA INTONKCIJA $\alpha$ -SINOKLEJINA 2.4 STDI JETI IDNE ZNAČIJI NOSTI IN KONEODMACIJA, $\alpha$ SINIJEJI EINA	0
2.4 STRUKTURNE ZNACILNUSTTIN KONFORMACIJA U-SINUKLEINA 2.4 1 Primarna zgradba g-sinukleina	9
2.4.2 Nativna struktura $\alpha$ -sinukleina	11
2.4.2.1 $\alpha$ -Sinuklein je nativno nezviti protein	11
2.4.2.2 Daljnosežne interakcije v molekuli α-sinukleina	12
2.4.2.3 Neurejeni monomer ali urejeni oligomer?	13
2.5 FIBRILACIJA α-SINUKLEINA	14
2.5.1 Mehanizem fibrilacije	14
2.5.2 Struktura in polimorfizem oligomerov in fibril	15
2.5.3 Vpliv različnih faktorjev na fibrilacijo	16
2.5.3.1 Vpliv daljnosežnih interakcij na fibrilacijo	17
2.5.3.2 Vpliv tirozinskih ostankov na fibrilacijo	18
2.6 α-SINUKLEIN IN LIPIDNE MEMBRANE	18
2.6.1 Modelne lipidne membrane	19
2.6.2 Značilnosti interakcije med α-sinukleinom in lipidnimi membranami	20
2.6.2.1 Vpliv različnih faktorjev na interakcijo med $\alpha$ -sinukleinom in membranami	21
2.6.2.2 Vloga N-terminalnega dela pri vezavi na membrano	24
2.6.3 Struktura membransko vezanega $\alpha$ -sinukleina	24
2.6.3.1 11/3 periodicnost $\alpha$ -vijacnice	26
2.0.3.2 INIVIR SITUKIUFA (I-SITUKIETA) VEZATEGA NA MICEI	26
2.0.3.5 v czava u-sinukienia na vezikie, prekinjena an izieglijena u-vijacinca?	21
2.6.3.4 Matnie membrane	20 20
$2.6.5$ Interakcija $\alpha$ -sinukleina z gangliozidi	30
	21
2.7 INTIDICIJA FIBKILACIJE (I-SINUKLEINA IN ZASULA NEVKONOV	31

2.7.1 Problematika zdravljenja Parkinsonove bolezni 2.7.2 Majhne naravne spojine kot inhibitorji patogeneze Parkinsonove bolezni	31 32
3 MATERIAL IN METODE	35
3.1 MATERIAL	35
3.2 PRIPRAVA REKOMBINANTNIH PROTEINOV	38
3.2.1 Priprava bakterijskega ekspresijskega sistema za WT in mutirani α-sinuklein	38
3.2.1.1 Transformacija kompetentnih celic	38
3.2.1.2 Izolacija plazmidne DNA	38
3.2.1.3 Restrikcijsko rezanje DNA	38
3.2.1.4 Agarozna gelska elektroforeza	38
3.2.1.5 Osmerjena mutageneza 3.2.1.6 Preverianje zaporedia a-sinukleinskega inserta	30
3.2.1.7 Traine kulture bakterijskih celic	39
3.2.2 Izolacija proteinov	39
3.2.2.1 Izražanje proteinov	39
3.2.2.2 Čiščenje proteinov	39
3.2.2.3 Potrditev molekulske mase izoliranih proteinov	40
3.3 PRIPRAVA PROTEINOV ZA EKSPERIMENTE	40
3.3.1 Raztapljanje proteinov	40
3.3.2 Določanje koncentracije proteinov	40
3.4 KARAKTERIZACIJA PROTEINOV	40
3.4.1 Napoved težnje proteinov k agregaciji	41
3.4.2 Kemično povezovanje proteinov	41
3.4.3 NaDS-PAGE elektroforeza	41
3.4.4 Oltracentrilugiranje	42
3.5 FIBRILACIJA PROTEINOV	42
3.5.1 v piiv 1 yr→Ala mutacij na librilacijo α-sinukleina 3.5.2 Inhibicija fibrilacija	42
3.6 MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO	<b>4</b> 3
3 7 PRIDRAVA MODELNIH I IDIDNIH MEMBRAN	14
371 Prinrava MLV	44
3.7.2 Priprava SUV	45
3.7.3 Priprava veziklov s kalceinom	45
3.8 FLUORESCENČNA SPEKTROSKOPIJA	45
3.8.1 Fluorescenca ANS	45
3.8.2 Fluorescenca ThT	46
3.8.3 Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov	46
3.8.4 Fluorescenčna anizotropija DPH in TMA-DPH	47
3.9 CIRKULARNI DIHROIZEM	48
3.10 DIFERENCNA DINAMICNA KALORIMETRIJA	49
3.11 PREHOD SKOZI KRVNO-MOŽGANSKO PREGRADO IN ZAŠČITA NEVRONOV	50
3.11.1 Celična kultura in vzdrževanje	51
3.11.1.1 Celična linija HBMEC	51
3.11.2 Primarna kultura nevronov	51
3.11.4 MELA allaliza izbralili spojili 3.11.3 Transnort skozi model krvno-možganske pregrade	51
3.11.3.1 Ovrednotenie integritete celic HBMEC	53
3.11.3.1.1 Meritye TEER	53
3.11.3.1.2 Permeabilnost Na-F	53
3.11.3.2 Privzem izbranih spojin v celice	54
3.11.4 Določitev zaščitnega učinka na nevrone	54
3.11.4.1 Določitev nekroze in apoptoze	54

3.11.5 Statistična analiza podatkov	55
3.12 DOLOČITEV ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI	55
3.12.1 Antioksidativna učinkovitost v standardnih raztopinah	55
3.12.2 Antioksidativna učinkovitost v celičnem mediju	55
4 REZULTATI	57
4.1 PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA α-SINUKLEINA	57
4.2 KARAKTERIZACIJA PROTEINOV	58
4.2.1 Določitev sekundarne strukture proteinov	58
4.2.2 Analiza z algoritmom TANGO	58
4.2.5 Kemicno povezovanje proteinov z glutaraldenidom 4.2.4 Ultracentrifugiranje	00 61
4.2.5 ANS fluorescenca	62
4.3 FIBRILACIJA α-SINUKLEINA	62
4.3.1 ThT fluorescenca	62
4.3.2 NaDS-PAGE elektroforeza	63
4.3.3 ANS fluorescenca	64
4.5.4 Morrologija agregatov	05
4.4 INTERAKCIJA α-SINUKLEINA Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI	67
4 4 1 1 Temperaturno območie faznega prehoda SUV	67
4.4.2 Sekundarna struktura $\alpha$ -sinukleina po vezavi na lipidne vezikle	68
4.4.3 Vpliv α-sinukleina na ureditev lipidnega dvosloja	75
4.4.4 Permeabilizacija veziklov	80
4.4.5 Spremljanje faznih prehodov liposomov ob dodatku $\alpha$ -sinukleina	81
4.4.0 Interakcija u-sinukiema z gangnoziui	<b>0</b> 3
4.5 INHIBICIJA FIBRILACIJE U-SINUKLEINA	85
4.6 PREHUD SKUZI KRVNU-MUZGANSKU PREGRADU IN ZASCITA NEVRUNUV	8/ 88
4.6.2 Transport izbranih spojin skozi krvno-možgansko pregrado	89
4.6.3 Celični privzem izbranih spojin	91
4.6.4 Zaščitni učinek izbranih spojin na nevrone	91
5 RAZPRAVA	94
5.1 IZOLACIJA PROTEINOV	94
5.2 ZAČETNO STANJE $\alpha$ -SINUKLEINA V RAZTOPINI	94
5.3 VLOGA TYR V FIBRILACIJI α-SINUKLEINA	96
5.4 INTERAKCIJA $\alpha$ -SINUKLEINA Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI	98
5.4.1 Vpliv lipidne membrane na strukturo α-sinukleina	<b>98</b>
5.4.2 V pliv a-sinukleina na lastnosti membrane 5.4.3 Pomen tirozinskih ostankov za interakcijo a-sinukleina z membrano	100
5.4.4 Interakcija α-sinukleina z gangliozidi	103
5.5 INHIBICIJA FIBRILACIJE α-SINUKLEINA IN ZAŠČITA NEVRONOV	105
6 SKLEPI	108
7 POVZETEK (SUMMARY)	109
7.1 POVZETEK	109
7.2 SUMMARY	110
8 VIRI	112

ZAHVALA PRILOGE

## **KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Najpomembnejše uporabljene kemikalije z navedbo proizvajalca
Preglednica 2: Sestava raztopin in gojišč
Preglednica 3: Najpomembnejša laboratorijska oprema
Preglednica 4: Pogoji HPLC-analize vzorcev
Preglednica 5: Fluorescenčni ANS-profili inkubiranih proteinov65
Preglednica 6: Termodinamski profili faznih prehodov multilamelarnih veziklov v prisotnosti in brez α- sinukleina
Preglednica 7: Antioksidativna učinkovitost (AOU) izbranih spojin
Preglednica 8: Celični privzem izbranih spojin v celice HBMEC po 1 h inkubaciji

str.

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1	: Molekularni in celični procesi povezani z α-sinukleinom in Parkinsonovo boleznijo (Shvadchak in sod., 2011a)
Slika 2:	: Domnevna vloga α-sinukleina v regulaciji prenosa nevrotransmiterja (Deleersnijer in sod., 2013)8
Slika 3	: Aminokislinsko zaporedje človeškega α-sinukleina (prirejeno po Pirc in Ulrih, 2011)10
Slika 4	: Strukture nativnega monomernega α-sinukleina. (A) Poravnava vseh struktur v skupini različnih konformacijskih stanj α-sinukleina (Ullman in sod., 2011). (B) Konformacije α-sinukleina - študije z NMR (Bertoncini in sod., 2005)
Slika 5:	: Tvorba amiloidnih fibril preko nukleacijske polimerizacije (Butterfield in Lashuel, 2010)15
Slika 6	: Domnevna ureditev fibril α-sinukleina (Vilar in sod., 2008)16
Slika 7:	: Strukture lipidnih in membranskih modelov (Pfefferkorn in sod., 2012)
Slika 8	: Strukture membransko-vezanega α-sinukleina. Sekundarna struktura α-sinukleina ob vezavi na micel NaDS (model prekinjene vijačnice) (Ulmer in sod., 2005) in SUV (model iztegnjene vijačnice) (Jao in sod., 2008)
Slika 9	: Vijačno kolo α-sinukleina (Bendor in sod., 2013)
Slika 10	0: Struktura gangliozidov GM1 in GM3
Slika 1	1: Shema poteka poskusov
Slika 12	2: Struktura kemičnega povezovalca glutaraldehida41
Slika 1.	3: Strukturne formule izbranih spojin
Slika 14	4: Osnovni sestavni deli mikroskopa na atomsko silo43
Slika 1:	5: Strukturne formule uporabljenih fosfolipidov44
Slika 1	6: Strukturni formuli ANS in ThT46
Slika 1'	7: Strukturni formuli DPH in TMA-DPH
Slika 1	8: Prikaz ene vdolbinice posebne gojiščne plošče z 12 vdolbinicami
Slika 1	9: Kromatogram vzorca divjega tipa α-sinukleina po ionsko-izmenjevalni kromatografiji na koloni monoQ 4.6/100 PE
Slika 20	0: Analiza proteinskega vzorca z NaDS-PAGE pred dializo in v supernatantu po dializi
Slika 2	1: CD spektri divjega tipa α-sinukleina (WT) in mutantov (Y39A in Y(125,133,136)A) pri različnih temperaturah
Slika 2	2: Delež sekundarne strukture α-vijačnice divjega tipa (WT) α-sinukleina in mutantov (Y39A in Y(125,133,136)A) pri različnih temperaturah

Slika 23: Napoved β-agregacijskih regij divjega tipa (WT) α-sinukleina in mutantov (Y39A in Y(125,133,136)A) z algoritmom TANGO
Slika 24: NaDS-PAGE ne-povezanega (A) in povezanega α-sinukleina (B)60
Slika 25: Optimizacija povezovanja proteinov z glutaraldehidom61
Slika 26: NaDS-PAGE α-sinukleina po ultracentrifugiranju61
Slika 27: Izpostavljenost hidrofobnih regij divjega tipa (WT) α-sinukleina in mutantov (Y39A in Y(125,133,136)A) merjena z ANS fluorescenco
Slika 28: Fibrilacijski profili divjega tipa (WT) α-sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A merjeni s ThT fluorescenco
Slika 29: NaDS-PAGE kemično ne-povezanega in povezanega divjega tipa (WT) α-sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A v supernatantu po 3 dnevni (A) in 8 dnevni inkubaciji (B)64
Slika 30: ANS-spektri inkubiranih proteinov (divji tip (WT) ter mutanta Y39A in Y(125,133,136)) posneti v različnih časovnih obdobjih
Slika 31: AFM slike agregiranih proteinov po 3-dnevni (A) in 8-dnevni inkubaciji (B)66
Slika 32: DSC termogrami SUV pripravljenih iz DPPC, DPPG in DPPC:DPPG 1:1 v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0
Slika 33: CD spektri divjega tipa (WT) α-sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPC
Slika 34: CD spektri divjega tipa (WT) α-sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz POPC
Slika 35: CD spektri divjega tipa (WT) α-sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPG
Slika 36: CD spektri divjega tipa (WT) α-sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz POPG
Slika 37: CD spektri divjega tipa (WT) α-sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPC:DPPG 1:1
Slika 38: CD spektri divjega tipa α-sinukleina pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPC:DPPG 1:2
Slika 39: CD spektri divjega tipa proteina brez veziklov in v prisotnosti veziklov (SUV) različne sestave pri T = 55 °C. Spektra POPC in POPG veziklov sta posneta pri 45 °C
Slika 40: Povprečna molarna eliptičnost aminokislinskega ostanka proteinov pri 220 nm ([θ] <sub>220</sub> ) pri različnih temperaturah (T) brez veziklov in v prisotnosti veziklov (SUV) različne sestave, kot je označeno na sliki
Slika 41: Povprečna molarna eliptičnost aminokislinskega ostanka proteinov pri 220 nm ( $[\theta]_{220}$ ) pri različnih temperaturah (T) brez veziklov in v prisotnosti veziklov (SUV) iz DPPG, DPPC:DPPG 1:1 in POPG.

Slika 42: Delež (v odstotkih) α-vijačnice divjega tipa (WT) α-sinukleina in mutantov Y39A in Y(125,133, 136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov (SUV) različne sestave, kot je označeno na sliki
Slika 43: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji DPPC veziklov z divjim tipom $\alpha$ -sinukleina77
Slika 44: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji POPC veziklov z divjim tipom $\alpha$ -sinukleina77
Slika 45: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji DPPG veziklov z divjim tipom $\alpha$ -sinukleina78
Slika 46: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji POPG veziklov z divjim tipom $\alpha$ -sinukleina78
Slika 47: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji DPPC:DPPG 1:1 veziklov z divjim tipom α- sinukleina
Slika 48: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji DPPC:DPPG 1:1 veziklov z α-sinukleinom Y39A
Slika 49: Kinetika sproščanja kalceina iz 130 μM POPG SUV po dodatku divjega tipa α-sinukleina (R = 10, 100, 500)
Slika 50: Sproščanje kalceina iz SUV različne sestave po 20 min inkubaciji z divjim tipom (WT) α-sinukleina, mutantom Y39A ali Y(125,133,136)A81
Slika 51: DSC termogrami multilamelarnih veziklov brez in v prisotnosti α-sinukleina, posneti v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0
Slika 52: CD spektri divjega tipa (WT) α-sinukleina in mutanta Y39A posneti v daljnem UV-območju v prisotnosti DPPC:GM1 2:1 in DPPC:GM3 2:1 SUV
Slika 53: CD spektri divjega tipa (WT) α-sinukleina in mutanta Y39A posneti v daljnem UV-območju v prisotnosti DPPG:GM1 2:1 in DPPG:GM3 2:1 SUV
Slika 54: Sproščanje kalceina iz SUV sestavljenih iz DPPG:GM1 2:1 ali DPPG:GM3 2:1 po 20 min inkubaciji z divjim tipom α-sinukleina
Slika 55: Vpliv izbranih spojin na kinetiko fibrilacije α-sinukleina
Slika 56: NaDS-PAGE kemično ne-povezanega in povezanega α-sinukleina brez ali z dodanimi izbranimi spojinami. (A) NaDS-PAGE proteinskih vzorcev pred 5-dnevno inkubacijo. (B) NaDS-PAGE supernatanta centrifugiranih proteinskih vzorcev po končani 5-dnevni inkubaciji
Slika 57: Časovna odvisnost antioksidativne učinkovitosti (AOU) izbranih spojin v Ringer-HEPES pH 7,4 in v mediju Neurobasal
Slika 58: Časovna odvisnost koncentracije izbranih spojin v Ringer-HEPES pH 7,4 in mediju Neurobasal89
Slika 59: Časovna odvisnost transporta izbranih spojin skozi celice linije HBMEC90
Slika 60: Učinek izbranih spojin na zaščito nevronov v pogojih oksidativno-inducirane nekrozi-podobne in apoptozi-podobne celične smrti

#### **KAZALO PRILOG**

- Priloga A: Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji DPPC veziklov z divjim tipom α-sinukleina.
- Priloga B: Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji POPC veziklov z divjim tipom α-sinukleina.
- Priloga C: Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji DPPG veziklov z divjim tipom α-sinukleina.
- Priloga D: Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji POPG veziklov z divjim tipom α-sinukleina.
- Priloga E: Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji DPPC:DPPG 1:1 veziklov z divjim tipom α-sinukleina.
- Priloga F: Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji DPPC:DPPG 1:1 veziklov z α-sinukleinom Y39A.
- Priloga G: Vrednosti trans-endotelijske električne upornosti monosloja HBMEC po inkubaciji z izbranimi spojinami v različnih časovnih periodah.
- Priloga H: Vrednosti trans-endotelijske permeabilnosti monosloja HBMEC po inkubaciji z izbranimi spojinami v različnih časovnih periodah.

# OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

arbitrarne enote
Alzheimerjeva bolezen (ang. Alzheimer's disease)
mikroskopija na atomsko silo (ang. atomic force microscopy)
aminokislina
ang. amphipathic lipid-packing sensor motifs
antioksidativna učinkovitost
enota absorbance
absorbanca pri valovni dolžini x
krvno-možganska pregrada (ang. blood-brain barrier)
goveji serumski albumin
cianidin-3-glukozid
karbenicilin
cirkularni dihroizem
komplementarna DNA
kontrola
Dalton
ang. double electron-electron resonance
celični medij Dulbelco's Modified Eagle Medium
dimetil sulfoksid
1,6-difenil-1,3,5-heksatrien
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoholin
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. differental scanning calorimetry)
dvojno verižna DNA
ditiotreitol
Escherichia coli
epigalokatehin galat
elektronska paramagnetna resonanca
serum govejega zarodka
fluorescenčna korelacijska spektroskopija
tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov pod zvišanim tlakom
prenos energije z resonanco fluorescence
infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
gravitacijski pospešek
vezikli celičnih velikosti
človeške možganske mikrovaskularne endotelijske celice
raztopina Hank's balanced salt solution (-1: s Ca in Mg; -2: brez Ca in Mg)
4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina

HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
kalcein	fluorescein-metilen-iminodiocetna kislina
KRM	kontrolna raztopina medija
LB-medij	Luria-Bertanijev medij
LN	Levijevi nevriti
LT	Levijeva telesca
LUV	veliki unilamelarni vezikli
М	molarnost, molarna koncentracija (mol/l)
MALDI	ionizacija v nosilcu z lasersko desorpcijo
MEM	minimalni esencialni medij
miliQ	deionizirana voda
MLV	multilamelarni lipidni vezikli
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektroskopija
MWCO	izključitvena molekulska masa
Ν	nikotin
NAC	ne-amiloid β komponenta AD
NACP	NAC prekurzorski protein
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
Na-F	natrijev fluorescein
NEAA	neesencialne AK
NMR	jedrska magnetna resonanca
PA	fosfatidna kislina
PBS	fosfatni pufer s slanico
PC	fosfatidil holin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PD	Parkinsonova bolezen (ang. Parkinson's disease)
PDB	zbirka proteinskih struktur (ang. Protein Data Bank)
Pe	endotelijska permeabilnost
PE	fosfatidil etanolamin
PG	fosfatidil glicerol
pI	izoelektrična točka
PI	fosfatidil inozitol
PJ	propidijev jodid
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholin
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol
PS	fosfatidil serin
Q	kvercetin

R	molarno razmerje med lipidi in proteinom
ROS	reaktivni kisikovi radikali
rpm	število obratov na minuto
RPMI	osnovni medij Roswell Park Memorial Institute
S	ureditveni parameter
SAXS	X-žarkovno sipanje pod majhnim kotom
SD	standardna deviacija
SEC	gelska kromatografija (ang. size exclusion cromatography)
smFRET	metoda prenosa energije z resonanco fluorescence
SNARE	ang. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor
SUV	majhni unilamelarni vezikli
TAE	Tris-acetatni pufer
TEAC	Troloxu-ekvivalentna antioksidativna kapaciteta
TEER	transendotelijska električna upornost
ThT	tioflavin T
T <sub>m</sub>	temperatura taljenja
TMA-DPH	trimetilamonij-6-fenil-1,3,5-heksatrien
TOF	analizator na čas preleta ionov
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
Triton X-100	oktilfenol-polietilenglikol eter
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina
v/v	razmerje volumen/volumen
w/v	razmerje masa/volumen
WT	divji tip (ang. wild type)
3	ekstincijski koeficient

# Okrajšave za aminokisline

aminokislina	tričrkovna oznaka	enočrkovna oznaka
alanin	Ala	А
arginin	Arg	R
asparagin	Asn	Ν
asparaginska kislina	Asp	D
cistein	Cys	С
fenilalanin	Phe	F
glicin	Gly	G
glutamin	Gln	Q
glutaminska kislina	Glu	Е
histidin	His	Н
izolevcin	Ile	Ι
levcin	Leu	L
lizin	Lys	Κ
metionin	Met	М
prolin	Pro	Р
serin	Ser	S
tirozin	Tyr	Y
treonin	Thr	Т
triptofan	Trp	W
valin	Val	V

## 1 UVOD

Amiloidne bolezni (amiloidoze) predstavljajo obsežno skupino bolezni, pri katerih se agregirani proteini odlagajo v različnih organih. V skupino sinukleinopatij uvrščamo številne nevrodegenerativne amiloidoze, med katerimi je najpogostejša in poznana Parkinsonova bolezen; zanjo je značilno odmiranje dopaminergičnih nevronov. Za sinukleinopatije so značilna patološka celična inkluzijska telesca, v katerih je glavna komponenta agregirani protein  $\alpha$ -sinuklein. Vzrok za nastanek Parkinsonove bolezni je še vedno nepojasnjen, predvidevajo pa, da ključni korak v etiologiji bolezni predstavlja fibrilacija  $\alpha$ -sinukleina.

 $\alpha$ -Sinuklein je majhen nativno nezviti protein, ki se nahaja predvsem v možganih. Zanj je značilna izjemna strukturna plastičnost, saj lahko v odvisnosti od okoljskih pogojev zavzame številne različne konformacije. Kljub intenzivnim raziskavam ostajata fiziološka kot tudi patološka vloga  $\alpha$ -sinukleina še vedno nepojasnjeni. Predvidevajo pa, da ima pri obeh pomembno vlogo interakcija proteina s celičnimi membranami (Pffeferkorn in sod., 2012; Auluck in sod., 2010; Pirc in Ulrih, 2011). Naravna funkcija proteina naj bi tako vključevala vezavo s sinaptičnimi vezikli in naj bi bila povezana z njihovo regulacijo in transportom. Za nevrotoksičnost naj bi bile odgovorne predvsem agregirane zvrsti proteina. Tako so patologijo  $\alpha$ -sinukleina sprva pripisovali citosolnim filamentoznim inkluzijam, medtem ko raziskave zadnjih let kažejo, da naj bi bili toksični predvsem oligomeri  $\alpha$ -sinukleina, ki lahko tvorijo membranske pore.

Interakcije z membranami verjetno predstavljajo enega izmed najspornejših področij v preučevanju  $\alpha$ -sinukleina (Fink, 2006; Pffeferkorn in sod., 2012), saj številne raziskave poročajo včasih celo o popolnoma nasprotujočih si rezultatih, poleg tega pa morda obstajajo velike razlike med situacijo *in vitro* in *in vivo*. Trenutno je splošno sprejeto mnenje, da se  $\alpha$ -sinuklein preferenčno veže z majhnimi unilamelarnimi vezikli, ki vsebujejo negativno nabite polarne glave ali strukturne nepravilnosti, in da po vezavi zavzame strukturo  $\alpha$ -vijačnice. Tako kot na fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina, tudi na njegovo interakcijo z lipidi vplivajo številni faktorji, pri asociaciji pa naj bi bile pomembne tako elektrostatske kot hidrofobne interakcije.

Etiologija Parkinsonove bolezni je povezana tudi z oksidativnim stresom. Spojine, ki inhibirajo fibrilacijo proteina in obenem kažejo antioksidativne lastnosti, so tako še posebej zanimive pri razvoju novih terapevtikov.

#### 1.1 NAMEN DELA

Od prvega odkritja povezave med  $\alpha$ -sinukleinom in Parkinsonovo boleznijo leta 1997 (Polymeropoulos in sod., 1997; Spillantini in sod., 1997) pa do danes so s številnimi raziskavami poskušali določiti tako naravno funkcijo kot mehanizme patološkega delovanja  $\alpha$ -sinukleina. Natančno poznavanje fiziološke in patološke vloge  $\alpha$ -sinukleina je nujno za načrtovanje novih farmacevtskih sredstev, ki bi zmanjšala pojav sinukleinopatij pri vse večjem deležu starejšega prebivalstva. Mehanizem vezave  $\alpha$ -sinukleina na lipidne membrane še ni znan. Prav tako še ne razumemo natančnega mehanizma fibrilacije tega proteina. Štirje Tyr-ostanki v  $\alpha$ -sinukleinu so razporejeni v obeh strukturno raznolikih regijah proteina. Usmerjena mutageneza je ena od možnosti za preučevanje proteinske zgradbe in njihove funkcije. Nadzorovane zamenjave AK nam lahko veliko povedo o strukturi in funkciji preučevanega proteina. V doktorskem delu bomo zato tudi s pomočjo uporabe izbranih mutantov Tyr $\rightarrow$ Ala skušali preučiti interakcijo  $\alpha$ -sinukleina z lipidnimi membranami. Pričakujemo, da bomo z raziskavami doprinesli k razumevanju mehanizma vezave  $\alpha$ -sinukleina na membrane. To naj bi pripomoglo tako k pojasnitvi fiziološke funkcije proteina, kot tudi k razumevanju potencialne vloge membrane pri patogenezi proteina. Preučili bomo tudi vpliv ostankov Tyr na fibrilacijo proteina. V zadnjem času se vse več raziskav usmerja v iskanje majhnih naravnih molekul, ki bi lahko inhibirale ta proces. V ta namen bomo preverili tudi inhibitorni učinek določenih molekul na fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina, kot tudi njihovo učinkovitost pri prehajanju krvno-možganske pregrade in zaščiti nevronov pred induciranim oksidativnim stresom.

#### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Preverjali smo naslednje delovne hipoteze:

- $\circ$  Interakcija in/ali vgradnja α-sinukleina in izbranih mutantov Tyr→Ala v lipidne vezikle je odvisna tako od površinskega naboja kot tudi od faznega stanja membrane.
- $\circ$   $\alpha$ -Sinuklein se z N-terminalnim delom veže na negativno nabite vezikle, kar inducira njegov prehod iz neurejene v strukturo  $\alpha$ -vijačnice.
- $\circ$  N-terminalni del α-sinukleina se po vezavi na vezikle vstavi v membrano.
- Poleg elektrostatskih interakcij imajo pri vezavi α-sinukleina na membrano vlogo tudi hidrofobne interakcije.
- Tyr ostanki, od katerih se Y39 nahaja v N-terminalni regiji in Y125, Y133 ter Y136
  v C-terminalni regiji, imajo pomembno vlogo pri interakciji α-sinukleina z membrano.
- o α-Sinuklein se specifično veže na gangliozide.
- o α-Sinuklein ob vezavi na membrano povzroči tvorbo por.
- $\circ$  Določene fenolne spojine inhibirajo proces fibrilacije α-sinukleina *in vitro*, kar bi lahko zmanjšalo citotoksičnost α-sinukleina v nevroblastomskih celicah.

Tekom raziskovalnega dela smo postavili še dve dodatni hipotezi:

- o Tyr ostanki imajo pomembno funkcijo pri fibrilaciji α-sinukleina.
- $\circ$  Nekatere spojine, ki inhibirajo fibrilacijo α-sinukleina *in vitro*, prehajajo skozi modelno krvno-možgansko pregrado in zaščitijo nevrone pred induciranim oksidativnim stresom.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ODKRITJE α-SINUKLEINA

α-Sinuklein je zelo ohranjen presinaptični protein z neznano fiziološko funkcijo, ki ga skupaj z β-sinukleinom in γ-sinukleinom uvrščamo v sinukleinsko proteinsko družino. To so majhni vodotopni proteini, ki so značilni za vretenčarje, in ki se večinoma izražajo v živčnem tkivu in nekaterih tumorjih (George, 2002).

α-Sinuklein je neodvisno odkrilo več raziskovalnih skupin. Prvič so z imenom *sinuklein* poimenovali protein izoliran iz presinaptičnih terminalov in jedra nevronov električnega skata *Torpedo californica* (Maroteaux in sod., 1988). Iz amiloidnih plakov bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo (ang. Alzheimer's disease; AD) so nato izolirali 35-AK peptid, sedaj poimenovan NAC (ang. <u>non-amyloid-β component of AD</u>), in ugotovili, da izhaja iz večjega 140-AK prekurzorskega proteina NACP (NAC prekurzor) (Ueda in sod., 1993). Druga skupina je v kanarčku odkrila homolog NACP in ga poimenovala sinelfin (George in sod., 1995). Končno je postalo jasno, da so sinuklein, NACP in sinelfin homologni proteini in tako poimenovani **α-sinuklein**.

Zanimanje za  $\alpha$ -sinuklein se je močno povečalo leta 1997, ko so odkrili, da je mutacija v  $\alpha$ sinukleinskem genu povezana z družinskim primerom zgodnjega pojava Parkinsonove bolezni (ang. Parkinson's disease; PD) (Polymeropholous in sod., 1997), in ko so našli agregiran  $\alpha$ -sinuklein v možganih obolelih ljudi (Spillantini in sod., 1997).

#### 2.2 α-SINUKLEIN IN PARKINSONOVA BOLEZEN

#### 2.2.1 Parkinsonova bolezen je tipična sinukleinopatija

Parkinsonova bolezen ie Alzheimerjevo boleznijo druga najpogostejša za nevrodegenerativna bolezen, ki prizadene več kot 1 % populacije nad 65 letom starosti (Goedert, 2001; Goedert in sod., 2013). Za PD je značilno odmiranje nevronov, ki se nahajajo predvsem v možganskem predelu substantia nigra. Postopna degradacija teh nevronov zmanjša količino dopamina, kar vodi v pojav značilnih simptomov, kot so tresenje, počasni gibi, težave z natančno motoriko ter izguba posturalnih refleksov (Jankovic, 2008). Poleg izgube nevronov so za PD značilne citosolne inkluzije v nekaterih preživelih nevronih. Te proteinske odlage imenujemo Lewyeva telesca (LT) in Lewyevi nevriti (LN), njihova glavna komponenta pa so amiloidni agregati  $\alpha$ -sinukleina (Uversky in Eliezer, 2009).

α-Sinuklein ni vpleten le v patogenezo PD, ampak ga povezujejo s heterogeno skupino nevrodegenerativnih bolezni, imenovano **sinukleinopatije**. Takšne patologije so na primer še demenca z LT in multipla sistemska atrofija (Spillantini in sod., 1998a). Vse to so možganske amiloidne bolezni, pri katerih se v določenih nevronih in celicah glie kopičijo netopne fibrile α-sinukleina (Spillantini in sod., 1997; Spillantini in sod., 1998b). Kljub številnim raziskavam še ni znano, kako agregacija α-sinukleina prispeva k nevrodegeneraciji (Lashuel in sod., 2013).

PD uvrščamo med starostne bolezni, saj je večina primerov obolenj poznega idiopatskega tipa (Beyer, 2007). Bolezen ostaja neozdravljiva predvsem zaradi nepoznavanja vzrokov zanjo, poleg tega pa več dokazov kaže na multifaktorsko etiologijo, ki poleg staranja vključuje genetsko predispozicijo ter izpostavljenost okoljskim toksinom in oksidativnemu stresu (Fink, 2006; Silva in sod., 2012).

#### 2.2.2 Patogeneza α-sinukleina

2.2.2.1 Dokazi za vpletenost α-sinukleina v patogenezo Parkinsonove bolezni

V zadnjih 15 letih je več ključnih odkritij razkrilo pomen  $\alpha$ -sinukleina v patogenezi PD. Med najmočnejšimi dokazi so:

- Fibrile α-sinukleina predstavljajo glavno komponento LT (Spillantini in sod., 1997; Spillantini in sod., 1998b). Fibrile, ki jih najdemo pri PD so strukturno podobne tistim pri drugih amiloidnih boleznih; so ravne paličaste strukture s premerom od 5 do 10 nm (Fink, 2006).
- Mutacije v α-sinukleinskem genu SNCA so povezane z redkimi dednimi primeri zgodnjega pojava bolezni. Poleg duplikacije (Chartier-Harlin in sod., 2004) in triplikacije (Singleton in sod., 2003) α-sinukleinskega genskega lokusa, ki vplivajo na povišano izražanje divjega tipa (ang. wild-type; WT) proteina v celici, so identificirali tudi tri specifične točkovne mutacije: A53T v družini z italijanskim in grškim izvorom (Polymeropoulos in sod., 1997); A30P v nemški družini (Kruger in sod., 1998); in E46K v španski družini (Zarranz in sod., 2004). Povsem nedavno so poročali še o dveh patogenih točkovnih mutacijah v α-sinukleinskem genu (Kiely in sod., 2013; Appel-Cresswell in sod., 2013). Določeni polimorfizmi v SNCA so glavni faktor tveganja za sporadične primere PD (Simon-Sanchez in sod., 2009).
- V živalskih modelih z induciranim izražanjem divjega tipa ali mutiranega αsinukleina je prišlo do pojava nevronskih inkluzij, nevrodegeneracije in v nekaterih primerih tudi motoričnih simptomov podobnih PD (Masliah in sod., 2000; Kuwahara in sod., 2006).

Dodaten dokaz za tesno povezanost med  $\alpha$ -sinukleinom in PD predstavljata s starostjo povezana povišana koncentracija proteina v možganski *substantia nigra* (Chu in Kordower, 2007) ter nedavno odkritje, da miši z izbitimi sinukleinskimi geni s starostjo kažejo nevronsko disfunkcijo (Greten-Harrison in sod., 2010). Potrebno je poudariti, da mutacije v *SNCA* predstavljalo le majhen delež PD, medtem ko naj bi v 95 % vseh PD primerov prišlo do spontane agregacije  $\alpha$ -sinukleina (Farrer, 2006).

#### 2.2.2.2 α-Sinuklein in celična smrt

Molekularni mehanizem (ali mehanizmi), ki vodi v smrt dopaminergičnih nevronov v možganskem predelu *substantia nigra* ni poznan. Dokazi iz živalskih modelov, kot tudi izsledki genetskih, biokemijskih in biofizikalnih študij podpirajo hipotezo, da imata procesa oligomerizacije in/ali rasti fibril α-sinukleina (Conway in sod., 1998; Taschenberger in sod., 2011) glavni vlogi v patogenezi PD in ostalih sinukleinopatijah. Vsaka od agregiranih zvrsti bi potencialno lahko bila toksična. Sprva so citotoksičnost pripisovali s fibrilami bogatimi

LT, vendar so v kasnejših študijah menili, da agregirani depoziti morda predstavljajo zaščitni mehanizem celice (Arrasate in sod., 2004). Tudi študije na živalskih modelih in posmrtnih človeških možganih so pokazale od LT-neodvisno nevrodegradacijo (Moriarty in sod., 2013). Prav tako bi lahko odstranitev nativnega monomernega  $\alpha$ -sinukleina iz njegove fiziološke lokacije povzročila izgubo celične funkcije ali porušenje aktivnosti drugih molekul ali signalnih poti (Wang in sod., 2012). Glavni trije predlagani molekulski mehanizmi, s katerimi bi lahko razložili nevrotoksičnost  $\alpha$ -sinukleina in/ali njegovih agregatov so: (i) fizično porušenje celičnih predelkov in/ali procesov, (ii) pridobitev toksične funkcije in (iii) toksična izguba funkcije (Breydo in sod., 2012).

Najverjetnejši mehanizem patogeneze  $\alpha$ -sinukleina naj bi vključeval destabilizacijo celičnih membran. To je trenutno na splošno najpopularnejša hipoteza toksičnega delovanja amiloidnih proteinov (Butterfield in Lashuel, 2010). Toksični naj bi bili predvsem oligomeri, ki lahko poškodujejo membrane (Auluck in sod., 2010; Lashuel in sod., 2002; Zakharov in sod., 2007; Kim in sod., 2009; van Rooijen in sod., 2009), kar bi lahko vodilo v depolarizacijo celične membrane in njene povečane permeabilnosti.

Predlagali so številne nevrotoksične mehanizme agregatov  $\alpha$ -sinukleina, med njimi okvare proteasoma, poškodbe mitohondrija, apoptozo, oksidativni stres, od dopamina-odvisno toksičnost in okvare transporta veziklov (Deelersnijder in sod., 2013). Oligomeri in nizko molekularni agregati  $\alpha$ -sinukleina so v kvasovkah blokirali transport veziklov med endoplazmatskim retikulom (ER) in Golgijevim aparatom (Cooper in sod., 2006), kar bi lahko vplivalo na mnoge celične procese, tudi avtofagijo poškodovanih mitohondrijev. Mnogo študij se osredotoča na povezavo med agregacijo  $\alpha$ -sinukleina in mitohondrijsko disfunkcijo, ki se pojavi zgodaj v patogenezi tako sporadične kot dedne PD (Büeler, 2009). Menili so, da agregati a-sinukleina tvorijo pore v mitohondrijski membrani, kar vodi v disfunkcijo mitohondrija in povišan oksidativni stres (Betarbet in sod., 2006; Parihar in sod., 2008). Oksidativni stres lahko preko oksidacije proteina vpliva na njegovo agregacijo (Schildknecht in sod., 2013). Ti procesi lahko tvorijo krožni mehanizem napredujoče toksičnosti (slika 1) (Cookson, 2009), h kateri dodatno pripomore prisotnost dopamina (DA) in sorodnih metabolitov v specializiranih nevronskih celicah. Lokalna specifičnost in druge patološke značilnosti sinukleinopatij tako najverjetneje ne izvirajo iz enega samega začetnega molekularnega dogodka, temveč iz kompleksnega prepleta interakcij, ki vključujejo  $\alpha$ -sinuklein, oksidativni stres, proteostatski stres in druge faktorje (Schildknecht in sod., 2013).

V nedavnih študijah so predlagali, da bi  $\alpha$ -sinuklein lahko bil prionu-podoben protein, ki se lahko v napačno zviti konformaciji prenaša med nevroni, kjer *zaseje* agregacijo v recipientski celici in tako potencialno širi nevrodegeneracijo (Deelersnijder in sod., 2013; Desplats in sod., 2009). Širjenje naj bi bilo najbolj učinkovito, ko je  $\alpha$ -sinuklein vezan na majhne vezikle - eksosome (Danzer in sod., 2012). Ko v pogojih celičnega stresa avtofagni mehanizmi odpovejo in ne pride do lizosomske razgradnje toksičnih oligomerov  $\alpha$ sinukleina, bi lahko to vodilo v čiščenje celice s pomočjo eksosomov in tako omogočilo mednevronski prenos  $\alpha$ -sinukleina (Alvarez-Erviti in sod., 2011; Danzer in sod., 2012). Depozite  $\alpha$ -sinukleina so našli tudi v trebušnem živčnem sistemu, povezanim z možgani preko vagusnega živca (Goedert in sod., 2013). Trenutno ni znano ali se bolezen začne v črevesju in se širi v možgane ali obratno (Del Tredici in Braak, 2012).



Slika 1: Molekularni in celični procesi povezani z  $\alpha$ -sinukleinom in Parkinsonovo boleznijo. PD je multifaktorska bolezen, pri kateri poškobe nevronov izvirajo iz okoljskih dejavnikov, ki vplivajo na delovanje mitohondrijev, ER in proteasomov. Dovzetnost dopaminergičnih celic poleg genetske predispozicije (multiplikacija in mutacije v *SNCA* ter drugih genih) še poveča tvorba reaktivnih kisikovih (ROS) in dušikovih (NOS) zvrsti. Okvirji s temno obrobo kažejo na udeležbo membrane v navedenem procesu (Shvadchak in sod., 2011a). Legenda:  $\alpha$ -sinuklein; DA, dopamin; PUFA, polinenasičene maščobne kisline; LT, Levijeva telesca; LN, Levijevi nevriti.

Figure 1: Molecular and cellular processes related to  $\alpha$ -synuclein and Parkinson's disease. PD is a multifactorial disease and neuronal dysfunction arises by the concurrent action of environmental factors stressing the functions of mitochondria, ER and proteasomes. Genetic predisposition (gene multiplication and missense mutations of *SNCA* gene, mutations in other genes) is further exacerbated in dopaminergic cells by the susceptibility to the promoters of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (NOS) species. Boxes with thick borders indicate membrane participation in the indicated process (Shvadchak et al., 2011a). Legend:  $\alpha$ -sin,  $\alpha$ -synuklein; DA, dopamine; PUFA, polyunsaturated fatty acids; LT, Levy bodies; LN, Levy neurites.

#### 2.3 LOKACIJA IN FUNKCIJA α-SINUKLEINA

α-Sinuklein najdemo v različnih celičnih tipih, vendar je relativno specifičen za centralni živčni sistem (Deelersnijder in sod., 2013). Ocenjujejo, da v možganih predstavlja okoli 0,5 - 1,0 % skupnih citosolnih nevronskih proteinov (Iwai in sod., 1995). V membranski frakciji se nahaja ~15 % α-sinukleina (Lee in sod., 2002), po lizi sinaptosomov pa so ga identificirali v topni frakciji (Iwai in sod., 1995), kar kaže na reverzibilno vezavo. Protein se močno izraža tudi v eritrocitih in krvnih ploščicah (Barbour in sod., 2008). Kljub temu, da naj bi bil αsinuklein predvsem citoplazemski protein, pa so ga našli tudi v ekstracelularnih tekočinah, kot sta cerebrospinalna tekočina in krvna plazma (Borghi in sod., 2000; El-Agnaf in sod., 2006).

Natančna fiziološka funkcija (ali funkcije)  $\alpha$ -sinukleina ni poznana, vendar pa obstajajo močni dokazi, da je povezana z vezavo na lipidne membrane, še posebej z reverzibilno vezavo na sinaptične vezikle (Beyer, 2007; Dikyl in Eliezer, 2012). V nevronih je  $\alpha$ sinuklein prisoten predvsem v **presinaptičnih končičih** (Iwai in sod., 1995), kjer asociira z rezervno zalogo sinaptičnih veziklov (Kahle in sod., 2000; Lee in sod., 2008). Ob izbitju  $\alpha$ sinukleinskega gena ali prekomernem izražanju proteina pride do motenj v sinaptičnem prenosu. To kaže na vlogo v regulaciji fuzije sinaptičnih veziklov oz. prenosu nevrotransmiterja, sinaptični funkciji in plastičnosti (slika 2).  $\alpha$ -Sinuklein bi lahko sodeloval pri vzdrževanju rezervne zaloge sinaptičnih veziklov (Lashuel in sod., 2013). Ker so miši z izbitimi sinukleinskimi geni viabilne (Abeliovich in sod., 2000; Burré in sod., 2010), protein verjetno ni bistven za sinaptični prenos, lahko pa prispeva k daljnoročni regulaciji in vzdrževanju funkcije živčnih končičev (Chandra in sod., 2004; Greten-Harrison in sod., 2010).

α-Sinuklein bi lahko deloval kot negativni regulator prenosa nevrotransmiterja. Miši z izbitim genom SNCA imajo okvarjen sinaptični odziv pri stimulaciji z zaporednimi podaljšanimi visoko-frekvenčnimi dražljaji. Pride do porabe veziklov, ki so zasidrani na membrano, in založnih veziklov, ter motenj v nadomeščanju veziklov iz zaloge. To kaže na uravnalno vlogo proteina pri nastajanju in transportu rezervnih sinaptičnih veziklov na mesto sprostitve (Cabin in sod., 2002; Abeliovich in sod., 2000). Tudi uporaba nasprotnosmiselnih oligonukleotidov je v primarni kulturi nevronov znižala zalogo sinaptičnih veziklov (Murphy in sod., 2000).  $\alpha$ -Sinuklein bi lahko sodeloval pri stabilizaciji veziklov, kar bi preprečilo prezgodnjo fuzijo s tarčno membrano (Nuscher in sod., 2004; Perlmutter in sod., 2009). Za transgene miši s povišanim izražanjem  $\alpha$ -sinukleina je značilna okvarjena eksocitoza sinaptičnih veziklov in znižano sproščanje nevrotransmitorja (Yavich in sod., 2004; Scott in sod., 2010; Nemani in sod., 2010). Podobne učinke so opazili ob povišanem izražanju α-sinukleina v živalskih modelih za PD (Gaugler in sod., 2012; Lundblad in sod., 2012), in v celični liniji PC12 (Larsen in sod., 2006). Povečano izražanje proteina zniža zalogo hitro dostopnih veziklov (Gaugler in sod., 2012) in vpliva na recikliranje sinaptičnih veziklov po endocitozi, kar vodi v znižanje velikosti reciklirajoče zaloge sinaptičnih veziklov (Nemani in sod., 2010). Povečana količina proteina zmanjša privzem dopamina v nevronskih terminalih (Lundblad in sod., 2012) in inhibira intersinaptični transport veziklov, kar zmanjša število založnih veziklov (Scott in Roy, 2012).

 $\alpha$ -Sinuklein bi lahko preko modulacije poznih korakov eksocitoze deloval tudi kot pozitivni regulator sinaptičnega prenosa. Za miši z onesposobljenim genom za protein CSP $\alpha$  (ang. cysteine string protein alpha) je značilna hitra nevrodegeneracija. CSP $\alpha$  je prisoten v sinaptičnih veziklih, delecija njegovega gena pa inhibira sestavljanje proteinskega kompleksa SNARE (ang. <u>S</u>oluble <u>N</u>-ethylmaleimide-sensitive factor <u>A</u>ttachment protein <u>RE</u>ceptor). Transgeno izražanje  $\alpha$ -sinukleina je v veliki meri izničilo negativni učinek delecije *CSP* $\alpha$  ter preprečilo nevrodegeneracijo (Chandra in sod., 2005).



Slika 2: Domnevna vloga  $\alpha$ -sinukleina v regulaciji prenosa nevrotransmiterja. V presinaptičnih živčnih končičih se sinaptični vezikli vzdržujejo v hitro dostopni in reciklirajoči zalogi. Nevronska aktivnost sproži eksocitozo veziklov. Ob tem pride do (1) transporta veziklov, (2) prileganja veziklov, (3) zasidranja in fuzije veziklov ter sprostitve nevrotransmitorja, kar vključuje sestavljanje proteinskega kompleksa SNARE. V okvirju sta prikazani strukturi membransko vezanega  $\alpha$ -sinukleina (glej 2.6.3). V citoplazmi in/ali lumnu veziklov je protein v nativno neurejeni strukturi (glej 2.4.2) (Deleersnijer in sod., 2013).

Figure 2: Suggested role of  $\alpha$ -synuclein in the modulation of neurotransmitter release. In presynaptic nerve terminals, neurotransmitter vesicles are maintained in a reserve pool, readily releasable and recycling pool. Neuronal activity triggers vesicle exocytosis, preceded by (1) vesicle trafficking, (2) vesicle docking and (3) priming, vesicle fusion and neurotransmitter release involving SNARE protein complex assembly. Inset demonstrates membrane-induced structures of  $\alpha$ -synuclein (see 2.6.3). In the unbound state,  $\alpha$ -synuclein can be found in the cytoplasm and/or vesicle lumen in an intrinsically disordered conformation (see 2.4.2) (Deleersnijder et al., 2013).

Funkcija  $\alpha$ -sinukleina v regulaciji sinaptične homeostaze ni nujno povezana zgolj z interakcijo s sinaptičnimi vezikli. Stimulacija sestavljanja kompleksa SNARE *in vitro* naj bi vključevala neposredno interakcijo med  $\alpha$ -sinukleinom in sinaptobrevinom (Burré in sod., 2010). Protein bi lahko interagiral s sinaptičnimi proteini, ki kontrolirajo eksocitozo veziklov, kot je fosfolipaza D2 (Payton in sod., 2004), čeprav kasnejša študija ni potrdila inhibicije tega encima (Rappley in sod., 2009).  $\alpha$ -Sinuklein naj bi imel vlogo tudi pri tvorbi dopamina, saj vpliva na delovanje nekaterih encimov, ki sodelujejo v njegovi sintezi (Perez in sod., 2002; Tehranian in sod., 2006).  $\alpha$ -Sinuklein interagira še s številnimi drugimi proteini (Dev in sod., 2003; Uversky, 2007).

Predlagali so še številne druge funkcije α-sinukleina, kot so regulacija transporta veziklov ER in GA (Cooper in sod., 2006), vloga v preživetju nevronov (Quilty in sod., 2006), vloga v metabolizmu in transportu lipidov (Sharon in sod., 2001), eksocitozi (Srivastava in sod., 2007), organizaciji lipidov (Madine in sod., 2006), kontroli nevronskega apoptotičnega odziva (Xu in sod., 2002; Saha in sod., 2000), vzdrževanju homeostaze dopamina (Lotharius in Brundin, 2002), produkciji prostih radikalov (Zhu in sod., 2006), tvorbi transmembranskih ionskih kanalov (Zakharov in sod., 2007; Quist in sod., 2005), splošni šaperonski aktivnosti (Souza in sod., 2000) in celičnem signaliziranju (Chandra in sod., 2004; Dev in sod., 2003). Več študij je poročalo o vlogi proteina pri vzdrževanju integritete mitohondrija (Ellis in sod.,

2005; Chinta in sod., 2010). Širok nabor predlaganih funkcij bi lahko bil povezan z zanimivimi strukturnimi lastnostmi proteina (glej 2.4).

#### 2.4 STRUKTURNE ZNAČILNOSTI IN KONFORMACIJA α-SINUKLEINA

α-Sinuklein je izjemen zaradi svoje strukturne plastičnosti, saj lahko zavzame številne strukturno nesorodne konformacije. Poleg nezvitega monomernega stanja, te obsegajo še membransko vezano strukturo α-vijačnice, delno zvito konformacijo, ki je ključni intermediat pri agregaciji in fibrilaciji proteina, raznolike oligomerne zvrsti, amorfne agregate in fibrile z β-strukturo ter (domnevno) α-vijačno tetramerno strukturo. Ker je širok spekter dostopnih konformacij α-sinukleina izjemno odvisen od okoljskih pogojev (Weinreb in sod., 1996; Bussell in Eliezer, 2003; Uversky in sod., 2001), je Uversky (2003) predlagal koncept **proteina-***kameleona*, po katerem se α-sinuklein na okolje in vezne partnerje odziva s spremembami strukture.

#### 2.4.1 Primarna zgradba α-sinukleina

a-Sinuklein je majhen (140 AK; 14,460 kDa) močno kisel protein z izoelektrično točko (Ip) 4,67 (Ueda in sod., 1993). Majhna Ip se odraža v velikem neto negativnem naboju proteina pri nevtralnem pH (Beyer, 2007). Primarna struktura proteina ima več značilnosti. Tako je za prvih 89 N-terminalnih AK ostankov značilnih **sedem nepopolnih 11-mernih ponovitev** z zelo ohranjenim 6-mernim konsenznim zaporedjem KTKEGV (slika 3A). Ta motiv je edinstven za sinukleinsko proteinsko družino in je zelo ohranjen med vrstami (George in sod., 1995; Bendor in sod., 2013). Na osnovi primerjave z apolipoproteini razreda A-I so sklenili, da so ti motivi pomembni za zvitje proteina v amfipatično  $\alpha$ -vijačnico ob interakciji z lipidnimi membranami (Segrest in sod., 1992; Davidson in sod., 1998). Amfipatičnost ustreza ločitvi polarnih in nepolarnih AK ostankov na nasprotnih straneh  $\alpha$ -vijačnice; takšna porazdelitev je zelo primerna za vezavo na membrane (Drin in Anthonny, 2010).

Na ravni AK zaporedja lahko strukturo α-sinukleina razdelimo na tri regije (slika 3B):

- **N-terminalna domena** (AK ostanki 1 60) je pozitivno nabita in vsebuje štiri 11merne nepopolne ponovitve (Fink, 2006; George in sod., 1995). Ta domena je ključna za tvorbo α-vijačne strukture pri interakciji z lipidi (Bartels in sod., 2010). Vse tri točkovne mutacije, ki jih povezujejo z zgodnjim pojavom PD, se nahajajo v tej regiji.
- Osrednja NAC regija<sup>1</sup> (AK ostanki 61 95) predstavlja najbolj hidrofoben del proteina in je bila prvotno opisana kot ne-β-amiloidna komponenta Alzheimerjeve bolezni (Takeda in sod., 1998). Ta regija vsebuje tri dodatne motive KTKEGV. Več študij je pokazalo, da je domena NAC nujna za agregacijo in tvorbo β-strukture proteina. Delecija specifičnih AK ostankov znotraj NAC regije namreč prepreči agregacijo (Bodles in sod., 2001; Giasson in sod., 2001). Peptidi, ki izhajajo iz NAC regije, tvorijo fibrile z β-strukturo (El-Agnaf in sod., 1998). Pokazali so, da je regija

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>V literaturi vlada zmeda pri poimenovanju posameznih regij α-sinukleina, saj se z izrazom N-terminalna regija pogosto poimenuje AK zaporedje 1 - 95 (NAC regija je v tem primeru del N-terminalne regije). To še posebej velja pri raziskavah interakcije proteina z lipidnimi membranami. Takšnega poimenovanja se bomo, če ne bo drugače navedeno, držali tudi v doktorskem delu.

NAC toksična za celice (Bodles in sod., 2001) in da delecija te regije v transgenem modelu *Drosophile* prepreči agregacijo  $\alpha$ -sinukleina in celično smrt (Periquet in sod., 2007). Homologni protein  $\beta$ -sinuklein, ki za razliko od  $\alpha$ -sinukleina nima osrednje hidrofobne domene, je mnogo manj nagnjen k agregaciji. Interakcija med  $\beta$ -sinukleinom in  $\alpha$ -sinukleinom naj bi preprečila agregacijo (Park in Lansbury, 2003).

 C-terminalna domena (AK ostanki 96 - 140) vsebuje edinih pet Pro in številne kisle AK ostanke (15 karboksilatov), pri čemer je Glu pogostejši od Asp (George in sod., 1995). Ta regija je zaradi prisotnost številnih nabitih AK in Pro močno nagnjena k neurejeni konformaciji (Breydo in sod., 2012).



Slika 3: Aminokislinsko zaporedje človeškega  $\alpha$ -sinukleina. (A) Prikazane so 11-merne ponovitve z osenčenim konsenznim zaporedjem KTKEGV. Položaj vseh treh točkovnih mutacij, ki jih povezujejo z zgodnjim pojavom PD (A30P, E46K, A53T), je prikazan v odebeljenem tisku. Vsi štirje Tyr ostanki so v okvirju in odebeljeni. (B) Zaporedje AK v  $\alpha$ -sinukleinu lahko razdelimo v tri regije: N-terminalni del, ki po vezavi na membrano zavzame  $\alpha$ -vijačno strukturo, hidrofobno NAC regijo, ki lahko tvori  $\beta$ -strukturo in negativno nabiti nestrukturirani C-terminalni del. Prikazani sta tudi regiji, ki sta pomembni za vezavo na membrano in tvorbo jedra fibrile (prirejeno po Pirc in Ulrih, 2011).

Figure 3: Amino-acid sequence of human  $\alpha$ -synuclein. (A) The imperfect 11-mer repeats are as indicated, with the predominant KTKEGV consensus sequences shaded. The locations of the three point mutations that have been linked to early-onset PD (A30P, E46K, A53T) are shown in bold type. All four Tyr residues are shown in bold type and framed. (B) The  $\alpha$ -synuclein sequence can be divided into three regions: the N-terminus adopts an  $\alpha$ -helix upon lipid binding, the hydrophobic NAC domain can form  $\beta$ -sheet structure, and the negatively charged C-terminus is unstructured. The proposed membrane binding and fibril core-forming regions are indicated (addapted from Pirc and Ulrih, 2011).

Prvi dve regiji tvorita membransko-vezavno domeno (slika 3B), medtem ko naj bi bil Cterminalni del pomemben za interakcijo s proteini, majhnimi molekulami in kovinskimi ioni (Ulmer in sod., 2005; Eliezer in sod., 2001; Uversky in Eliezer, 2009). C-terminalni del je lahko na več mestih fosforiliran (Oueslati in sod., 2010), kar bi lahko kazalo na vlogo v regulaciji. Funkcija C-terminalnega dela ostaja nepojasnjena, poleg tega pa je to tudi najmanj ohranjena domena med vrstami kot tudi med sinukleinskimi izoformami. Ta domena naj bi zakrivala hidrofobno NAC regijo in tako imela tudi regulatorno vlogo pri agregaciji in tvorbi fibril proteina (glej 2.4.2.2)

 $\alpha$ -Sinuklein ne vsebuje Trp, Cys in Arg. C-terminalna domena vsebuje tri (na pozicijah 125, 133 in 136) od štirih Tyr ostankov; četrti, Tyr39, ostanek se nahaja v N-terminalni domeni. Tyr ostanki so ohranjeni med  $\alpha$ - in  $\beta$ -sinukleini, kar nakazuje na možne pomembne funkcije teh AK (Uversky in Fink, 2002; Dev in sod., 2003).

#### 2.4.2 Nativna struktura α-sinukleina

#### 2.4.2.1 α-Sinuklein je nativno nezviti protein

Nativne strukture amiloidogenih proteinov so zelo raznolike. Nekateri, kot so na primer lahke verige Ig, transertin in inzulin, so stabilno zviti monomerni ali oligomerni proteini. Veliko proteinov, ki so vpleteni v nastanek amiloidnih bolezni, pa je tudi **neurejenih samih po sebi**. Med takšne proteine ali regije proteinov uvrščamo amiloid- $\beta$  in tau protein pri Alzheimerjevi bolezni, N-terminalno domeno prionskega proteina, poli(Q) regije huntingtina pri Huntingtonovi bolezni (Fink, 2005) in tudi  $\alpha$ -sinuklein. Takšni proteini v očiščeni obliki pri nevtralnem pH na celotnem ali samo delu AK zaporedja ne zavzamejo specifične sekundarne in/ali terciarne strukture in jih lahko opišemo kot zelo fleksibilno in dinamično skupino različnih konformacijskih stanj (Uversky, 2011; 2013; Fink, 2005). Odlaganje  $\alpha$ -sinukleina naj bi tako imelo svoj izvor v neurejenem monomernem skupku številnih konformacij pri pogojih, ki pospešijo fibrilacijo (Fink, 2006; Uversky, 2003).

Kljub neurejeni lastni strukturi ti proteini predstavljajo zelo velik in funkcionalno pomemben razred proteinov. Ocenjujejo, da ima več kot 30 % evkariontskih proteinov neurejene regije, ki zajemajo najmanj 50 AK ostankov (Dunker in sod., 2001). V celici pogosto sodelujejo v pomembnih regulatornih funkcijah in v mnogih primerih tudi pridobijo strukturo po vezavi na tarčne molekule (Wright in Dyson, 1999). Za mnogo neurejenih proteinov brez stalne konformacijske zgradbe so pokazali, da so vpleteni v interakcije s številnimi vezavnimi partnerji (Uversky, 2011).

α-Sinuklein uvrščamo v poddružino najbolj neurejenih proteinov, ki jih imenujemo **nativno nezviti proteini** in za katere je značilna nizka hidrofobnost, nizka kompleksnost AK zaporedja ter velik neto naboj (Lee in sod., 2007). V raztopini ima α-sinuklein mnogo večji Stokesov radij kot globularni proteini podobne molekulske mase (57 kDa namesto 14,5 kDa, kot pričakujemo za 140-AK protein), kar kaže na podaljšano strukturo nativnega proteina (Weinreb in sod., 1996). Analiza s cirkularnim dihroizmom (CD), infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR), gelsko kromatografijo (SEC) in X-žarkovnim sipanjem pod majhnim kotom (SAXS) je pokazala, da v raztopini nima značilne proteinske sekundarne strukture (Weinreb in sod., 1996; Davidson in sod., 1998; Uversky in sod., 2001). Takšna neurejena konformacija  $\alpha$ -sinukleina je bila neodvisna od toplotne denaturacije, koncentracije proteina, koncentracije soli, kemičnih denaturantov in pH (Weinreb in sod., 1996). Študije strukture proteina z NMR (jedrna magnetna resonanca) so potrdile nestrukturiranost proteina in omogočile zelo podrobno sliko lokalnih strukturnih preferenc, med njimi tudi šibko preferenco do  $\alpha$ -vijačne strukture v N-terminalnem delu, še posebej AK ostankov 18 - 31 (Eliezer in sod., 2001).

#### 2.4.2.2 Daljnosežne interakcije v molekuli α-sinukleina

Monomerni  $\alpha$ -sinuklein je sicer neurejen, vendar pa ima kompaktnejšo strukturo, kot bi pričakovali za popolnoma nezviti polipeptid. S SAXS-analizo so pokazali, da ima  $\alpha$ -sinuklein radij giracije (Rg), ki se uporablja za opis dimenzij polipeptidne verige, ~40 Å. To je precej več, kot je predvideno za zviti globularni protein iz 140 AK ostankov (15 Å), in obenem manj kot za popolnoma nezviti naključni klobčič (52 Å) (Uversky in sod., 2001). Tudi Stokesov radij proteina je manjši kot je predvideno za popolnoma nezviti protein (Uversky in sod., 2001; Uversky in Fink, 2002). Z NMR, EPR (elektronska paramagnetna resonanca) in s študijami molekulske dinamike (ang. molecular dynamics; MD) (Allison in sod., 2009; Dedmon in sod., 2005; Bertoncini in sod., 2005), so potrdili, da v konformacijskemu skupku neurejenega  $\alpha$ -sinukleina obstajajo kratkožive daljnosežne interakcije med N-terminalnim in C-terminalnim delom, ki vodijo h kompaktnejši konformaciji proteina (Dedmon in sod., 2005; Bertoncini in sod., 2005). V nedavni računalniški študiji eksperimentalno pridobljenih podatkov so sestavili strukturni skupek, za katerega je predvideno, da predstavlja nezvito stanje monomernega  $\alpha$ -sinukleina v raztopini (slika 4A) (Ullman in sod., 2011).

Dedmon in sod. (2005) so pripravili več mutantov  $\alpha$ -sinukleina z vstavljenim Cys, ki so bili označeni z nitroksidom, kar omogoča opazovanje interakcij s kratko življenjsko dobo. Z NMR so pokazali, da do delne kondenzacije  $\alpha$ -sinukleina pride zaradi daljnosežnih kontaktov, predvsem med AK ostanki na mestih ~30 - 100 v hidrofobni centralni regiji in AK ostanki ~120 - 140 v C-terminalnem delu (Dedmon in sod., 2005). V analognih NMR eksperimentih, kjer so  $\alpha$ -sinuklein z nitroksidnim radikalom označili na mestih 18, 90 ali 140 (Bertoncini in sod., 2005), so pokazali številne daljnosežne interakcije, med katerimi je najpomembnejša med hidrofobno skupino AK ostankov na C-terminalnem delu NAC domene (AK ostanki 85 - 95) in C-terminalno domeno (AK ostanki 110 - 130). Predvidevajo, da imajo pri interakciji pomembno vlogo Met116, Val118, Tyr125 in Met127. Znotraj Cterminalne domene AK ostanki na mestih 120 - 130 interagirajo s tistimi na mestih 105 -115, regija okoli AK ostanka 120 pa interagira tudi z N-terminalnim delom okoli mesta 20 (Bertoncini in sod., 2005). Primera dveh od sedmih najbolj zastopanih skupin konformacij sta prikazana na sliki 4B. N/C-kontakti so dinamični in ne predstavljajo statične slike  $\alpha$ sinukleina kot proteina brez lastnega zvitja. Rahla kompaktnost proteinske strukture je rezultat opažanj na močno povprečeni skupini nezvitih konformacij (Allison in sod., 2009).

Predlagali so, da te daljnosežne interakcije prispevajo k zakritju amiloidogene hidrofobne NAC domene in s tem preprečijo spontano agregacijo  $\alpha$ -sinukleina (Dedmon in sod., 2005; Bertoncini in sod., 2005). Avtoinhibitorne konformacije fluktuirajo na nano- do mikrosekundni skali, kar ustreza času tvorbe sekundarne strukture med zvitjem proteina (Bertoncini in sod., 2005).



Slika 4: Strukture nativnega monomernega  $\alpha$ -sinukleina. (A) Poravnava vseh struktur v skupini različnih konformacijskih stanj  $\alpha$ -sinukleina (Ullman in sod., 2011). (B) Konformacije  $\alpha$ -sinukleina – študije z NMR (Bertoncini in sod., 2005). Prikazana sta dva od sedmih najbolj zastopanih konformacijskih skupkov. RDCji (ang. residual dipolar couplings) so prikazani z neprekinjeno barvno skalo. V *prstanasti* konformaciji proteina je C-terminalna regija v kontaktu z NAC in N-terminalno regijo. Za podrobnejši opis glej Bertoncini in sod., 2005 in Alderson in Markley, 2013.

Figure 4: The structures of native-state monomeric  $\alpha$ -synuclein. (A) An alignment of all structures within the  $\alpha$ -synuclein ensemble (Ullman et al., 2011).  $\alpha$ -Synuclein conformations as determined by NMR methodology (Bertoncini et al., 2005). Two of the seven most populated clusters are shown. RDCs are shown with a continuous color scale. In *ring-like* protein conformation C-terminal region contacts NAC residues and N-terminal residues. For details see Bertoncini et al., 2005 and Alderson and Markley, 2013.

#### 2.4.2.3 Neurejeni monomer ali urejeni oligomer?

Trenutno so mnenja o nativni strukturi  $\alpha$ -sinukleina precej nasprotujoča, saj je znotrajcelična konformacija proteina slabo poznana (Bendor in sod., 2013) niti ni znano kolikšen delež proteina je v fiziološkem okolju nezvitega (Breydo in sod., 2012). Dokazi o lastni neurejenosti  $\alpha$ -sinukleina izhajajo predvsem iz analize rekombinantnega proteina izraženega v bakterijah, ob čemer bi lahko denaturacijski postopki čiščenja in neizogibno redčenje proteina prispevali k nezvitemu monomernemu stanju. Bartels in sod. (2011) so prvi poročali, da α-sinuklein, izoliran z nedenaturirajočim postopkom iz različnih sesalčjih virov, tudi človeških eritrocitov, obstaja kot stabilni tetramer z  $\alpha$ -vijačno strukturo. Wang in sod. (2011) so poročali, da α-sinuklein po izolaciji iz E. coli tvori dinamični tetramer, ki bi lahko predstavljal shrambo za topne proteine. Tetramer je imel v primerjavi z monomerom manjšo agregacijsko težnjo (Bartels in sod., 2011; Wang in sod., 2011) in se je z večjo afiniteto kot monomer vezal na lipidne vezikle (Bartels in sod., 2011). Tudi in vivo prečno povezovanje v HEL celicah je pokazalo prisotnost večinoma tetramerne zvrsti, vendar tudi znatnih količin monomerov, dimerov in trimerov. Predlagali so, da je in vivo prisotnost tetramerov odvisna od molekulskega nasičenja ali pa še neznane bioorganske molekule, ki stabilizira oligomerne zvrsti proteina (Dettmer in sod., 2013).

Nasprotno je več neodvisnih študij podprlo lastno neurejeno strukturo  $\alpha$ -sinukleina, pridobljenega iz različnih virov pod različnimi pogoji, tudi nedenaturirajočimi (Fauvet in sod., 2012a; Fauvet in sod., 2012b; Kang in sod., 2012), kot tudi v intaktnih celicah *E. coli* 

(Binolfi in sod., 2012). Tudi z analizo nativnega možganskega  $\alpha$ -sinukleina so potrdili skoraj izključno monomerno stanje proteina, vendar pa je bila vsebnost  $\alpha$ -vijačne strukture večja kot pri rekombinantnem proteinu (Burré in sod., 2013).

Za razliko od bakterijskega rekombinantnega  $\alpha$ -sinukleina je bil  $\alpha$ -sinuklein iz eritrocitov  $N^{\alpha}$ -acetiliran (Bartels in sod., 2011). Acetiliran je tudi agregirani  $\alpha$ -sinuklein v depozitih pri PD (Ohrfelt in sod., 2011). Acetiliran  $\alpha$ -sinuklein obstaja pretežno v neurejeni monomerni konformaciji. Acetilacija ni vplivala na oligomerizacijo proteina (Kang in sod., 2012; Fauvet in sod., 2012b), medtem ko vpliv na fibrilacijo in vezavo z lipidi ni jasen (Fauvet in sod., 2012a; Fauvet in sod., 2012b).

#### 2.5 FIBRILACIJA α-SINUKLEINA

Agregacija  $\alpha$ -sinukleina lahko poteka po različnih poteh in konča v tvorbi topnih oligomerov, netopnih amorfnih agregatov ali netopnih amiloidnih fibril (Uversky, 2003; 2007; Fink, 2006). Predvidevajo, da ima agregacija proteina v fibrile (t.j. fibrilacija) osrednjo vlogo pri patogenezi Parkinsonove bolezni (Deleersnijder in sod., 2013). Amiloidne fibrile  $\alpha$ -sinukleina predstavljajo namreč glavno proteinska komponento LT, ki se akumulirajo v dopaminergičnih nevronih bolnikov s sinukleinopatijami (Spillantini in sod., 1997). Tudi rekombinantni  $\alpha$ -sinuklein tvori fibrile, ki so podobne tistim v LT (Conway in sod., 1998; Serpell in sod., 2000). Z X-žarkovno difrakcijo so določili, da imajo fibrile  $\alpha$ -sinukleina značilno amiloidno navzkrižno- $\beta$  strukturo (Serpell in sod., 2000; Sawaya in sod., 2007).

Tvorba amiloidnih fibril naj bi bila splošna značilnost mnogih, če ne vseh proteinov, in ni omejena le na neurejene ali zvite proteine, ki jih povezujejo z boleznimi (Dobson, 1999). Nefibrilarni agregati, ki izvirajo iz različnih polipeptidov imajo skupne strukturne epitope (Kayed in sod., 2003). Amiloidni depoziti pa imajo tudi specifične optične lastnosti pri vezavi določenih molekul barvila, kot so Kongo rdeče ter tioflavina S in T (ThT), ter so odporni na proteolitsko razgradnjo (Biancalana in Koide, 2010; Breydo in sod., 2012).

#### 2.5.1 Mehanizem fibrilacije

Kljub intenzivnim raziskavam ostaja mehanizem fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina v celicah nepojasnjen. Predvidevajo, da je protein pred agregacijo v ravnotežju med nativnimi nezvitimi (*ne-lepljivimi*) konformacijami in delno zvitimi konformacijami (od katerih so mnoge *lepljive*). V normalnih, nepatoloških pogojih je ravnotežje močno pomaknjeno proti *nelepljivim* nezvitim konformacijam. Vendar pa je to ravnotežje izjemno nestabilno in se lahko že z majhnimi spremembami v okolju proteina (glej 2.5.3) premakne proti amiloidogenim konformacijam (Breydo in sod., 2012).

Prvi korak agregacije *in vitro* predstavlja strukturna pretvorba nezvitega monomera v delno zviti, k agregaciji nagnjen intermediat (Uversky in sod., 2001). Takšni intermediati imajo za razliko od monomernega proteina na površini obširna nepolarna področja (t.j. sosledje hidrofobnih AK), ki promovirajo agregacijo proteina (Fink, 2006). Za fibrilacijo je nato ključen naslednji korak, to je nastanek majhnih metastabilnih oligomernih intermediatov, ki predstavljajo najbolj energijsko zvrst v polimerizacijski poti in jih imenujemo jedro (ang. *nucleus*) fibril (Wood in sod., 1999). Zaradi nukleacijskega mehanizma (Wood in sod., 1999)

je kinetika fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina tipično sigmoidna (slika 5). Začetna lag-faza je potrebna za tvorbo oligomernega nukleacijskega jedra in se lahko skrajša ob prisotnosti že tvorjenih fibril, ki delujejo kot *seme*. Ko se kritično jedro enkrat tvori, postane njegova nadaljna elongacija energijsko ugodna in povzroči eksponentno rast fibril, ki sledi hierarhičnemu mehanizmu protofilamenti  $\rightarrow$  protofibrile  $\rightarrow$  zrele fibrile. Končna faza platoja se vzpostavi, ko zmanjka topnega proteina (Ulrih in sod., 2008; Deleersnijder in sod., 2013). Strukturne pretvorbe monomernih in oligomernih zvrsti  $\alpha$ -sinukleina spremlja povišana izpostavljenost hidrofobnih regij (Uversky in sod., 2001; Dusa in sod., 2006; Cremades in sod., 2012).



Slika 5: Tvorba amiloidnih fibril preko nukleacijske polimerizacije (Butterfield in Lashuel, 2010). Figure 5: Depiction of the nucleation polymerization pathway for amyloid fibrillogenesis (Butterfield and Lashuel, 2010).

#### 2.5.2 Struktura in polimorfizem oligomerov in fibril

Tako kot velja za ostale amiloidne proteine, so tudi oligomeri in fibrile  $\alpha$ -sinukleina strukturno izjemno raznovrstni (Breydo in sod., 2012). Topni oligomeri, ki se tvorijo na različnih stopnjah agregacije  $\alpha$ -sinukleina, so lahko prehodni ali pa stabilni (Fink, 2006). Struktura in mehanizmi delovanja teh zgodnjih intermediatov so nepoznani. Nekateri vsebujejo veliko  $\beta$ -strukture ali  $\alpha$ -vijačnice, medtem ko so drugi pretežno nestrukturirani (Hong in sod., 2011; Apetri in sod., 2006; Glabe in sod., 2008). Strukturna raznolikost oligomerov se odraža v njihovi spremenljivi toksičnosti in biološki aktivnosti (Breydo in sod., 2012). Patologijo  $\alpha$ -sinukleina večinoma pripisujejo prehodnim, k agregaciji nagnjenim oligomerom (Bolognesi in sod., 2010; Cremades in sod., 2012; Campioni in sod., 2010), ki imajo na površini izpostavljena hidrofobna področja (Fink, 2006) in lahko poškodujejo lipidne membrane.

Fibrile  $\alpha$ -sinukleina so dolge, gladke, ravne in nerazvejane strukture (Khurana in sod., 2003; Fink, 2006). Z analizo z AFM (mikroskop na atomsko silo) so identificirali tri različne višine fibril, ki pripadajo protofilamentom (3,8 ± 0,6 nm), protofibrilam (6,5 ± 0,6 nm) in zrelim fibrilam (9,8 ± 1,2 nm) (Khurana in sod., 2003). Protofilamenti so kratke in tanjše fibrilarne strukture, ki se z medsebojno lateralno asociacijo ob določeni stopnji strukturne preureditve združujejo v protofibrile. Tudi dolžina zrelih fibril  $\alpha$ -sinukleina zelo variira in je v rangu 100 nm do nekaj µm (Uversky in Fink, 2002; Uversky in sod., 2002).



Slika 6: Domnevna ureditev fibril  $\alpha$ -sinukleina. Zvitje monomernega  $\alpha$ -sinukleina v protofilamentu je prikazano na sredini. Protofilamenti se lahko uredijo v ravno (levo) ali prepleteno (desno) fibrilo (Vilar in sod., 2008).

Figure 6: Proposed fold of  $\alpha$ -synuclein fibrils. The fold of monomeric  $\alpha$ -synuclein within a protofilament is shown in the center. The incorporation of a protofilament into the straight (left) and twisted (right) fibril type is indicated by a schematic drawing (Vilar et al., 2008).

Protofilamenti imajo značilno »navzkrižno-β-strukturo« (Serpell in sod., 2000), pri kateri βtrakovi tečejo pravokotno na dolgo os fibrile, medtem ko se β-ravnine razširjajo v smeri osi fibrile (slika 6). Jedro fibrile α-sinukleina tvorijo AK ostanki od ~30 do ~100 (slika 3), medtem ko je preostanek N-terminalnega dela strukturno heterogen in s Pro-bogat kisel Cterminalni del nestrukturiran (Heise in sod., 2005; Qin in sod., 2007; Vilar in sod, 2008). Študije s krioelektronsko mikroskopijo, NMR in AFM so pokazale, da so fibrile α-sinukleina strukturno polimorfne. Do razlik v morfologiji verjetno pride zaradi variacij v zvitju βravnin, razlik v molekulskem pakiranju med β-ravninami in/ali interakcij stranskih verig z okoljem (Breydo in sod., 2012). Rekombinantne (AK 30 - 100) fibrile in filamenti iz PDpacientov tvorijo ravne ali pa prepletene trakove (Vilar in sod., 2008; Heise in sod., 2005), ki se razlikujejo v ureditvi protofilamentov. α-Sinuklein naj bi bil v protofilamentu fibrile zvit v 5-slojni β1-zanka-β2-zanka-β3-zanka-β4-zanka-β5 β-sendvič, ki tvori 5 slojev paralelnih β-ravnin (slika 6) (Vilar in sod., 2008).

#### 2.5.3 Vpliv različnih faktorjev na fibrilacijo

Na agregacijo in/ali fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina vplivajo številni endogeni in eksogeni faktorji, ki lahko neposredno modificirajo protein, ali pa je njihov učinek posreden preko vpliva na okolico proteina (Uversky, 2007). Fizikalno-kemijski faktorji lahko stabilizirajo različne delno zvite konformacije  $\alpha$ -sinukleina, kar vodi v tvorbo raznolikih agregatov (Breydo in sod., 2012). Kot že omenjeno, predstavlja ključni korak fibrilacije nastanek delno zvitega intermediata, ki teži k agregaciji, oz. nastanek nukleacijskega *jedra*. Hitrost tega procesa pa je odvisna od mnogih dejavnikov. Faktorji, ki povečajo koncentracijo delno zvitega intermediata, favorizirajo agregacijo (Fink, 2006). Na splošno velja, da manjši celokupni naboj, večja hidrofobnost in večja nagnjenost k pretvorbi  $\alpha$ -vijačnice v  $\beta$ -strukturo povečujejo nagnjenost proteinov k fibrilaciji (Breydo in sod., 2012; Dobson, 1999).

Faktorji, ki premaknejo konformacijsko ravnotežje *in vitro* in promovirajo oligomerizacijo  $\alpha$ -sinukleina so: točkovne PD-mutacije, povečani koncentracija proteina in temperatura, zmanjšan pH, amfifilne molekule (t.j. različne agrokemikalije, kot so herbicidi in pesticidi), kovinski ioni in druge majhne nenabite molekule, nabiti biopolimeri, interakcija z nekaterimi drugimi proteini, postranslacijske modifikacije in nasičeno okolje proteina (Breydo in sod., 2012; Uversky, 2007). Nasprotno pa do inhibicije fibrilacije pride ob stabilizaciji monomernih ali nefibrilarnih oligomernih zvrsti (Uversky, 2003; Uversky, 2007; Fink, 2006). Poznani inhibitorji so kemična modifikacija proteina (oksidacija Met, nitracija Tyr), kateholamini,  $\beta$ - in  $\gamma$ -sinuklein, visoka koncentracija alkoholov in ozmoliti. Vpliv določenih majhnih naravnih spojin na inhibicijo fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina je podrobneje opisan v poglavju 2.7.1. Lipidne membrane lahko pospešijo ali pa inhibirajo fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina (Zhu in sod., 2003).

Vse tri mutacije  $\alpha$ -sinukleina (A30P, A53T, E46K), ki so povezane s PD, pospešijo oligomerizacijo proteina *in vitro*, ne pa nujno tudi fibrilacijo (Conway in sod., 2000; Giasson in sod., 1999; Greenbaum in sod., 2005). To potrjuje hipotezo, da je skupna patogena lastnost  $\alpha$ -sinukleinskih mutacij, povezanih s PD, pospešitev oligomerizacije in ne tvorba zrelih fibril (glej 2.2.2.2). Mutacija A30P zmanjša lokalno  $\alpha$ -vijačno težnjo, kar bi lahko vplivalo predvsem na interakcijo proteina z lipidnimi membranami, medtem ko A53T poveča lokalno  $\beta$ -strukturno težnjo, kar naj bi bilo povezano z zvišano verjetnostjo tvorbe  $\beta$ -strukturiranih agregatov (Bussell in Eliezer, 2001).

α-Sinuklein je podvržen večim postranslacijskim kovalentnim modifikacijam, kot so fosforilacija Ser in Tyr, oksidacija in nitracija Met in Tyr, ubikvitinacija, sumoilacija, encimsko prečno povezovanje s tkivno transglutaminazo in delecija C-terminalnega dela. Za več od teh modifikacij so poročali o vplivu na agregacijo (Breydo in sod., 2012; Schildknecht in sod., 2013). Delecija C-terminalnega dela pospeši tako agregacijo proteina *in vitro* kot patološke spremembe *in vivo* (Murray in sod., 2003; Periquet in sod., 2007). Izražanje skrajšanega proteina je pri miših izzvalo podobne morfološke in nevrokemične simptome kot pri Parkinsonovi bolezni. Žal je težko določiti, ali so takšne posttranslacijske modifikacije vzrok ali posledica bolezenskega stanja (Breydo in sod., 2012).

2.5.3.1 Vpliv daljnosežnih interakcij na fibrilacijo

Monomerni α-sinuklein ima različna konformacijska stanja, ki so stabilizirana s prehodnimi daljnosežnimi interakcijami med C-terminalnim delom ter NAC in ostalo N-terminalno regijo (Bertoncini in sod., 2005; Dedmon in sod., 2005). Predlagali so, da naj bi takšne daljnosežne interakcije ščitile amiloidogeno regijo NAC pred samoasociacijo (Bertoncini in sod., 2005; Dedmon in sod., 2005), vendar pa več novejših raziskav temu nasprotuje (Ulrih in sod., 2008; Ullman in sod., 2011; Rospigliosi in sod., 2009; Sung in Eliezer, 2007). Na osnovi prvotnih NMR študij so poročali, da v A30P in A53T mutantih ni prisotnih dolgosežnih interakcij C/N (Bertoncini in sod., 2005), kar naj bi izpostavljalo NAC regijo vodnemu okolju in tako pospeševalo agregacijo. Vendar pa je nasprotno nadaljna študija pokazala, da so v mutantu E46K, ki fibrilira hitreje kot WT, ti kontakti ojačani, ter nespremenjeni pri A30P in A53T mutantih (Rospigliosi in sod., 2009). Drugi faktorji, ki povečajo kompaktost proteina, so prav tako povzročili povečano agregacijo (McClendon in

sod., 2009), medtem ko so pogoji, ki zmanjšajo dolgosežne interakcije, zmanjšali agregacijo (Sung in Eliezer, 2007; Paleologue in sod., 2008). Tudi fosforilacija Ser129 poruši daljnosežne interakcije, vendar ne pospeši samoasociacije proteina, ampak zelo zmanjša hitrost agregacije (Paleologue in sod., 2008). Tako se zdi, da dolgosežni kontakti morda ne ščitijo  $\alpha$ -sinukleina pred agregacijo in lahko celo pospešijo ta proces (Rospigliosi in sod., 2009).

Ker  $\alpha$ -sinuklein brez C-terminalnega dela (Crowther in sod., 1998; Murray in sod., 2003; Izawa in sod., 2012) ali pa z nevtraliziranimi naboji na C-terminalnem delu (McClendon in sod., 2009; Izawa in sod., 2012) kaže hitrejšo fibrilacijsko kinetiko kot WT protein, se C-terminalnemu delu pripisuje glavna regulacijska vloga pri tvorbi fibril  $\alpha$ -sinukleina. Poleg zastiranja NAC regije bi lahko že sam elektrostatski odboj med zelo kislimi C-terminalnimi deli (Levitan in sod., 2011) ter hitra interna dinamika peptidnega ogrodja (Ahmad in sod., 2012) preprečevali hitro agregacijo  $\alpha$ -sinukleina.

#### 2.5.3.2 Vpliv tirozinskih ostankov na fibrilacijo

Aromatski AK ostanki naj bi imeli pri tvorbi amiloidov pomembno vlogo v molekulskem prepoznavanju in samoasociaciji (Gazit, 2002).  $\alpha$ -Sinuklein ima štiri Tyr ostanke, enega v N-terminalnem delu in tri v C-terminalnem delu (slika 3). Več raziskav je pokazalo na pomembno vlogo Tyr pri fibrilaciji  $\alpha$ -sinukleina. Prvič, poleg elektrostatskih interakcij naj bi bile za intramolekularne kontakte v molekuli  $\alpha$ -sinukleina pomembne tudi hidrofobne interakcije (Bertoncini in sod., 2005). V nedavni MD študiji so pokazali visoko verjetnost daljnosežnih interakcij med regijo v okolici Tyr39 in skupino C-terminalnih Tyr ostankov (Ullman in sod., 2011). Ulrih in sod. (2008) so že pred tem predlagali, da naj bi porušenje teh hidrofobnih intramolekularnih interakcij inhibiralo fibrilacijo proteina. Drugič, modifikacije Tyr ostankov z nitracijo (Yamin in sod., 2003) ali točkovno mutagenezo Tyr ostankov (Ulrih in sod., 2008; Izawa in sod., 2012; Lamberto in sod., 2009) inhibirajo fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina. Poleg sodelovanja v intramolekularnih interakcijah so predlagali tudi sodelovanje Tyr v intermolekularnih interakcijah med rastjo fibril (Izawa in sod., 2012).

#### 2.6 α-SINUKLEIN IN LIPIDNE MEMBRANE

Več dokazov kaže, da ima interakcija med  $\alpha$ -sinukleinom in različnimi celičnimi membranami osrednji pomen pri fiziološki funkciji proteina kot tudi pri vlogi v patogenezi PD (Pirc in Ulrih, 2011; Dikyl in Eliezer, 2012; Pffeferkorn in sod., 2012). V N-terminalnem delu proteina se nahajajo nepopolne ponovitve "xKTK(E/Q)GVxxxx" (George in sod., 1995). Te lahko predvideno tvorijo amfipatično  $\alpha$ -vijačnico, ki je klasični motiv membransko-vezavnih proteinov. V nevronih se  $\alpha$ -sinuklein nahaja v bližini presinaptične membrane (Iwai in sod., 1995), kjer naj bi sodeloval pri transportu sinaptičnih veziklov in prenosu nevrotransmiterja. V transgenih miših izbitje  $\alpha$ -sinukleinskega gena sicer ni letalno, so pa v teh študijah in raziskavah na nevronskih kulturah poročali o spremenjenem sproščanju in privzemu dopamina ter zmanjšani rezervi in spremembah v recikliranju sinaptičnih vezikov (Abeliovich in sod., 2000; Yavich in sod., 2004; Murphy in sod., 2000; Cabin in sod., 2002). Patologija PD bi lahko bila povezana s spremembo ali porušenjem nativne interakcije med  $\alpha$ -sinukleinom in membrano. Študije *in vitro* kažejo, da mutacije gena *SNCA* vplivajo na agregacijo in interakcijo  $\alpha$ -sinukleina z lipidi (Perrin in sod., 2000;
Jo in sod., 2000). Citotoksični mehanizem  $\alpha$ -sinukleina bi lahko vključeval neposredno interakcijo med agregiranim proteinom in celično membrano, kar poškoduje membrano (Volles in sod., 2001; Lashuel in sod., 2002; Ding in sod., 2002; Quist in sod., 2005; Stöckl in sod., 2013).

Davidson in sod. (1998) so prvi pokazali, da se homolog človeškega  $\alpha$ -sinukleina, protein sinelfin iz možganov kanarčka, veže na lipidne vezikle, ob čemer pride do strukturne pretvorbe proteina iz neurejene v delno  $\alpha$ -vijačno strukturo. To je sprožilo niz študij o molekulski naravi asociacije med proteinom in lipidnimi membranami. Kljub intenzivnim raziskavam interakcija med  $\alpha$ -sinukleinom in membranami trenutno predstavlja enega najspornejših področij v proučevanju tega proteina, saj so v številnih študijah poročali o včasih tudi popolnoma nasprotujočih si rezultatih (Fink, 2006; Dikyl in Eliezer, 2012; Pfefferkorn in sod., 2012).

### 2.6.1 Modelne lipidne membrane

V biofizikalnih raziskavah interakcije med proteini in lipidnimi membranami se uporabljajo različni poenostavljeni membranski modeli. Osnovni gradniki lipidnega dvosloja so fosfolipidi, ki se zaradi amfipatične narave v vodnem okolju spontano združujejo v lipidne vezikle (generično poimenovani tudi liposomi). Pri tem ostanejo polarne glave fosfolipidov v stiku z vodnim okoljem, hidrofobne acilne verige pa tvorijo notranjost lipidnega dvosloja. Lipidi z eno samo maščobno verigo, kot so detergenti, spontano agregirajo v micele. Nevtralna pogosto uporabljana fosfolipida sta fosfatidil holin (PC) in fosfatidil etanolamin (PE). Negativno nabiti fosfolipidi pa so fosfatidna kislina (PA), fosfatidil glicerol (PG), fosfatidil serin (PS) in fosfatidil inozitol (PI) (Valenzuela, 2007). Temperatura faznega prehoda ( $T_m$ ) v membrani je odvisna od kemijske narave lipidov in narašča z nasičenostjo in daljšanjem nepolarne verige (Atkins in de Paula, 2006).

Liposomi lahko varirajo v velikosti in lamelarnosti (lamelarnost se nanaša na število nastalih dvoslojev v liposomu). Za opis liposomov se v literaturi pogosto uporabljajo naslednji pojmi: (i) multilamelarni vezikli (ang. multilamellar vesicles; MLV), ki ponavadi vsebujejo 5 ali več lamel in imajo premer 0,1 - 10  $\mu$ m; (ii) majhni unilamelarni vezikli (ang. small unilamellar vesicles; SUV) s premerom 10 - 100 nm; (iii) veliki unilamelarni vezikli (ang. large unilamellar vesicles; LUV) s premerom 100 nm - 1  $\mu$ m; in (iv) vezikli celičnih velikosti (ang. giant unilamellar vesicles; GUV) s premerom večjim od 1  $\mu$ m (slika 7). Unilamelarni vezikli predstavljajo odlično alternativo biomembranam, saj je z njimi preprosto manipulirati in jih lahko pripravimo v različnih velikostih ter z različno kemijsko sestavo. SUV tako predstavljajo dober modelni sistem za majhne transportne vezikle, kot so sinaptični vezikli (Pfefferkorn in sod., 2012).



Slika 7: Strukture lipidnih in membranskih modelov. Prikazane so približne velikosti in organizacija modelnih lipidnih membran, ki se pogosto uporabljajo v biofizikalnih raziskavah. Za relativno primerjavo velikosti so navedeni tudi celični razdelki (Pfefferkorn in sod., 2012).

Figure 7: Lipid and membrane mimic structure. Shematic of the approximate size and organization of membrane mimics commonly used in biophysical research. Corresponding cellular compartments are provided for relative size reference (Pfefferkorn et al., 2012).

### 2.6.2 Značilnosti interakcije med α-sinukleinom in lipidnimi membranami

Za vezavo  $\alpha$ -sinukleina na izolirane membrane možganskih tkiv niso potrebni dodatni proteini (Kubo in sod., 2005). Trenutno je splošno sprejeto, da se  $\alpha$ -sinuklein preferenčno veže s SUV, ki vsebujejo negativno nabite polarne glave (Davidson in sod., 1998) ali strukturne nepravilnosti (Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006), in da po vezavi zavzame strukturo  $\alpha$ -vijačnice (Davidson in sod., 1998; Jo in sod., 2000; Nuscher in sod., 2004). Poleg vezave  $\alpha$ -sinukleina z anionskimi sintetičnimi fosfolipidnimi vezikli (Davidson in sod., 1998; Jo in sod., 2000), so pokazali tudi vezavo z miceli NaDS (Eliezer in sod., 2001), maščobnimi kislinami (Sharon in sod., 2001), možganskimi vezikli (Jensen in sod., 1998) in lipidnimi kapljicami (Cole in sod., 2002).

Vezava z lipidnimi membranami naj bi bila relativno šibka (Fortin in sod., 2004; Kahle in sod., 2000; Rhoades in sod., 2006; Bussell in Eliezer, 2004; Mihajlovic in Lazaridis, 2008). Nasprotno so poročali tudi o močni asociaciji med proteinom in anionskimi SUV, kar bi lahko kazalo, da je ravnotežje v okolju sinapse močno premaknjeno k lipidno-vezanem stanju proteina (Bodner in sod., 2009). Vezava  $\alpha$ -sinukleina na membrano lahko vodi v permeabilizacijo dvosloja s tvorbo pore ali prevodnih ionskih kanalčkov (Volles in sod., 2001; Kim in sod., 2009; Zhu in sod., 2003; van Rooijen in sod., 2009; Zakharov in sod., 2007). Alternativno so predlagali, da protein preoblikuje membrano, kar se kaže v brstenju in tubulaciji veziklov (Varkey in sod., 2010; Pandey in sod., 2011; Mizuno in sod., 2012). To bi lahko podpiralo možno vlogo proteina v remodelaciji membrane, potrebne pri fuziji in fiziji veziklov. Lipidne membrane lahko vplivajo tudi na agregacijo  $\alpha$ -sinukleina, in sicer lahko inhibirajo fibrilacijo (Martinez in sod., 2007; Zhu in Fink, 2003; Narayanan in Scarlata, 2001), kot tudi pospešijo agregacijo (Jo in sod., 2000; Lee in sod., 2002; Cole in sod., 2002; Zhu in sod., 2003).

2.6.2.1 Vpliv različnih faktorjev na interakcijo med α-sinukleinom in membranami

Interakcije med  $\alpha$ -sinukleinom in membrano so preučevali z različnimi tehnikami, kot so na primer CD spektroskopija, gelska kromatografija, intrinzična fluorescenca Tyr ali fluorescenca vstavljenega Trp, fluorescenca membransko vstavljenih ali na lipide vezanih prob, fluorescenčna korelacijska spektroskopija (FCS), kalorimetrija, NMR in EPR. Vezava  $\alpha$ -sinukleina z lipidno membrano vpliva na lastnosti proteina in membrane, pri asociaciji pa naj bi bile pomembne tako elektrostatske kot hidrofobne interakcije (Zhu in Fink, 2003; Zhu in sod., 2003; Mihajlovic in Lazaridis, 2008).

Ključno vlogo pri uravnavanju interakcije naj bi imelo več faktorjev (Shvadchak in sod., 2011a):

- naboj membrane (prisotnost ionske polarne glave) (Davidson in sod., 1998; Jo in sod., 2000; Stöckl in sod., 2008; Haque in sod., 2010; Drescher in sod., 2008),
- narava polarne glave,
- o fazno stanje membrane (temperatura, sestava acilnih verig, vsebnost holesterola),
- ukrivljenost membrane (velikost in tip modelne membrane) (Davidson in sod., 1998; Narayanan in Scarlata, 2001; Rhoades in sod., 2006),
- elektroliti v raztopini (ionska moč, sestava, pH) (Davidson in sod., 1998; Jo in sod., 2000; Zhu in sod., 2003),
- kinetika vezave proteina, disociacija in konformacijska preureditev na vodno-lipidni medfazi,
- $\circ$  masno/molsko razmerje med  $\alpha$ -sinukleinom in lipidi (Zhu in Fink, 2003; Bodner in sod., 2009).

Začetne študije in tudi nekatere nedavne so pokazale, da ima  $\alpha$ -sinuklein v primerjavi z LUV in MLV mnogo večjo afiniteto do manjših SUV (Davidson in sod., 1998; Jo in sod., 2000; Zhu in sod., 2003; Zhu in Fink, 2003; Narayanan in Scarlata, 2001; Middleton in Rhoades, 2010; Shvadchak in sod., 2011b; Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006). Preferenčno vezavo s SUV so pripisali defektom v pakiranju lipidov v močno ukrivljeni membrani (Nusher in sod., 2004), vendar pa točna korelacija med ukrivljenostjo membrane in načinom vezave proteina ni znana. Tudi predlagana funkcija  $\alpha$ -sinukleina je povezana z vezavo na podobno ukrivljene sinaptične vezikle (Nuscher in sod., 2004). V nasprotju s temi ugotovitvami so v novejših študijah pokazali vezavo na modelne membrane različnih ukrivljenosti (Middelton in Rhoades, 2010; Kjaer in sod., 2009; Jo in sod., 2000; Zhu in sod., 2003; Madine in sod., 2008; van Rooijen in sod., 2008; Rhoades in sod., 2006; Narayanan in Scarlata, 2001; Ramakrishnan in sod., 2003; Stöckl in sod., 2008; Trexler in Rhoades, 2009; Pfefferkorn in Lee, 2010), tudi planarne dvosloje in monosloje (Haque in sod., 2010; Pandey in sod., 2009; Di Pasquale in sod., 2010).

 $\alpha$ -Sinuklein bi lahko zaznaval ukrivljenost membrane (ang. *curvarture-sensing protein*) (Middelton in Rhoades, 2010). To bi lahko bilo pomembno tako v fiziologiji kot patologiji proteina (Pfefferkorn in sod., 2012), saj ukrivljenost membrane vpliva tudi na konformacijo  $\alpha$ -vijačne regije proteina (glej 2.6.3). Za amfipatično  $\alpha$ -vijačnico je značilna neuravnotežena porazdelitev AK ostankov, ki se odraža v njihovi ločbi na polarno in nepolarno stran  $\alpha$ -vijačnice (Ulmer in sod., 2005; Bodner in sod., 2009; Bodner in sod., 2010). Takšna ureditev

je podobna t.i. ALPS motivom (ang. *amphipathic lipid-packing sensor motifs*), ki zaznavajo ukrivljenost membrane in jih najdemo v različnih proteinih (Drin in Antonny, 2010; Antonny, 2011). Ti motivi zaradi neskladnosti med ukrivljenostjo dvosloja in geometrijo lipidov, preko obsežnih hidrofobnih AK zaznajo defekte v pakiranju lipidov (Drin in sod., 2007). Kljub razlikam v primarni strukturi lahko tako  $\alpha$ -sinuklein kot APLS motivi zaznavajo ukrivljenost membrane (Pranke in sod., 2011).

Kljub splošnemu konsenzu o afiniteti  $\alpha$ -sinukleina za negativno nabite fosfolipide pa ostaja vprašanje, ali je prisotnost anionske membrane nujna ali preferirana (Perrin in sod., 2000; Nuscher in sod., 2004; Jo in sod., 2000; Zhu in sod., 2003; Davidson in sod., 1998; Zhu in Fink, 2003; Rhoades in sod., 2006; Narayanan in Scarlata, 2001; Ramakrishnan in sod., 2003; Stöckl in sod., 2008; Middelton in Rhoades, 2010). Preferenca α-sinukleina za anionsko površino naj bi izhajala iz elektrostatskega privlaka med številnimi pozitivno nabitimi Lys v N-terminalni regiji proteina ter negativno nabitimi lipidi (Rhoades in sod., 2006; van Rooijen in sod., 2008). Vendar pa protein obdrži znaten del  $\alpha$ -vijačne strukture tudi pri zelo visoki ionski jakosti (tudi pri 1,5 M NaCl, ki naj bi popolnoma zamaskiral naboj lipidov), kar kaže, da so poleg elektrostatskih interakcij za stabilizacijo vezave med proteinom in membrano potrebne še dodatne sile (Davidson in sod., 1998; Zhu in sod., 2003). Ena izmed razlag bi lahko bila, da vezavo olajša prisotnost manjše lipidne glave, ki omogoči več prostora za insercijo proteina brez preurejanja membrane. Poročali so namreč, da protein preferira PA in PI pred PS in PG (Jo in sod., 2000; Perrin in sod., 2000; Zhu in sod., 2003; Middleton in Rhoades, 2010; Rhoades in sod., 2006; Shvadchak in sod., 2011b). Vendar so nasprotno poročali tudi o minimalni specifičnosti za določeno anionsko glavo, pri čemer je protein enako učinkovito prepoznal PS kot PA in PI (Zhu in Fink, 2003), ali pa je imel podobno afiniteto za PA in PG pred PS (Wang in sod., 2010).

Da interakcije  $\alpha$ -sinukleina z lipidi ne moremo pripisati zgolj elektrostatskim interakcijam, bi lahko potrdile študije, v katerih so pokazali vezavo proteina z vezikli brez neto negativnega naboja (Narayanan in Scarlata, 2001; Rhoades in sod., 2006). Kljub temu pa je potrebno poudariti, da trenutno asociacija proteina z nevtralnimi lipidi ni jasna, saj so poleg poročanja o močni ali šibki vezavi, poročali tudi, da je sploh ni (Nuscher in sod., 2004; Jo in sod., 2000; Davidson in sod., 1998; Perrin in sod., 2000; Zhu in Fink, 2003; Rhoades in sod., 2006; Narayanan in Scarlata, 2001; Ramakrishnan in sod., 2003). Predlagali so, da se αsinuklein šibko veže na nevtralne DPPC vezikle preko elektrostatskih interakcij med negativno nabitim C-terminalnim delom proteina in pozitivno nabito skupino holina, ob čemer pa ne pride do tvorbe vijačne strukture (Zhu in sod., 2003). Prisotnost nevtralnih lipidov, še posebej PE, v mešanici z anionskimi lipidi lahko dodatno ojača vezavo (Bussell in Eliezer, 2004; Davidson in sod., 1998; Jo in sod., 2000; Chandra in sod., 2003; Ramakrishnan in sod., 2003). Čeprav imata PE in PC podobne elektrostatske lastnosti, pa se razlikujeta v orientaciji lipidne glave, pakiranju v dvosloju in sposobnosti tvorbe H-vezi. Ko so nevtralne lipidne glave tesno pakirane, tvori PE lipidni monosloj z močno negativno ukrivljeno membrano. α-Sinuklein bi lahko sprostil ta negativni stres ukrivljenosti in tako stabiliziral PE/anionske lipidne vezikle (Jo in sod., 2000).

Kljub temu, da je vsebnost vijačne strukture mnogo manjša v pufru in v prisotnosti nevtralnih membran (Davidson in sod., 1998; Zhu in Fink; 2003), pa so poročali o tvorbi  $\alpha$ -vijačnice po vezavi proteina na nevtralne SUV, ko se ti nahajajo v tekočem urejenem stanju (pod T<sub>m</sub>;

faza gela), ne pa v tekočem neurejenem stanju (Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006). Ključno vlogo pri vezavi  $\alpha$ -sinukleina na DPPC vezikle naj bi imela velika ukrivljenost membrane (Nuscher in sod., 2004). Vezava  $\alpha$ -sinukleina je povzročila zvišanje temperature in kooperativnosti faznega prehoda, kar so avtorji pripisali zmanjšanju strukturnega stresa v zelo ukrivljeni membrani (Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006). Večjo afiniteto proteina za fazo gela kot za tekočo neurejeno fazo so pokazali tudi s FCS. Protein je imel veliko večjo afiniteto za LUV sestavljene iz DPPC:DPPG kot za POPG:POPC. Ta vpliv je bil še večji pri nevtralnih veziklih, kjer je bila afiniteta za DPPC dosti večja kot za POPC, kamor se protein skoraj ni vezal (Middelton in Rhoades, 2010). Nasprotno so prav tako z uporabo FSC pokazali zmerno vezavo proteina s POPC vezikli (Rhoades in sod., 2006). Interakcije  $\alpha$ -sinukleina z nevtralnimi membranami niso zasledili z uporabo mikroskopije in GUV iz DOPC (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin) (Stöckl in sod., 2008) ter CD spektroskopije s POPC vezikli (Pffeferkorn in Lee, 2010).

Tudi struktura lipidne verige lahko vpliva na vezavo  $\alpha$ -sinukleina z membrano (Middleton in Rhoades, 2010; Shvadchak in sod., 2011b; Kjaer in sod., 2009). Poročali so, da  $\alpha$ sinuklein preferenčno interagira z membranami v tekoči neurejeni fazi (Stöckl in sod., 2008; van Rooijen in sod., 2008; Kjaer in sod., 2009). Za interakcijo so še posebej ugodne polinenasičene verige (Kubo in sod., 2005; Perrin in sod., 2001). Močno neurejene polinenasičene verige povzročijo ohlapno pakiranje membranskih lipidov, kar bi lahko vodilo do strukturnih nepravilnosti in s tem večjega prostora za vstavitev α-sinukleina v dvosloj. Po drugi strani pa so poročali tudi, da se protein z večjo afiniteto veže na domene, ki so podobne lipidnim raftom (Kubo in sod., 2005; Fortin in sod., 2004). Lipidni rafti so tekoče urejene membranske domene z visoko vsebnostjo holesterola in sfingomielina, pa tudi gangliozidov (glej 2.6.5), in so domnevno vpleteni v številne celične procese (Brown in London, 1998; Simons in Ikonen, 1997). Obstoj lipidnih raftov in vivo je zelo vprašljiv, saj predstavlja njihov prikaz v živih celicah velik izziv (Lagerholm in sod., 2005). Nasprotno so z uporabo GUV in konfokalne laserske vrstične mikroskopije pokazali, da se  $\alpha$ -sinuklein namesto na lipidne rafte veže na anionske lipide v tekoči neurejeni fazi (Stöckl in sod., 2008). Tako ostaja prisotnost  $\alpha$ -sinukleina v lipidnih raftih precej kontroverzna.

Tudi sposobnost α-sinukleina, da poškoduje lipidne dvosloje ali inducira agregacijo *in vitro*, kar naj bi bil mehanizem njegove toksičnosti v PD (Jo in sod., 2000; Zhu in sod., 2003; Bodner in sod., 2009; Volles in Lansbury, 2002; Madine in sod., 2008; Zhu in Fink, 2003; van Rooijen in sod., 2008; van Rooijen in sod., 2009), je odvisna od sestave lipidov. α-Sinuklein lahko inducira lateralno segregacijo lipidov v mešanih membranah (Madine in sod., 2006). Vezava na membrano bi lahko inhibirala prileganje in fuzijo veziklov, kot tudi povzročila združevanje veziklov zaradi nagnjenosti α-sinukleina k agregaciji in tako pripomogla k njegovi patogenezi (Gitler in sod., 2008).

## 2.6.2.2 Vloga N-terminalnega dela pri vezavi na membrano

Ključno vlogo pri prepoznavanju lipidne membrane in kooperativni tvorbi  $\alpha$ -vijačnih domen naj bi imela N-terminalna regija  $\alpha$ -sinukleina (Eliezer in sod., 2001; Bartels in sod., 2010; Lorenzen in sod., 2014). To naj bi veljalo tako za monomerni kot oligomerni  $\alpha$ -sinuklein (Lorenzen in sod., 2014). Tudi vse tri mutacije, povezane s PD, se nahajajo v N-terminalni regiji (slika 3), kar kaže na pomembnost te domene za normalno funkcijo  $\alpha$ -sinukleina (Bendor in sod., 2013). Mutacija A30P, in v nekoliko manjšem obsegu A53T, motita  $\alpha$ vijačno strukturo  $\alpha$ -sinukleina (Bussell in Eliezer, 2001), čeprav njun vpliv na konformacijo membransko-vezanega proteina ni signifikanten (Bussell in Eliezer, 2004). Za vezavo E46K mutanta na negativno nabite vezikle je potrebno višje razmerje med proteinom in lipidi kot v primeru proteina divjega tipa (Choi in sod., 2004).

Vezava  $\alpha$ -sinukleina na lipidne membrane bi lahko bila dvo-stopenjski proces, pri katerem regija 3 - 25 najprej zasidra protein na membrano, nato pa AK ostanki 25 - 100 tvorijo  $\alpha$ -vijačno strukturo (Bodner in sod., 2010; Bartels in sod., 2010). Do strukturne pretvorbe prvih 25 N-terminalnih AK ostankov lahko pride simultano zaradi elektrostatskega privlaka in spremembe v urejenosti lipidov (Bartels in sod., 2010). Delecija prvih nekaj N-terminalnih AK je v kvasovkah znižala toksičnost  $\alpha$ -sinukleina, medtem ko je prišlo do popolne izgube citotoksičnosti po odstranitvi AK ostankov 2 - 11 (Vamvaca in sod., 2009). To kaže na neposredno povezavo med toksičnostjo proteina in njegovo afiniteto do membrane. Odstranitev ostankov 2 - 11 je preprečila vezavo proteina na izolirane mitohondrije (Robotta in sod., 2012) ter vezavo na in permeabilizacijo negativno nabitih LUV (Lorenzen in sod., 2014).

V nasprotju z N-terminalno membransko vezano domeno je C-terminalni del polaren, z velikim deležem negativno nabitih AK ostankov. Pri določenih pogojih lahko C-terminalni del vpliva na vezavo na membrano (Shvadchak in sod., 2011c; Sevcsik in sod., 2011).

### 2.6.3 Struktura membransko vezanega α-sinukleina

Kljub številnim raziskavam je struktura membransko vezanega  $\alpha$ -sinukleina nejasna in kontradiktorna. Splošno je sprejeto, da vezava  $\alpha$ -sinukleina na anionske membrane inducira zvitje prvih ~100 N-terminalnih AK v amfipatično  $\alpha$ -vijačnico, medtem ko C-terminalni del ostane nestrukturiran (Bisaglia in sod., 2005; Bussel in Eliezer, 2003; Chandra in sod., 2003; Davidson in sod., 1998; Eliezer in sod., 2001; Ulmer in sod., 2005). Vendar pa so natančna interakcijska mesta ter ureditev  $\alpha$ -vijačnice nejasni.

*In vivo* naj bi vezavno tarčo  $\alpha$ -sinukleina predstavljali sinaptični vezikli, katerim se *in vitro* s površinsko topologijo najbolj približajo sintetični lipidni vezikli (SUV). Ker pa je določitev strukture proteinov z visoko-resolucijsko NMR omejena z velikostjo molekul/molekulskih kompleksov, študija vezave  $\alpha$ -sinukleina na vezikle ni mogoča (Georgieva in sod., 2008). Primernejši so miceli, ki imajo približno  $10 \times$  manjši premer (5 nm) kot sinaptični vezikli. V prvi NMR študiji so Eliezer in sod. (2001) sicer uspeli okarakterizirati konformacijo  $\alpha$ -sinukleina, vezanega tako na micele kot na POPA/POPC vezikle, pri čemer je ista N-terminalna regija tvorila  $\alpha$ -vijačnico (Eliezer in sod., 2001).

NMR študije so pokazale, da α-sinuklein po vezavi na micele tvori dve ukrivljeni antiparalelni α-vijačnici (slika 8) (Bussell in Eliezer, 2003; Chandra in sod., 2003; Ulmer in sod., 2005; Bisaglia in sod., 2005; Borbat in sod., 2006; Bussell in sod., 2005). Nasprotno pa ostaja predmet debate struktura proteina vezanega na fiziološko relevantnejše lipidne vezikle. Pri dvojno frekvenčno pulzirajoči EPR (DEER; ang. double electron-electron resonance) in metodi prenosa energije z resonanco fluorescence (smFRET; ang. singlemolecule fluorescence resonance energy transfer) merimo razdalje med posameznimi regijami membransko-vezanega proteina. Z uporabo teh dveh tehnik so pokazali, da αsinuklein na lipidnem veziklu zavzame podobno strukturo kot na micelu (Bortolus in sod., 2006; Borbat in sod., 2006; Drescher in sod., 2008) ali pa eno iztegnjeno α-vijačnico (slika 8) (Ferreon in sod., 2009; Trexler in Rhoades, 2009, Georgieva in sod., 2008; Jao in sod., 2004; Jao in sod., 2008).



Slika 8: Strukture membransko-vezanega  $\alpha$ -sinukleina. Sekundarna struktura  $\alpha$ -sinukleina ob vezavi na micel NaDS (model prekinjene vijačnice) (Ulmer in sod., 2005) in SUV (model iztegnjene vijačnice) (Jao in sod., 2008). Pri strukturi na micel vezanega  $\alpha$ -sinukleina sta prikazani obe ukrivljeni  $\alpha$ -vijačnici (Val<sup>3</sup>-Val<sup>37</sup> in Lys<sup>45</sup>-Thr<sup>92</sup>), povezani z iztegnjeno zanko ter nestrukturiran C-terminalni del. Označene so pozicije Tyr ostankov. Sliko smo pridobili v PDB (številka dostopa 1XQ8).

Figure 8: Structures of membrane bound  $\alpha$ -synuclein. Structures of SDS micelle-bound  $\alpha$ -synuclein (bent helix model) (Ulmer et al., 2005) and SUVs (elongated helix model) (Jao et al., 2008). Structure of  $\alpha$ -synuclein bound to SDS micelles consists of two curved  $\alpha$ -helices (Val<sup>3</sup>-Val<sup>37</sup> and Lys<sup>45</sup>-Thr<sup>92</sup>), connected by extended linker and the disordered C-terminus. The positions of Tyr residues are highlighted. The image was generated from the PDB (accession number 1XQ8).

Vzrok za strukturni polimorfizem membransko-vezanega  $\alpha$ -sinukleina bi lahko bil v uporabi različnih membranskih modelov (miceli, biceli in vezikli) in pogojev raztopine (Pfefferkorn in sod., 2012; Trexler in Rhoades, 2009). Tudi uporaba različnih molarnih razmerij med lipidi in proteinom (R) lahko vpliva na način vezave (Bodner in sod., 2009; Georgieva in sod., 2010). Glede na dinamično naravo  $\alpha$ -sinukleina, ki proteinu omogoča obsežne konformacijske preureditve (Allison in sod., 2009; Lee in sod., 2007), je možno, da prihaja do preklapljanja med različnimi membransko-vezanimi konformacijami (Georgieva in sod., 2010).  $\alpha$ -Sinuklein bi se lahko vezal na lipidne membrane tudi v obliki oligomerov, ki lahko

tvorijo membranske pore z  $\alpha$ -vijačno (Zakharov in sod., 2007) ali  $\beta$ -strukturo (Kim in sod., 2009).

### 2.6.3.1 11/3 periodičnost α-vijačnice

N-terminalna regija  $\alpha$ -sinukleina vsebuje 7 nepopolnih 11-mernih ponovitev s konsenznim zaporedjem KTKEGV (slika 3A), podobnem motivom pri apolipoproteinih. Te amfifilne ponovitve bogate z Lys in Thr predstavljajo *vroče točke* pri vezavi proteina na membrano (Rao in sod., 2009). Sprva teoretično predlagani model 5 amfipatičnih  $\alpha$ -vijačnic (Davidson in sod., 1998) so ovrgle strukturne študije  $\alpha$ -sinukleina na micelih ali SUV, ki so pokazale tvorbo dveh ali ene amfipatične  $\alpha$ -vijačnice. Predlagali so, da N-terminalni del ob vezavi na membrano zavzame nekoliko razvito 11/3  $\alpha$ -vijačnico, ki omogoča optimizacijo amfipatičnosti (Bussell in Eliezer, 2003; Bussell in sod., 2005; Jao in sod., 2004; Mihajlovic in Lazaridis, 2008). Pri 11/3 periodičnosti  $\alpha$ -vijačnici 18 AK tvori 5 polnih obratov (3,6 AK na obrat) (Bussel in Eliezer, 2003). V 11/3  $\alpha$ -vijačnici so hidrofobni ostanki in serija treoninov v kontaktu z membrano, kisli Glu so izpostavljeni topilu, bazični Lys pa se nahajajo na vodno-lipidni medfazi (slika 9) (Mihajlovic in Lazaridis, 2008).



Slika 9: Vijačno kolo α-sinukleina. Bazični ostanki so označeni z modro barvo, kisli z rdečo, polarni nenabiti z vijolično in nepolarni s črno barvo (Bendor in sod., 2013).

Figure 9:  $\alpha$ -Synuclein's helical wheel. Blue indicates basic, red acidic, purple polar uncharged, and black nonpolar residues (Bendor et al., 2013).

#### 2.6.3.2 NMR struktura α-sinukleina vezanega na micel

Ob vezavi na micele iz NaDS tvori α-sinuklein dve ukrivljeni in antiparalelni α-vijačnici: vijačnico-N (Val<sup>3</sup> - Val<sup>37</sup>) in vijačnico-C (Lys<sup>45</sup> - Thr<sup>92</sup>) (slika 8). Vijačnici sta povezani z dobro urejeno 7-AK zanko, vijačnici-C pa sledi kratka podaljšana regija Gly<sup>93</sup> - Lys<sup>97</sup>. C-terminalna regija (Asp<sup>98</sup> - Ala<sup>140</sup>) je večinoma nestrukturirana in zelo mobilna (Ulmer in sod., 2005). Tudi druge neodvisne študije so pokazale tvorbo dveh α-vijačnih regij v N-terminalnem delu, ki sta prekinjeni z zanko okoli mesta 42 (Bisaglia in sod., 2005; Bussel in Eliezer, 2003; Chandra in sod., 2003). Do prekinitve α-vijačnice bi lahko prišlo zaradi velike ukrivljenosti micelov, zato se dopušča možnost, da ob vezavi na manj ukrivljene membrane (t.j. sinaptične vezikle) α-sinuklein tvori eno neprekinjeno α-vijačnico (Ulmer in sod., 2005).

Ukrivljenost  $\alpha$ -vijačnice je tudi manjša kot predpostavljena ukrivljenost micela, kar bi prav tako lahko kazalo na preferenčno vezavo na manj ukrivljene SUV. Interakcija Lys ostankov proteina z negativno nabitimi glavami NaDS bi lahko povzročila deformacijo micela iz globularne v elipsoidno strukturo. Vijačnici sta bližje idealni 18/5  $\alpha$ -vijačnici kot predlagani 11/3  $\alpha$ -vijačnici. Določene regije  $\alpha$ -vijačnice so mobilnejše (ostanki 30 - 37, 65 - 70 in 83 - 89), kar kaže na neko stopnjo nestabilnosti (Ulmer in sod., 2005).

Preučevali so tudi strukturo patogenih  $\alpha$ -sinukleinskih mutantov vezanih na micele NaDS. Medtem ko se struktura mutanta A53T ni razlikovala od proteina divjega tipa (Ulmer in Bax, 2005), so strukturne razlike med WT in E46K slabo določene (Fredenburg in sod., 2007). Nasprotno je zamenjava A30P močno vplivala na strukturo  $\alpha$ -vijačnice, vendar pa ni preprečila vezave proteina na micele NaDS (Ulmer in Bax, 2005).

2.6.3.3 Vezava α-sinukleina na vezikle: prekinjena ali iztegnjena α-vijačnica?

Prvi eksperimentalni dokaz za obstoj neprekinjene vijačnice  $\alpha$ -sinukleina vezanega na SUV so podali Jao in sod. (2004), ki so z EPR določili sekundarno strukturo ter topologijo regije 59 - 90. Spinsko označen  $\alpha$ -sinuklein naj bi tvoril iztegnjeno 11/3 vijačnico, ki jo predvideva AK zaporedje (Jao in sod., 2004). Z nadaljnimi DEER eksperimenti in računalniškim modeliranjem so potrdili, da iztegnjeno, ukrivljeno  $\alpha$ -vijačnico, ki se razteza paralelno na membrano, tvorijo AK ostanki 9 - 89. Ukrivljenost vijačnice se ujema z ukrivljenostjo vezikla, center vijačnice pa se nahaja tik pod fosfatnimi skupinami lipidov (slika 8). To omogoča interakcijo Lys s fosfati, negativno nabiti ostanki se nahajajo na hrbtni strani vijačnice na poziciji holinskih skupin lipidov, nenabiti ostanki pa prodirajo v regijo acilnih verig (Jao in sod., 2008).

S povečevanjem velikosti micela, na katerega je vezan  $\alpha$ -sinuklein, pride do povečevanja razdalje med vijačnicama. To je skladno z opažanji, da topologija micela močno vpliva na relativno razporeditev obeh vijačnic (Borbat in sod., 2006). Vendar pa dobro urejena konformacija zanke kaže na definirano interakcijo med proteinom in lipidnimi površinami in bi morda lahko v primeru vezave  $\alpha$ -sinukleina na sinaptične vezikle z večjim premerom delovala kot stikalo med strukturo prekinjene ter neprekinjene vijačnice (Ulmer in sod., 2005). Z EPR spektroskopijo in MD simulacijo so pokazali, da regija 35 - 43 oz. 31 - 52 αsinukleina tako na NaDS micelih kot SUV kaže težnjo po prekinitvi vijačnice, kar izključuje strukturo neprekinjene vijačnice okoli ostanka 40 (Bortolus in sod., 2008). Tudi Drescher in sod. (2008) predlagajo, da  $\alpha$ -sinuklein ob vezavi na vezikle tvori dve antiparalelni vijačnici, čeprav bi velikost veziklov omogočala tudi strukturo ene same neprekinjene  $\alpha$ -vijačnice. To kaže na preferirano konformacijo ukrivljene strukture α-sinukleina tudi na večjih veziklih (Drescher in sod., 2008). Prav tako z uporabo EPR so nasprotno pokazali, da  $\alpha$ -sinuklein tako v prisotnosti SUV kot tudi bicelov (lipidni dvosloji v obliki diska, ki jih sestavljajo dolgoverižni fosfolipidi obkroženi s slojem kratkoverižnih molekul detergenta) tvori eno iztegnjeno α-vijačnico. Regija prekinitve bi lahko omogočala preklapljanje med obema konformacijama (Georgieva in sod., 2008; Georgieva in sod., 2010). Na tip vijačnice naj bi vplivalo predvsem razmerje med lipidi/detergenti in proteinom, ob čemer višja razmerja inducirajo tvorbe ene vijačnice, nižja pa soobstoj enojne in prekinjene vijačnice (Georgieva in sod., 2010).

Z uporabo smFRET in  $\alpha$ -sinukleina, označenega z maleimidnimi fluorofori, so pokazali, da protein na zelo ukrivljenih micelih tvori antiparalelni vijačnici, medtem ko ob vezavi na 100nm LUV tvori eno iztegnjeno vijačnico, kar zopet izpostavlja vpliv ukrivljenosti membrane na strukturo  $\alpha$ -sinukleina (Trexler in Rhoades, 2009). SmFRET so uporabili tudi za dokaz preklapljanja med strukturo prekinjene in iztegnjene  $\alpha$ -vijačnice, inducirane ob vezavi proteina na NaDS ali SUV. Do preklopa med obema vijačnima strukturama lahko pride ob spremembi ukrivljenosti membrane ali spremembi koncentracije vezavnih partnerjev. Že majhen delež negativnih lipidov v veziklih, podoben tistemu v bioloških membranah, je zadosten za vezavo in zvitje  $\alpha$ -sinukleina v iztegnjeno vijačnico (Ferreon in sod., 2009).

Strukturo membransko vezane N-terminalne domene (ostanki 1 - 95) so določili tudi z računalniško MD simulacijo. Na planarni membrani je fragment tvoril ukrivljeno vijačnico z največjo ukrivljenostjo v okolici ostanka 47. Te ukrivljenosti vijačnice niso pripisali proteinskemu zaporedju ali interakciji med proteinom in membrano, ampak kolektivnemu gibanju dolge vijačnice (Mihajlovic in Lazaridis, 2008).

#### 2.6.3.4 Raznolikost načinov vezave α-sinukleina z membrano

Več študij je predlagalo, da N- in C-terminalni regiji lipidno-vezavne domene  $\alpha$ -sinukleina kažeta različno afiniteto do membrane (Drescher in sod., 2008; Bodner in sod., 2009; Pffeferkorn in Lee, 2010). S pomočjo NMR so pokazali, da v odvisnosti od molarnega razmerja lipidi/protein (R) obstaja več različnih vezavnih stanj  $\alpha$ -sinukleina s fosfolipidi (Bodner in sod., 2009). Ob povečevanju R je prišlo do pomika od asociacije prvih 25 ostankov k asociaciji prvih 97 ostankov (Bodner in sod., 2009). Dokaz za obstoj večih membransko vezanih konformacij so pridobili tudi z uporabo Trp mutantov α-sinukleina, in sicer je bila heterogenost povečana v bližini C-terminalnega mesta, W94, v primerjavi z Nterminalno sondo, W4 (Pfefferkorn in Lee, 2010). Tudi Bartels in sod. (2010) so pokazali na raznolikost vezave različnih N-terminalnih regij α-sinukleina na membrano. Tvorba sekundarne strukture je za vsako regijo odvisna od lipidne sestave kot tudi drugih faktorjev, kot je temperatura (Bartels in sod., 2010). Tudi najnovejše študije potrjujejo obstoj segmentov z večjo fleksibilnostjo in raznoliko globino insercije (Wietek in sod., 2013; Jain in sod., 2013). V fiziološkem kontekstu bi segmenti s povečano fleksibilnostjo lahko olajšali transformacijo α-sinukleina iz iztegnjene vijačnice v prekinjeno konformacijo, kar bi lahko imelo pomembno vlogo v njegovi predlagani funkciji v regulaciji fuzije sinaptičnih veziklov med prenosom nevrotransmiterja (Dikyl in Eliezer, 2012).

Strukturne študije  $\alpha$ -sinukleina vezanega na lipidno membrano kažejo, da amfipatična vijačnica/vijačnici leži na površini in ne prečka membrane (Jao in sod., 2004; Jao in sod., 2008; Ulmer in sod., 2005; Bussell in Eliezer, 2003), vendar pa natančna organizacija proteina na lipidni površini ostaja predmet raziskave. Trenutno velja, da bi se vijačnica/vijačnici lahko vsaj delno vstavila v dvosloj (Jao in sod., 2008; Perlmutter in sod., 2009; Wietek in sod., 2013). Kot periferni protein, se  $\alpha$ -sinuklein ne vstavi globoko v jedro membrane (Ramakrishnan in sod., 2003; Bussell in sod., 2005). Jao in sod. (2004) so ocenili, da se ob vezavi  $\alpha$ -sinukleina na SUV, center vijačnice nahaja na globini ~1 - 4 Å pod fosfatnimi glavami (slika 8). Z MD simulacijo so pokazali, da sta vijačnici v celoti vstavljeni v lipidni dvosloj do globine 3 - 5 Å pod fosfatnimi skupinami lipidnih glav. Zaključujejo, da je interakcija močnejša z lipidi kot pa z detergentskimi miceli (Perlmutter in sod., 2009).

Tako eksperimentalne kot teoretične študije so pokazale, da je regija 63 - 79 vstavljena najglobje (Mihajlovic in Lazaridis, 2008; Bussell in sod., 2005; Bisaglia in sod., 2005).

Od štirih Tyr ostankov  $\alpha$ -sinukleina se Tyr39 nahaja ravno v regiji prekinitve vijačnice (slika 8) (Ulmer in sod., 2005). Bussell in Eliezer (2005) sta predlagala, da naj bi bil prav Y39 odgovoren za prekinitev vijačnice. Bisaglia in sod. (2005) so pokazali, da se regija NAC (AK ostanki 61 - 95) delno vstavi v micel iz NaDS, predlagali pa so tudi vstavitev Tyr39. To je v nasprotju z modeli, ki predlagajo nahajanje Tyr39 na hidrofilni strani vijačnice ali na medfazi med membrano in vodo (Bussell in Eliezer, 2003; Chandra in sod., 2003; Jao in sod., 2004; Mihajlovic in Lazaridis, 2008). V napovedanem vijačnem kolesu (slika 9) se Y39 nahaja na *hrbtni* t.j. hidrofilni strani vijačnice, za kar bi pričakovali, da je v stiku z vodno raztopino.

### 2.6.4 Motnje membrane

Predlagali so, da ima nevrotoksični učinek pri sinukleinopatijah in tudi drugih amiloidnih boleznih svoj izvor v porušenju strukture lipidne membrane (Lashuel in sod., 2002; Butterfield in Lashuel, 2010). Predvidevajo, da toksično zvrst pri sinukleinopatijah predstavljajo predvsem zgodnji oligomeri v agregacijski poti. In vitro so pokazali, da sferični oligomeri (protofibrile) poškodujejo fosfolipidne vezikle (Volles in sod., 2001). In vivo bi povišana permeabilnost celične membrane lahko vodila v porušenja Ca<sup>2+</sup> homeostaze in indukcijo apoptoze (Danzer in sod., 2007). Tudi protofibrile mutantov A30P in A53T povzročijo povišano prepustnost membrane (Volles in sod., 2002). Z uporabo AFM in testa sproščanja fluorescentnega barvila so pokazali, da porušitev membrane sovpada z lipidno afiniteto  $\alpha$ -sinukleina in da tako fibrilarni kot oligomerni  $\alpha$ -sinuklein povečata permeabilnost membrane (Zhu in sod., 2003). WT protein ter mutanta E46K in A53T lahko inducirajo tvorbo ionskih kanalov v anionskih SUV, medtem ko tvorbe le-teh pri A30P niso zaznali (Zakharov in sod., 2007). Na motenjsko sposobnost proteina vpliva prisotnost anionskih lipidov in tekoče neurejene faze (van Rooijen in sod., 2009; van Rooijen in sod., 2008). Nadaljna študija je pokazala, da do porušitve veziklov pride z neravnotežnimi procesi. Kljub hitri sprostitvi barvila iz veziklov v prisotnosti oligomernega α-sinukleina, se morfologija membrane ne spremeni (van Rooijen in sod., 2010). Z NMR in EPR so pokazali, da so pore  $\alpha$ -sinukleina sestavljene iz  $\beta$ -struktur, ki so drugačne od tistih pri amiloidnih fibrilah (Kim in sod., 2009).

Natančni mehanizem motnje v zgradbi membrane še ni poznan. Poleg še vedno zelo kontrovernega mehanizma tvorbe pore, so predlagali tudi druge mehanizme, kot je na primer tanjšanje membrane (Ouberai in sod., 2013). Več nedavnih raziskav je pokazalo, da lahko  $\alpha$ -sinuklein tudi spremeni membransko površinsko topologijo. Dodatek proteina k SUV je induciral tvorbo tubularnih struktur kot tudi multilamelarnih in razvejanih veziklov (Bodner in sod., 2009; Giehm in sod., 2011). Nadaljna študija je pokazala, da lahko  $\alpha$ -sinuklein poveča ukrivljenost membrane in povzroči tvorbo manjših veziklov in tubulov (Varkey in sod., 2010). Tudi študije s fluorescenčno mikroskopijo na podprtih lipidnih dvoslojih so pokazale tvorbo tubulov kot tudi korelacijo med povišano tubulacijo in prisotnostjo anionskih lipidov ter mutacij povezanih z boleznijo (Pandey in sod., 2011).

### 2.6.5 Interakcija α-sinukleina z gangliozidi

Poleg interakcije z negativno nabitimi fosfolipidi, so pokazali, da  $\alpha$ -sinuklein interagira tudi z glikosfingolipidi (Martinez in sod., 2007; Di Pasquale in sod., 2010; Fantini in Yahi, 2011). Gangliozidi so glikosfingolipidi sestavljeni iz nepolarnega ceramidnega ogrodja in polarne glave, ki vsebuje eno ali več sladkornih skupin, na katere je vezana sialična kislina (N-acetilneuraminska kislina; NANA). Skupaj s sfingomielinom in holesterolom se nahajajo predvsem v mikrodomenah lipidnih raftov, pomembno funkcijo pa naj bi imeli v celičnem prenosu signalov (Fantini in sod., 2002; Pontier in Schweisguth, 2012). Gangliozidi bi lahko imeli pomembno vlogo v regulaciji konformacije, oligomerizacije in fibrilacije amiloidogenih proteinov (Butterfield in Lashuel, 2010). Sinaptični vezikli sicer vsebujejo le malo gangliozidov (Takamori in sod., 2006), se pa ti nahajajo izključno na zunanji strani plazemske membrane možganskih celic (Tamai in sod., 1971). Čeprav naj bi bil  $\alpha$ -sinuklein predvsem citosolni protein, pa se lahko tudi izloča iz nevronskih celic in prehaja v različne celične tipe (Lee in sod., 2005; Borghi in sod., 2000; Park in sod., 2009).

Gangliozidi bi lahko imeli pomembno vlogo v biološki aktivnosti  $\alpha$ -sinukleina. Poročali so o kolokalizaciji proteina z lipidnimi rafti in kaveolami, za katere je značilna visoka vsebnost gangliozida GM1 (Hashimoto in sod., 2003; Parton, 1994; Fortin in sod., 2004). Trenutno ni poznano, ali  $\alpha$ -sinuklein preferira tekoče urejeno okolje lipidnega rafta ali specifično komponento rafta. Poročali so predvsem o interakciji  $\alpha$ -sinukleina z GM1 in GM3 (slika 10), vendar pa je bila preferenca do teh dveh gangliozidov v različnih študijah različna (Martinez in sod., 2007; Di Pasquale in sod., 2010; Fantini in Yahi, 2011). GM1 je promoviral privzem proteina v mikroglia (Park in sod., 2009) ter inhibiral fibrilacijo proteina (Martinez in sod., 2007), medtem ko je GM3 vplival na funkcijo  $\alpha$ -sinukleinskega ionskega kanalčka v lipidnem dvosloju (Di Pasquale in sod., 2010).

Ob interakciji  $\alpha$ -sinukleina s SUV, ki so vsebovali GM1, je prišlo do indukcije  $\alpha$ -vijačne strukture. Asociacijo med proteinom in gangliozidom so pripisali specifični interakciji med  $\alpha$ -vijačnico in obojim, sialično kislino in ogljikohidratnimi skupinami GM1 (Martinez in sod., 2007). Nedavno so v  $\alpha$ -sinukleinu identificirali 12-merno gangliozid-vezavno domeno (AK ostanki 34 – 45, ki tvorijo zanko centrirano okoli Tyr39), ki naj bi se preferenčno vezala z GM3 (Fantini in Yahi, 2011). Na osnovi strukture na micel vezanega  $\alpha$ -sinukleina (slika 8) (Ulmer in sod., 2005) so s pomočjo MD simulacij in eksperimentov na lipidnih monoslojih postavili model interakcije  $\alpha$ -sinukleina z membrano (Fantini in Yahi, 2011; Fantini in sod., 2011). Gonilno silo insercije in tvorbe amiloidnega kanala  $\alpha$ -sinukleina v membrani naj bi predstavljala interakcija z gangliozidi, ki inducira zvitje proteina. Za translokacijo proteina je verjetno potreben tudi holesterol (Fantini in sod., 2011). Predvidevajo, da naj bi imel poleg dveh Lys ostankov (K34 in K45) ključno vlogo pri interakciji  $\alpha$ -sinukleina z gangliozidi Tyr39, ki preko aromatske skupine omogoča tvorbo začasne OH– $\pi$  vezi med gangliozidom in proteinom (Fantini in Yahi, 2011).



Slika 10: Struktura gangliozidov GM1 in GM3. Oba gangliozida vsebujeta eno sialično kislino (NANA), ki daje lipidu neto negativni naboj. Na ceramidno ogrodje so pri GM1 vezani sladkorji glukoza-galaktoza-(NANA)-N-acetilglukozamin-galaktoza in pri GM3 glukoza-galaktoza-NANA.

Figure 10: Structures of GM1 and GM3 gangliosides. Both gangliosides contain one sialic acid (NANA) providing neto negative charge to the lipid. The sequence of sugar components bound to the ceramide backbone is in the case of GM1 glucose-galactose-(NANA)-N-acetylglucosamine-galactose and in the case of GM3 glucose-galactose-NANA.

### 2.7 INHIBICIJA FIBRILACIJE α-SINUKLEINA IN ZAŠČITA NEVRONOV

### 2.7.1 Problematika zdravljenja Parkinsonove bolezni

Trenutno za PD ni na voljo nobenega zdravila, ki bi upočasnilo ali preprečilo odmiranje nevronov v *substantia nigra* in drugih možganskih regijah. Razvoj učinkovitih terapevtikov za preprečevanje in/ali zdravljenje bolezni omejujejo predvsem multifaktorska narava PD in slabo poznavanje ključnih molekularnih dogodkov, ki vodijo v nevrodegeneracijo (Dauer in Przedbovski, 2003; Breydo in sod., 2012). Tako je trenutno na voljo le simptomatsko zdravljenje, ki v glavnem vključuje nadomeščanje dopamina z njegovim prekurzorjem levodopa (L-dopa). Takšni terapevtski posegi pa ne preprečujejo napredovanja bolezni, poleg tega pa imajo tudi dokaj kratkotrajni učinek (García-Montes in sod., 2012).

Dodaten problem pri zdravljenju PD predstavlja tudi dejstvo, da se bolezen predvidoma prične veliko prej (tudi do 20 let) preden se pojavijo prvi simptomi. Posledično se zdravljenje začne šele, ko že pride do obširne nevrodegeneracije in je  $\sim$ 70 % dopaminergičnih nevronov že odmrlih (Uversky in Eliezer, 2009).

Ker močni dokazi kažejo, da je nevropatologija PD (in ostalih sinukleinopatij) tesno povezana z agregacijo in tvorbo amiloidnih fibril  $\alpha$ -sinukleina oz. s faktorji, ki pospešijo ta proces (glej 2.5) (Fink, 2006; Lundvig in sod., 2005), bi razvoj PD morda lahko preprečili s posegom v agregacijsko pot proteina. Če  $\alpha$ -sinuklein v celici obstaja kot multimer (Bartels in sod., 2011; Wang in sod., 2011), kar pa še ni bilo dokazano (glej 2.4.2.3), bi terapija lahko vključevala preprečitev razpada takšnega kompleksa (Lashuel in sod., 2013). Ker pa naj bi v vsakem primeru toksična agregacija izhajala iz monomerne konformacije, bi učinkoviti terapevtski postopki lahko vključevali stabilizacijo monomera, inhibicijo

oligomerizacijskega procesa ali pa preprečitev interakcij med monomeri in rastočo protofibrilo (Lashuel in sod., 2013). Predvidevajo, da so nevrotoksični predvsem oligomerni agregati  $\alpha$ -sinukleina, ki bi lahko poškodovali celične membrane (Auluck in sod., 2010; Lashuel in sod., 2002; Butterfield in Lashuel, 2010). Vendar pa je narava takšnih toksičnih agregatov nepoznana, kar še dodatno otežuje razvoj terapevtikov.

Prekomerno izražanje človeškega  $\alpha$ -sinukleina v različnih sesalskih celicah in živalskih modelih lahko vodi v apoptozo, poškodbe celičnih organelov in povišano dovzetnost za oksidativni stres (Gosavi in sod., 2002). Oksidativni stres, ki ga v splošnem definiramo kot porušeno ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti v celici, je pomemben etiološki faktor v nastanku nevrodegenerativnih bolezni, tudi PD (Gandhi in Abramov, 2012; Schildknecht in sod., 2013). Agregati  $\alpha$ -sinukleina naj bi inducirali oksidativni stres predvsem preko poškodb mitohondrijske membrane (Betarbet in sod., 2006), tvorba prostih radikalov pa naj bi tudi pospešila agregacijo  $\alpha$ -sinukleina (Xu in sod., 2002). Prekomerna akumulacija reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) med normalnim in patološkim staranjem možganov naj bi bil eden izmed razlogov za disfunkcijo in izgubo nevronov. Možen pristop k terapiji PD bi tako lahko predstavljalo tudi zvišanje lastne obrambe možganov, s čimer bi se morda lahko izognili ali pa vsaj zmanjšali začetne poškodbe, ki vodijo v nevrodegeneracijo.

Izjemna konformacijska plastičnost intrinzično neurejenih proteinov onemogoča uporabo običajnih na strukturi-temelječi pristopov pri razvoju zdravil (Breydo in sod., 2012). Terapevtske strategije dodatno otežuje tudi predviden širok nabor predlaganih funkcij  $\alpha$ -sinukleina (glej 2.3), saj naj bi protein interagiral s številnimi veznimi partnerji in bil vpleten v raznolike celične poti (Deleersnijder in sod., 2013).

# 2.7.2 Majhne naravne spojine kot inhibitorji patogeneze Parkinsonove bolezni

V zadnjem desetletju so veliko pozornosti pritegnili antioksidanti iz hrane, pijače in naravnih ekstraktov, saj je več študij poročalo o njihovem pozitivnemu učinku na zdravje in zaščiti pred kroničnimi boleznimi kot so rak, kardiovaskularne in tudi nevrodegenerativne bolezni (Fraga, 2007; Scalbert in sod., 2005). Flavonoidi, ki imajo značilno strukturo molekulskega ogrodja C6-C3-C6, predstavljajo podrazred rastlinskih sekundarnih metabolitov polifenolov. Flavonoidi so prisotni v rastlinski hrani in nekaterih pijačah, kot sta čaj in vino, in so najpogostejši polifenolni antioksidanti v humani prehrani. Skupni dnevni vnos flavonoidov v obliki sadja, zelenjave in pijač lahko znaša med 50 in 800 mg, kar je več kot povprečni dnevni vnos drugih antioksidantov, t.j. vitamina C in E in karotenoidov (Tapiero in sod., 2002). V celičnih kulturah in živalskih modelih so pokazali zaščitni učinek določenih flavonoidov na živčne celice, in sicer tako ekstraktov kot tudi posamičnih spojin (Youdim in sod., 2003; Masuda in sod., 2006). Zdravilni pripravki iz Ginkgo biloba, ki vsebujejo flavonoida kvercetina, so v pacientih z Alzheimejevo in veliko drugimi nevrodegenerativnimi boleznimi izboljšali stanje demence (Watanabe in sod., 2001). Polifenoli v zelenem čaju naj bi izboljšali zdravje ter potencialno zaščitili pred PD (Pan in sod., 2003). Trenutno ni znano na kakšen način polifenoli posredujejo svoje koristne lastnosti. V nedavnih študijah so predlagali, da je zgolj njihova klasična vloga kot lovilcev prostih radikalov (oz. donatorjev vodika) malo verjetna (Stevenson in Hurst, 2007). Flavonoidi bi lahko že pri nizki koncentraciji povzročili spremembe v celični membrani in

funkciji proteinov, kar pa ima lahko velike učinke na biološke procese (Fraga, 2007). Pokazali so, da lahko te polifenolne spojine vplivajo na specifične signalne poti in interagirajo s specifičnimi proteini (Ramassamy, 2006; Campos-Esparza in Torres-Ramos, 2010).

Več študij je poročalo, da lahko *in vitro* nekateri flavonoidi inhibirajo fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina in v nekaterih primerih tudi destabilizirajo že obstoječe fibrile (Zhu in sod., 2013; Meng in sod., 2009; Meng in sod., 2010; Bieschke in sod., 2010; Ehrnhoefer in sod., 2008; Caruana in sod., 2011). Poročali so tudi o vplivu določenih polifenolov na citotoksičnost agregatov  $\alpha$ -sinukleina v celičnem modelu (Griffioen in sod., 2006). Majhne molekule običajno preusmerijo agregacijsko pot proti velikim, netopnim in netoksičnim oligomerom (Uversky, 2007; Fink, 2006; Breydo in sod., 2012). Nekovalentna ali kovalentna vezava flavonoida z  $\alpha$ -sinukleinom lahko vpliva na relativno stabilnost monomera in/ali oligomera (Breydo in sod., 2012). Molekularni mehanizem inhibicije fibrilacije ni razjasnjen. Predvidevajo, da sta za inhibitorni učinek potrebni vsaj dve sosednji hidroksilni skupini na kateremkoli aromatskem obroču flavonoida (Meng in sod., 2009; Caruana in sod., 2011). Predlagali so tudi, da kot inhibitorji pravzaprav učinkujejo oksidirani produkti izvornih flavonoidov, t.j. kinoni (Meng in sod., 2009; Zhu in sod., 2013).

Kljub predlagani splošni koristnosti polifenolov v smislu prehranskega vnosa ali razvoja zdravil, pa ni jasno, ali se lahko te spojine ali njihovi aktivni metaboliti akumulirajo v tarčnih tkivih v zadostnih količinah. Najbolj zastopani polifenoli v prehrani namreč niso nujno tudi najaktivnejši v telesu, saj lahko posedujejo nižjo lastno aktivnost, se slabo absorbirajo iz črevesja, se izdatno presnavljajo, ali pa se hitro izločijo (Manach in sod., 2004; D'Archivio in sod., 2010). Njihovi učinki na zdravje so tako odvisni od zaužite količine, kot tudi od njihove biodostopnosti (Manach in sod., 2004). Polifenoli se morajo za svoje zaščitno delovanje akumulirati v možganih, kar pomeni, da morajo prečkati krvno-možgansko pregrado (BBB; ang. blood-brain barrier). BBB je kompleksna in dinamična pregrada med kapilarami in centralnim živčnim sistemom, ki izjemno natančno kontrolira izmenjavo snovi med krvjo in možgani in ima tako ključno vlogo v homeostazi možganov, ki jih ščiti pred mnogimi toksičnimi snovmi in mikroorganizmi (Cardoso in sod., 2010). Anatomsko osnovo strukture predstavljajo specializirane endotelijske celice skupaj s periciti in astrociti. Za neprepustnost pregrade so odgovorni predvsem tesni in adherentni stiki med endotelijskimi celicami ter izločevalni transporterji endotelija, ki skupaj omogočajo izjemno omejeno permeabilnost BBB (Cardoso in sod., 2010). Za nekatere polifenole je bilo pokazano, da prečkajo raznolike BBB modele (Youdim in sod., 2003; Youdim in sod., 2004a; Youdim in sod., 2004b; Janle in sod., 2010; Faria in sod., 2010; Faria in sod., 2012). Poudariti je potrebno, da je večina modelov s katerimi so tako in vitro kot in vivo ovrednotili biodostopnost flavonoidov možganom, živalskega izvora (govedo, podgane ali miši). Poleg tega pa je problematična tudi pridobitev zanesljivih podatkov o privzemu polifenolov v možgane živali po oralni ali intravenozni dostavi, saj v mnogih študijah niso bili uporabljeni primerni postopki in kontrole. Dodaten problem je tudi določitev koncentracije aktivne snovi v možganskem tkivu, saj so te ocene pogosto pristranske zaradi prisotnost rezidualne krvi (Ishisaka in sod., 2011).

Epidemiološke študije so pokazale, da je PD manj pogosta pri kadilcih, kar bi lahko kazalo, da izpostavljenost cigaretnemu dimu preprečuje poškodbe nevronov (Fratiglioni in Wang,

2000; Quik, 2004). V cigaretnem dimu je okoli 3.800 identificiranih snovi, od katerih pa se kot možna zaščitna snov izpostavlja predvsem alkaloid nikotin. Nikotin lahko stimulira dopaminergične nevrone strie, ki so selektivno poškodovani pri PD, poleg tega pa je v eksperimentalnih modelih zaščitil nevrone (Quik, 2004; Jeyarasasingam in sod., 2002). Pokazali so, da nikotin v čisti obliki, dostavljen z obliži ali žvečilko, blaži simptome PD (Kelton in sod., 2000). Poleg tega so poročali, da ima nikotin poleg pro-oksidativnih tudi antioksidativne lastnosti (Newman in sod., 2002). In nenazadnje, za nikotin sta dve neodvisni študiji pokazali, da inhibira fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina in stabilizira topne oligomerne zvrsti (Hong in sod., 2009; Ono in sod., 2007). Znano je, da se pri kadilcih nikotin nahaja tako v plazmi kot v možganih (Riah in sod., 1998).

# **3 MATERIAL IN METODE**

Slika 11 prikazuje potek eksperimentov v doktorskem delu.



Slika 11: Shema poteka poskusov. Figure 11: Experimental flow chart.

### 3.1 MATERIAL

Kemikalije in reagente smo kupili od proizvajalcev Sigma-Aldrich (ZDA), Merck (Nemčija) ali Roth (Nemčija), razen v primerih, ko je navedeno drugače. Proizvajalci najpomembnejših kemikalij, reagentov in opreme ter sestava raztopin in gojišč so navedeni v nadaljevanju in/ali pri opisu posameznih metod.

Vse raztopine in gojišča smo pripravili v bidestilirani vodi milliQ (Millipore, ZDA), razen pri eksperimentih fibrilacije proteinov (glej 3.5), kjer smo raztopine za raztapljanje proteinov pripravili v vodi za injekcije Braun (Braun, Nemčija). Vse raztopine smo po pripravi filtrirali skozi 0,22 µm filtre (Sartorius, Švedska). Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem ali s filtracijo.

Preglednica 1: Najpomembnejše uporabljene kemikalije z navedbo proizvajalca. Table 1: The most important chemicals used with an indication of the manufacturer.

Proizvajalec	Kemikalija
Sigma-Aldrich, ZDA	kvercetin (Q), (-)-nikotin (N), NaDS, tioflavin T (ThT), 1-anilinonaftalen-8- sulfonat (ANS), 1,6-difenil-1,3,5-heksatrien (DPH), trimetilamonij-6-fenil- 1,3,5-heksatrien (TMA-DPH), kalcein, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), HEPES, glutaraldehid, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medij
Avanti Polar Lipids, ZDA	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin (DPPC), 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol (DPPG), 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin (POPC), 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol (POPG), gangliozida GM1 in GM3
Polyphenols, Norveška	cianidin-3-glukozid (C3G)
Extrasynthese, Francija	(-)-epigalokatehin galat (EGCG)
Gibco, ZDA	medij Neurobasal

#### Preglednica 2: Sestava raztopin in gojišč. Table 2: The composition of solutions and growth media.

Raztopina ali gojišče	Sestava
Delovni pufer (HEPES pufer)	150 mM NaCl (Merck, Nemčija)
(raztapljanje α-sinukleina in izvedba	20 mM HEPES (Sigma-Aldrich, ZDA)
vseh eksperimentov z $\alpha$ -sinukleinom)	pH 7,0
Lizirni pufer	50 mM NaCl (Merck, Nemčija)
(izolacija α-sinukleina)	20 mM Tris-HCl (Merck, Nemčija)
	0,10 % Triton-X100 (Sigma-Aldrich, ZDA)
	200 µM PMSF (Sigma-Aldrich, ZDA)
	pH 7,4
Pufer A	50 mM NaCl (Merck, Nemčija)
(izolacija α-sinukleina)	20 mM Tris-HCl (Merck, Nemčija)
	pH 7,4
Pufer B	1 M NaCl (Merck, Nemčija)
(izolacija α-sinukleina)	20 mM Tris-HCl (Merck, Nemčija)
	pH 7,4
LB gojišče (za 1 l)	- 25 g LB (Roth, Nemčija)
	<ul> <li>v trdno gojišče dodamo še 15 g agarja</li> </ul>
	- v gojišče LB Carb po avtoklaviranju dodamo še karbenicilin
	(85 µg/ml)
RPMI gojišče (za 1 l)	6 g glukoza (Merck, Nemčija)
	2 g NaHCO <sub>3</sub> (Merck, Nemčija)
	RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, ZDA)
obogateno RPMI gojišče	10 % FBS (Biochrom AG, Nemčija)
(HBMEC-kultivacijski medij)	10 % NuSerum IV (BD Biosciences, Belgija)
	1 % NEAA (Biochrom AG, Nemčija)
	1 % MEM vitamini (Biochrom AG, Nemčija)
	1 mM Na piruvat (Biochrom AG, Nemčija)
	2 mM L-glutamin (Biochrom AG, Nemčija)
	1 % raztopina antibiotikov in antimikotikov (Sigma-Aldrich,
	ZDA)
	RPMI gojisce
obogateni Neurobasal medij	0,5 mM L-glutamin (Biochrom AG, Nemčija)
	$25 \mu\text{M}$ L-glutamat (Merck, Nemcija)
	2 % B-2/ Supplement (50×) (Invitrogen, ZDA)
	0,12 mg/ml gentamicin (invitrogen, ZDA)
PBS	80,06 g NaCl (Merck, Nemčija)
	2,01 g KCl (Merck, Nemčija)
	14,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> U (Merck, Nemčija) 2.04 z KU PO (Merch, Nemčija)
	2,04 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Werck, Nemcija)
	рп /,4

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Sestava raztopin in gojišč.

Raztopina ali gojišče	Sestava	
Ringer-HEPES raztopina	150 mM NaCl (Merck, Nemčija)	
(transport izbranih spojin preko	5,2 mM KCl (Merck, Nemčija)	
modela BBB)	2,2 mM CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Merck, Nemčija)	
	0,2 mM MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (Merck, Nemčija)	
	6 mM NaHCO <sub>3</sub> (Merck, Nemčija)	
	5 mM HEPES (Sigma-Aldrich, ZDA)	
	2,8 mM glukoza (Merck, Nemčija)	
	рН 7,4	

Preglednica 3: Najpomembnejša laboratorijska oprema. Table 3: The most important laboratory equipment.

Aparatura	Proizvajalec
CD spektropolarimeter	62A DS, AVIV Associates, ZDA
N-DSC III kalorimeter	Calorimetry Science, ZDA
mikroskop na atomsko silo	Nanoscope IIIa Multimode, Digital instruments, ZDA
spektrofotometer	HP 8453, Hewlett-Packard, Nemčija
	Cary Eclipse, Varian, Avstralija
fluorescenčni spektrofotometer	Cary Eclipse, Varian, Avstralija
aparatura za HPLC	Agilent Technologies, Nemčija
aparatura za FPLC	ÄKTA FPLC, Pharmacia, Švedska
sonikator	VCX 750, Sonics, ZDA
fluorescenčni mikroskop	AxioScope.A1, Zeiss, Nemčija
centrifuge	Sigma 3K30, Sigma, Nemčija
	Minispin 5415C in 5810R, Eppendorf, Nemčija
	Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen, Nemčija

### 3.2 PRIPRAVA REKOMBINANTNIH PROTEINOV

Izražanje in čiščenje rekombinantnega  $\alpha$ -sinukleina divjega tipa, mutantov Y39A in Y(125,133,136)A smo izvedli po že opisanih postopkih (Ulrih in sod., 2008) z določenimi modifikacijami.

Za kloniranje in namnoževanje plazmidne DNA smo uporabljali kompetentne celice *E. coli* seva DH5a (Subcloning Efficiency<sup>TM</sup> DH5a<sup>TM</sup>, Invitrogen, ZDA) z genotipom F<sup>-</sup> $\Phi$ 80 *lacZA*M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)*U*169 *recA1 endA1 hsd*R17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi*–1 *gyrA96 relA1*  $\lambda^{-}$ . Za čezmerno izražanje rekombinantnih proteinov smo uporabili kompetentne celice *E. coli* seva BL21-Gold (DE3) (Agilent Technologies, ZDA) z genotipom B F<sup>-</sup> *ompT hsd*S(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup>Tet<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$ (DE3) *endA*.

## 3.2.1 Priprava bakterijskega ekspresijskega sistema za WT in mutirani α-sinuklein

Kot matrico za pridobitev Tyr $\rightarrow$ Ala mutiranih variant  $\alpha$ -sinukleina smo uporabili konstrukt, ki je bil pripravljen z restrikcijskim kloniranjem cDNA humanega WT  $\alpha$ -sinukleina v bakterijski ekspresijski vektor pRK172 (Ulrih in sod., 2008). Plazmid pRK172 nosi zapis za odpornost proti ampicilinu, kar služi kot selekcijski marker za rast transformiranih bakterijskih celic v gojišču z dodanim ampicilinom. Za selekcijo smo namesto ampicilina uporabili analogni stabilnejši antibiotik karbenicilin (Carb) (Sigma-Aldrich, ZDA) z delovno koncentracijo 85 µg/ml. Bakterijske celice smo gojili pri 37 °C ob konstantnem stresanju (v primeru, da smo uporabili tekoče gojišče).

#### 3.2.1.1 Transformacija kompetentnih celic

Kompetentne celice *E.coli* (DH5α ali BL21-Gold (DE3)) smo odmrznili in k 50 µl celic dodali 1 µl plazmida pRK172 ter mešanico 20 min inkubirali na ledu. Nato smo izvedli toplotni šok (45 s pri 42 °C in nato 2 min na ledu). Dodali smo 150 µl gojišča LB in celice inkubirali 1 uro pri 37 °C ter jih razmazali na agarne plošče LB Carb. Naslednji dan smo izbrali nekaj kolonij, jih prekonočno nagojili v tekočem LB Carb ter izolirali plazmidno DNA (glej 3.2.1.2).

3.2.1.2 Izolacija plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo izolirali iz prekonočne kulture transformiranih celic *E.coli* (DH5 $\alpha$  ali BL21-Gold (DE3)) s kompletom za izolacijo plazmidne DNA GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich, ZDA), po navodilih proizvajalca. Koncentracijo in čistost izolata smo določili z NanoDrop 2000c spektrofotometrom (Thermo Scientific, ZDA).

3.2.1.3 Restrikcijsko rezanje DNA

Da bi preverili prisotnost  $\alpha$ -sinukleinskega vključka v plazmidu pRK172, smo plazmid podvrgli restrikcijskim reakcijam z encimoma NdeI in HindIII (Fermentas, ZDA), po navodilih proizvajalca. Rezane dele plazmidne DNA smo med seboj ločili z agarozno elektroforezo (glej 3.2.1.4).

3.2.1.4 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabljali za preverjanje ustreznosti velikosti fragmentov DNA po restrikciji (glej 3.2.1.3). Uporabljali smo 0,8 % (w/v) agarozni gel v TAE pufru (Sigma-Aldrich, ZDA). Elektroforeza je potekala 45 min pri napetosti 12 V·cm<sup>-1</sup>. DNA smo po končani elektroforezi vizualizirali z etidijevim bromidom (Sigma-Aldrich, ZDA). Uporabili smo DNA lestvico Blue (GeneOn, Nemčija).

3.2.1.5 Usmerjena mutageneza

Za točkovno mutagenezo ustreznih aminokislinskih ostankov WT  $\alpha$ -sinukleina smo mutirali kodone na izbranih lokacijah (Y39A: TAT $\rightarrow$ GCT; Y125A: TAT $\rightarrow$ GCT; Y133A: TAT $\rightarrow$ GCT; Y136A: TAC $\rightarrow$ GCC). Trojna mutacija  $\alpha$ -sinukleinskega inserta je bila

predhodno pripravljena (vir: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih), medtem ko je bila mutacija Y39A pripravljena v okviru tega doktorskega dela. Mutacije rekombinantnega  $\alpha$ -sinukleina vstavljenega v plazmid pRK172 smo izvedli s pomočjo kompleta QuickChange II Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene, ZDA), po navodilih proizvajalca. Metoda temelji na principu PCR reakcije (iCycler, BioRad, ZDA). Načrtovani začetni nukleotidi so bili naročeni pri podjetju Sigma-Aldrich (ZDA). Sledila je transformacija mutiranih plazmidov v kompetentne bakterijske celice *E. coli* DH5 $\alpha$  (glej 3.2.1.1). Po transformaciji smo celice razmazali na trdno gojišče LB Carb in jih prekonočno inkubirali. Naslednji dan smo izbrali nekaj kolonij, jih prekonočno nagojili v tekočem LB Carb ter izolirali plazmidno DNA (glej 3.2.1.2).

### 3.2.1.6 Preverjanje zaporedja α-sinukleinskega inserta

Uspešnost kloniranja in mutageneze smo preverili z določanjem nukleotidnega zaporedja pri podjetju Macrogene (Nizozemska) z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov.

# 3.2.1.7 Trajne kulture bakterijskih celic

Kompetentne celice *E. coli* BL21-Gold (DE3) smo transformirali (glej 3.2.1.1) s plazmidom pRK172 z vstavljenim zapisom za WT, Y39A ali Y(125,133,136)A  $\alpha$ -sinuklein ter jih nacepili na trdno LB Carb gojišče. Posamezne kolonije iz agarnih plošč smo precepili v tekoče LB Carb gojišče in celice prekonočno nagojili. Za pripravo trajnih kultur transformiranih bakterijskih celic smo celicam v zgodnji eksponentni fazi rasti dodali avtoklavirani 70 % glicerol (Kemika, Hrvaška) do končne 21 % koncentracije ter jih shranili pri -80 °C.

# 3.2.2 Izolacija proteinov

# 3.2.2.1 Izražanje proteinov

Transformirane celice *E. coli* BL21-Gold (DE3) (glej 3.2.1.7) smo nacepili v tekoče LB Carb gojišče in jih prekonočno nagojili. Naslednji dan smo 3 ml prekonočne kulture uporabili za inokulacijo 300 ml LB Carb gojišča v 2 l steklenicah. Bakterije smo gojili pri 37 °C in stresanju 230 rpm do  $A_{500} \sim 1,4$ . Izražanje  $\alpha$ -sinukleina smo nato sprožili z dodatkom 1 mM IPTG (Sigma-Aldrich, ZDA) in celice gojili nadaljnih 4 do 5 ur. Celice smo po inkubaciji centrifugirali (6.000 *g*, 20 min, 4 °C) ter usedlino shranili pri -20 °C.

### 3.2.2.2 Čiščenje proteinov

Bakterijsko usedlino smo odtalili pri sobni temperaturi in celice na ledu resuspendirali v lizirnem pufru (40 ml/1 l bakterijske kulture). Celice smo nato razbili z ultrazvočnim sonikatorjem. Lizat smo ob konstantnem mešanju na ledu 10 min obarjali z amonijevim sulfatom (Merck, Nemčija) do 30 % nasičenosti in centrifugirali (22.000 g, 30 min, 4 °C). Supernatant smo ponovno obarjali z amonijevim sulfatom do 50 % nasičenosti. Precipitat smo odcentrifugirali (22.000 g, 30 min, 4 °C), ga resuspendirali v pufru A (30 ml/1 l bakterijske kulture) ter prekonočno dializirali pri 4 °C (dializna membrana Spectra/Por® z MWCO 3,500 kDa, Spectrum Lab., ZDA) proti 5 l pufra A. Pufer smo med dializo večkrat zamenjali. Po dializi smo vzorec centrifugirali (22.000 g, 30 min, 4 °C) ter ga nadalje čistili s FPLC-ionsko izmenjevalno kromatografijo z uporabo 4 ml kolone MonoQ<sup>TM</sup> 4.6/100 PE (GE Healthcare Biosciences, Švedska). Ločba je potekala v pufru A pri 10 °C, pretoku okoli 0,7 ml/min z linearnim gradientom 0 - 50 % pufra B, v 15 volumnih kolone. Elucijo proteinov smo spremljali z merjenjem A<sub>280</sub>. α-Sinuklein je tipično eluiral v širokem vrhu z okoli 300 mM NaCl.

α-Sinukleinske frakcije smo preverili na NaDS-PAGE gelu (glej 3.4.3), jih združili in dializirali pri 4 °C (dializna membrana Spectra/Por® z MWCO 3,500 kDa, Spectrum Lab., ZDA) proti 5 l milliQ vode za minimalno 36 ur, ob večkratni menjavi dializata. Po dializi smo s centrifugiranjem (22.000 g, 30 min, 4 °C) odstranili nastali precipitat ter z NaDS-PAGE ponovno preverili čistost in velikost proteinov v supernatantu. Supernatant smo liofilizirali (liofilizator Martin Christ, Nemčija) in shranili pri -20 °C.

### 3.2.2.3 Potrditev molekulske mase izoliranih proteinov

Končno potrditev molekulske mase in homogenosti izoliranih proteinov so opravili z MALDI-TOF MS (velikostno območje analize najmanj 5 - 20 kDa) v laboratoriju dr. Marka Fonovića na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### 3.3 PRIPRAVA PROTEINOV ZA EKSPERIMENTE

# **3.3.1 Raztapljanje proteinov**

Liofilizirane proteine smo pri sobni temperaturi 10 - 20 min raztapljali v 1 mM NaOH (volumen dodanega NaOH je ustrezal <sup>1</sup>/<sub>4</sub> končnega volumna raztopine). Proteine smo prenesli na led in dodali  $2 \times$  HEPES pufer (<sup>1</sup>/<sub>2</sub> končnega volumna raztopine) in milliQ vodo (<sup>1</sup>/<sub>4</sub> končnega volumna raztopine). Vzorce smo nato ultrafiltrirali (14.000 g, 30 min, 10 °C) preko filtrov z MWCO 100 kDa (ultrafiltracijske mikrocentrifugirke Amicon Ultra, Millipore, Irska), da smo se znebili morebitnih agregatov. Po določitvi koncentracije proteinov (glej 3.3.2), smo z 1× HEPES pufrom koncentracijo proteinov uravnali na željeno vrednost. Raztopino proteinov smo porabili v enem dnevu.

### **3.3.2** Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo določili spektrofotometrično po Beer-Lambertovem zakonu, pri 25 °C, kot je opisano v Ulrih in sod. (2008). Tirozin absorbira svetlobo pri valovni dolžini 275 nm, ekstincijski koeficient,  $\varepsilon$ , za WT  $\alpha$ -sinuklein znaša 0,404 cm<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>ml, za Y39A 0,303 cm<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>ml ter za Y(125,133,136)A 0,101 cm<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>ml. Meritve smo opravili s spektrofotometrom Cary Eclipse (Varian, Avstralija) v 10-mm kvarčnih kivetah (Starna, ZDA). Posneli smo spektre proteinov od 320 do 220 nm.

### 3.4 KARAKTERIZACIJA PROTEINOV

Proteine v pufrski raztopini smo okarakterizirali s CD spektroskopijo (glej 3.9), fluorescenco ANS (glej 3.8.1) in spodaj navedenimi metodami.

## 3.4.1 Napoved težnje proteinov k agregaciji

Da bi ocenili ali točkovne mutacije spremenijo težnjo  $\alpha$ -sinukleina za tvorbo agregatov, smo AK zaporedja vseh treh proteinov analizirali s spletnim programom TANGO (http:/tango.crg.es/about.jsp) (Fernandez-Escamilla in sod., 2004; Rousseau in sod., 2006; Linding in sod., 2004). Program Tango je računalniški algoritem za napovedovanje regij s težnjo po  $\beta$ -agregaciji v nezvitih peptidnih verigah. Analize smo izvedli pri pH 7,0, temperaturi 25 °C in ionski moči 150 mM.

### 3.4.2 Kemično povezovanje proteinov

Za spremljanje monomerne ali oligomernih oblik  $\alpha$ -sinukleina smo izvedli tehniko povezovanja proteinov v raztopini. Kot sredstvo za povezovanje smo uporabili glutaraldehid (Sigma-Aldrich, ZDA) (slika 12), ki preko  $\epsilon$ -amino skupin lizinskih AK ostankov kovalentno poveže morebitne oligomerne oblike proteina (Kapoor in O'Brien, 1977). Oligomeri posledično na NaDS-PAGE gelu ne razpadejo na manjše oblike. Postopek smo najprej optimizirali z uporabo različnih koncentracij povezovalca (od 0,001 do 20 % glutaraldehid), različnih koncentracij proteina in različnih inkubacijskih časov mešanice. Proteine v vzorcu smo po optimizaciji povezali tako, da smo k 10 µl vzorca dodali 1,11 µl 2,5 % glutaraldehida in mešanico 30 min inkubirali pri 37 °C. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 1,11 µl 1 M Tris-HCl (pH 8). Reakcijsko mešanico smo pustili stati 15 min in nato izvedli NaDS-PAGE (glej 3.4.3).



Slika 12: Struktura kemičnega povezovalca glutaraldehida. Figure 12: The structure of the crosslinking agent glutaraldehyde.

### 3.4.3 NaDS-PAGE elektroforeza

Za ocenitev velikosti in čistosti proteinov smo uporabljali NaDS-PAGE elektroforezo, ki smo jo izvedli na Mini-Protean II elektroforeznem sistemu (BioRad, ZDA). Pripravili smo 0,75 mm 15 % ločevalni in 4 % koncentracijski gel. V vzorec kemično povezanih proteinov (glej 3.4.2) smo dodali nanašalni pufer z dodanim reducentom DTT (Thermo Scientific, ZDA) in mešanico inkubirali 5 min pri 95 °C. Ne-povezan protein smo na gel nanesli v nereducirajočem pufru (Thermo Scientific, ZDA), brez predhodnega segrevanja vzorca. Elektroforeza je potekala približno 1 uro pri konstantni napetosti 200 V. Gele smo obarvali s Coomassie modrim barvilom (SimplyBlue™ SafeStain, Life Technologies, ZDA), po navodilih proizvajalca. Uporabili smo proteinsko lestvico PageRuler™ Prestained Ladder (Fermentas, ZDA).

# 3.4.4 Ultracentrifugiranje

Z ultracentrifugiranjem smo preverili, ali bi se lahko pri dovolj velikih pospeških znebili agregiranih oblik  $\alpha$ -sinukleina v raztopini. 82  $\mu$ M raztopino WT  $\alpha$ -sinukleina smo centrifugirali 60 min pri 200.000 g na ultracentrifugi T-2070 (Kontron, Švica). Po centrifugiranju smo zelo previdno odvzeli supernatant, proteine kovalentno povezali z glutaraldehidom (glej 3.4.2) ter analizirali z NaDS-PAGE (glej 3.4.3).

### 3.5 FIBRILACIJA PROTEINOV

### 3.5.1 Vpliv Tyr→Ala mutacij na fibrilacijo α-sinukleina

Za določitev vpliva tirozinskih AK ostankov na fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina smo 70  $\mu$ M raztopino WT, Y39A in Y(125,133,136)A  $\alpha$ -sinukleina več dni inkubirali v tesno zaprtih stekleničkah (Supelco, Sigma-Aldrich, ZDA), pri 37 °C. Stekleničke z mikro-teflonskim magnetnim mešalom smo namestili na magnetno mešalo in proteinsko mešanico mešali pri 700 rpm. Da bi se izognili pregrevanju plošče, smo magnetno mešalo menjali 2× dnevno. Liofilizirane proteine smo raztopili, kot je opisano v 3.3.1, s to razliko, da smo namesto milliQ vode za pripravo vseh raztopin uporabili sterilno vodo Braun (Braun, Nemčija). To spremembo smo uvedli zaradi potreb AFM (dr. Miha Škarabot, osebni razgovor). Eksperimente smo ponovili vsaj 3×, vsakič v paralelkah.

Med inkubacijo smo v različnih časovnih intervalih jemali vzorce proteinske mešanice za spremljanje:

i) nastanka fibril s ThT testom (glej 3.8.2),
ii) spremembe hidrofobnosti proteinov z ANS testom (glej 3.8.1),
iii) prisotnosti topnih proteinov v supernatantu brez/s predhodnim kemičnim povezovanjem proteinov in NaDS-PAGE (glej 3.4.2 in 3.4.3)
iv) morfologije nastalih agregatov z AFM (glej 3.6).

ad iii) Pred izvedbo NaDS-PAGE smo na koncu vsake inkubacije (3 dni in 8 dni) vzorce centrifugirali (24.000 g, 30 min, 20 °C), da smo ločili topne proteine od netopnega agregiranega materiala.

# 3.5.2 Inhibicija fibrilacije

Preverili smo učinkovitost izbranih spojin (kvercetin, Q; epigalokatehin galat, EGCG; cianidin-3-glukozid, C3G; nikotin, N; slika 13) za inhibicijo fibrilacije WT α-sinukleina. Izbrane spojine so bile pripravljene kot založne raztopine v DMSO in shranjene pri -20 °C. Eksperiment smo izvedli pri istih pogojih inkubacije, kot je opisano v 3.5.1. Končna koncentracija α-sinukleina je bila 70  $\mu$ M in koncentracija testiranih spojin 300  $\mu$ M (končna koncentracija DMSO 0,75 % (v/v)). Za kontrolo smo α-sinuklein inkubirali z ekvivalentnim volumnom DMSO. Med večdnevno inkubacijo smo jemali 10  $\mu$ l vzorce za meritve ThT fluorescence (glej 3.8.2). Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali (24.000 g, 30 min, 20 °C) in s kemičnim povezovanjem proteinov in NaDS-PAGE (glej 3.4.2 in 3.4.3) ovrednotili količino topnega proteina v supernatantu.



Slika 13: Strukturne formule izbranih spojin. Figure 13: The structures of the selected compounds.

#### 3.6 MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO

Mikroskop na atomsko silo (AFM, ang.: Atomic Force Microscope) smo uporabili za opazovanje morfologije agregiranih oblik  $\alpha$ -sinukleina divjega tipa, mutantov Y39A in Y(125,133,136)A. AFM omogoča vizualizacijo topografije vzorca na nanometerski skali. Princip delovanja temelji na medatomskih odbojnih silah med izjemno ostro konico tipala, ki se nahaja na skrajnem robu ročice mikroskopa, in površino vzorca (slika 14).

Ko vzorec pomikamo vzporedno glede na površino vzorca (*x-y skeniranje*), konica tipala sledi topografskim potezam vzorca. Sila med vzorcem in tipalom povzroči deformacijo oz. upogib ročice, kar merimo z laserskim žarkom, ki sveti na zgornjo površino ročice in od koder se odbije v fotodetektor (fotodioda). Signal iz fotodetektorja sporoči kontrolni enoti, za kakšno vrsto upogiba gre, kar se odrazi v premiku piezo električnega stojala (*z regulacija*) tako, da laserski žarek spet pada točno na sredino fotodetektorja. Procesna enota iz velikosti premika vzorca sestavi sliko na računalniku. Topografijo vzorca lahko snemamo na več različnih načinov, najpogostejša sta (i) kontaktni način (*contact mode*), kjer je konica stalno v stiku s površino vzorca in (ii) kontaktni način v presledkih (*tapping mode*), kjer je konica v stiku s površino vzorca v presledkih (oscilira) (Irman, 2010; Skoog in sod., 2007).



Slika 14: Osnovni sestavni deli mikroskopa na atomsko silo. Figure 14: Basic components of the atomic force microscope.

#### Pogoji merjenja

Mikroskopirali smo z AFM mikroskopom Nanoscope IIIa Multimode (Digital Instruments, ZDA), v kontaktnem načinu v presledkih. 20 - 30  $\mu$ l raztopine proteina (neredčeno za 3-dni inkubirani mutanti ter 10× redčeno za vse ostale vzorce) smo nanesli na sveže odklano površino sljude (Electron Microscopy Sciences, ZDA) in inkubirali 20 min pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce nežno sprali z deionizirano vodo (Braun, Nemčija) in posušili z dušikom. Uporabili smo običajne nosilce (AC160TS; Olympus, Japonska) z radijem tipala <10 nm in resonančno frekvenco okoli 300 kHz. Slike smo posneli pri hitrosti skeniranja 1 Hz, pri resoluciji 512 × 512 pikslov.

#### 3.7 PRIPRAVA MODELNIH LIPIDNIH MEMBRAN

Pripravili smo lipidne vezikle različnih velikosti (MLV, SUV) ter različne sestave (DPPC, DPPG, POPC, POPG, gangliozida GM1 in GM3). Vse lipide smo kupili od proizvajalca Avanti Polar Lipids (ZDA). Strukturne formule uporabljenih fosfolipidov so prikazane na sliki 15 in gangliozidov na sliki 10. DPPC in POPC sta nevtralna, DPPG in POPG pa negativno nabita fosfolipida. DPPC in DPPG vsebujeta nasičene maščobne kisline iz 16 ogljikovih atomov in pri sobni temperaturi tvorita lipidne dvosloje, ki so v tekoči urejeni fazi. POPG in POPC vsebujeta eno nasičeno maščobno kislino iz 16 ogljikovih atomov in eno nenasičeno maščobno kislino iz 18 ogljikovih atomov. Pri sobni temperaturi je lipidni dvosloj v tekoči neurejeni fazi.

Po končani pripravi veziklov smo koncentracijo PC lipidov določali z encimskim testom Phospholipids B po navodilih proizvajalca (Wako Chemicals GmbH, Nemčija).



Slika 15: Strukturne formule uporabljenih fosfolipidov. Figure 15: The structures of the phospholipid molecules.

# 3.7.1 Priprava MLV

Založno raztopino lipidov v kloroformu ali mešanici kloroform:metanol 7:3 (v/v) smo prenesli v stekleno bučko in topilo počasi odparili na rotavaporju (Büchi, Švica). Za popolno odstranitev vseh sledi topila je proces potekal minimalno pet ur. Na steni bučke je nastal tanek film lipidov, ki smo ga rehidrirali v HEPES pufru, segretem na 50 °C. S pomočjo vibracijskega stresalnika in dodanih steklenih kroglic smo lipidni film raztopili v pufru. Nastali so MLV, ki smo jih prepihali z dušikom, shranili na -20 °C ter porabili v enem tednu.

# 3.7.2 Priprava SUV

SUV smo pripravili iz MLV veziklov z ultrazvočnim soniciranjem (delovni interval: 10 s, prekinitev: 10 s; amplituda: 40 %, čas soniciranja: 15 min). Postopek smo izvajali na ledeni kopeli. Po soniciranju smo vezikle ~40 min inkubirali v vodni kopeli s temperaturo 50 °C in jih nato centrifugirali (6000 g, 5 min), da smo odstranili morebitne delce sonde. Tako pripravljene vezikle smo porabili v enem dnevu.

### 3.7.3 Priprava veziklov s kalceinom

Za pripravo lipidnih veziklov z vključenim kalceinom smo lipidni film rehidrirali v HEPES pufru z dodanim 80 mM kalceinom (Sigma-Aldrich, ZDA). Vezikle z vključenim kalceinom smo od prostega kalceina ločili z gelsko filtracijo na Sephadex G-50 gelu (Sigma-Aldrich, ZDA) na koloni višine 10 cm in premera 1 cm. Gel smo večkrat centrifugirali 10 min pri 1000 rpm (centrifuga 322A, Tehtnica Železniki, Slovenija).

# 3.8 FLUORESCENČNA SPEKTROSKOPIJA

S fluorimetrijo smo spremljali agregacijo oz. fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina ter vpliv  $\alpha$ -sinukleina na integriteto in fluidnost modelnih lipidnih membran. Fluorescenca je pojav, pri katerem se molekula, ki absorbira svetlobo in s tem preide v višje vzbujeno stanje, vrne v osnovno stanje s sevalnim prehodom. Take molekule fluorescirajo in jih imenujemo fluorofori. Za pojav fluorescence je značilno, da je energija oddane svetlobe manjša od energije absorbirane svetlobe, posledično se maksimumi spektra pomaknejo k višjim valovnim dolžinam (Stokesov premik) (Lakowicz, 1999).

Meritve smo opravili v kvarčnih kivetah z optično potjo 10 mm (Agilent Technologies, ZDA), s fluorescenčnim spektrofotometrom Cary Eclipse (Varian, Avstralija). Nastavitev širine rež za vzbujanje in emisijo fluorescence je bila 5 nm. Če ni drugače navedeno, so bile meritve opravljene pri 25 °C.

### 3.8.1 Fluorescenca ANS

Fluorescenčni označevalec 1-anilinonaftalen-8-sulfonat (ANS, slika 16) smo uporabili za zaznavanje konformacijskih sprememb oz. izpostavitev hidrofobnih področij  $\alpha$ -sinukleina. Ob vezavi na hidrofobne predele proteinov se intenziteta fluorescence ANS močno poveča in maksimum emisije se premakne h krajšim valovnim dolžinam (moder premik) (Hawe in sod., 2008).

### Pogoji merjenja

50 μl α-sinukleina s koncentracijo 70 μM smo dodali k raztopini ANS v HEPES pufru, tako da je bilo končno molarno razmerje ANS/protein enako 50. Po 5 min inkubaciji smo posneli fluorescenco ANS v območju od 400 do 600 nm pri vzbujevalni svetlobi 350 nm.

## 3.8.2 Fluorescenca ThT

Fluorescenčno barvilo tioflavin T (ThT, slika 16) smo uporabili za detekcijo amiloidnih fibril v raztopini oz. za spremljanje kinetike fibrilacije proteinov. Po vezavi na fibrile, se barvilu ThT močno poveča kvantni donos emisije in karakteristično spremeni fluorescenčni spekter s premikom maksimuma emisije iz ~440 nm na ~480 nm. Mehanizem vezave ThT je še vedno nepojasnjen, predvideva pa se, da je za vezavo potrebna prisotnost specifične navzkrižne  $\beta$ -strukture fibril (Biancalana in Koide, 2010).

### Pogoji merjenja

10  $\mu$ l  $\alpha$ -sinukleina s koncentracijo 70  $\mu$ M smo dodali k 1 ml 10  $\mu$ M raztopine ThT v HEPES pufru. Po 5 min inkubaciji smo posneli fluorescenco ThT v območju od 460 do 520 nm pri vzbujevalni svetlobi 444 nm. Kinetiko fibrilacije smo spremljali s fluorescenco ThT pri valovni dolžini 480 nm.



Slika 16: Strukturni formuli ANS in ThT. Figure 16: Structures of ANS and ThT.

### 3.8.3 Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov

Z merjenjem sproščanja kalceina lahko dokažemo tvorbo por oz. porušenje integritete membrane ob vezavi proteina. Kalcein je fluorescenčna molekula premera 1,1 nm, ki se sprošča iz veziklov ob permeabilizaciji membrane. Koncentracija kalceina v intaktnih veziklih je bila 80 mM. Pri tej koncentraciji prihaja do samogašenja fluorescence. Ko se kalcein sprosti iz veziklov, se razredči, ni več pojava samogašenja in intenziteta fluorescence se poveča.

### Pogoji merjenja

Fluorescenco kalceina smo vzbujali pri 495 nm in merili emisijo pri 515 nm. V kiveto smo dali 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,0 pufer in SUV z vključenim kalceinom, ter dodali protein. Koncentracija veziklov je bila 0,1 mg/ml (~130  $\mu$ M). Koncentracijo proteina smo prilagodili, da smo dosegli R = 10. Časovni potek spreminjanja intenzitete fluorescence smo spremljali pri različnih temperaturah (25, 40, 45 in 50 °C), ob mešanju. Permeabilnost veziklov inducirano s strani proteina, smo izrazili kot odstotek sproščenega kalceina, doseženega z dodatkom detergenta Triton X-100 (Sigma-Aldrich, ZDA) v končni 2 mM koncentraciji.

Sproščanje kalceina iz liposomov smo izračunali po spodnji enačbi (enačba 1):

Sproščeni kalcein (%) =  $(F - F_{min}) / (F_{max} - F_{min}) \times 100$  ... (1)

pri čemer F predstavlja intenziteto fluorescence kalceina po končani inkubaciji s proteinom;  $F_{min}$  je fluorescenca prostega kalceina, ki je enaka intenziteti fluorescence veziklov pred dodatkom proteina;  $F_{max}$  pa je maksimalna fluorescenca kalceina izmerjena po dodatku detergenta.

### 3.8.4 Fluorescenčna anizotropija DPH in TMA-DPH

Za ugotavljanje fluidnosti oz. stopnje urejenosti lipidnega dvosloja po interakciji z  $\alpha$ sinukleinom, smo izvedli meritve fluorescenčne anizotropije fluoroforjev 1,6-difenil-1,3,5heksatriena (DPH) in njegovega kationskega derivata trimetilamonij-6-fenil-1,3,5heksatriena (TMA-DPH) (slika 17). Pri fluorescenčni anizotropiji določamo stopnjo reorientacije fluoroforja med polarizirano vzbujevalno in emisijsko ravnino. Ker je stopnja reorientacije fluorescenčne emisije odvisna od rotacijske difuzije fluoroforja, lahko pridobimo informacije o viskoznosti medija (Lakowicz, 1999).

Z DPH in TMA-DPH lahko zasledimo dinamiko lipidov na različnih globinah lipidnega dvosloja. DPH je hidrofoben in se inkorporira znotraj nepolarnega lipidnega dvosloja na različnih pozicijah, medtem ko polarna regija TMA-DPH ostane zasidrana na interfazi membrane med lipidi in vodo ter tako omogoči preučevanje membranskih lastnosti v regiji lipidnih glav (Lakowicz, 1999). Anizotropija DPH in TMA-DPH je odvisna od stopnje pakiranja membranskih verig in jo lahko povežemo z ureditvenim parametrom, S (Kuhry in sod., 1983).

### Pogoji merjenja

Meritve smo opravili na fluorescenčnem spektrometru z uporabo polarizatorjev z nominalno pasovno širino 5 nm za ekscitacijo in emisijo. Raztopino SUV smo označili s fluoroforjem DPH oz. TMA-DPH (1 mM oz. 2 mM založna raztopina v DMSO). Končna koncentracija lipidov je znašala 0,1 mg/ml (~130  $\mu$ M) z 1  $\mu$ M DPH oz. 2  $\mu$ M TMA-DPH. 400  $\mu$ l tako pripravljene suspenzije SUV smo titrirali z založno raztopino proteina do doseženega R = 500 (dodali smo 20  $\mu$ l založne raztopine 1), R = 100 (dodali smo 20  $\mu$ l založne raztopine 2) in R = 10 (dodali smo 40  $\mu$ l založne raztopine 3). Za kontrolo smo vezikle titrirali s HEPES pufrom. Meritve fluorescenčne anizotropije smo opravili po 10 min inkubaciji ob konstantnem mešanju pri različnih temperaturah (25 °C, 40 °C in 50 °C). Anizotropijo fluorescence DPH oz. TMA-DPH smo merili pri ekscitacijski valovni dolžini 358 nm, z vertikalno orientiranim ekscitacijskim polarizatorjem, medtem ko smo vertikalne in horizontalne komponente polarizirane svetlobe detektirali pri 410 nm. Rezultate smo podali kot fluorescenčno anizotropijo (r) DPH oz. TMA-DPH v odsotnosti ali prisotnosti proteina.

Anizotropija je bila izračunana z vgrajenim programom inštrumenta po spodnji enačbi (enačba 2),

$$\mathbf{r} = \mathbf{I}_{HH} - \mathbf{G}\mathbf{I}_{HV} / \left(\mathbf{I}_{HH} + 2\mathbf{G}\mathbf{I}_{HV}\right) \qquad \dots (2)$$

kjer sta I<sub>HH</sub> in I<sub>HV</sub> intenziteti fluorescence horizontalno in vertikalno polarizirane emisije, ko vzorec vzbujamo z vertikalno polarizirano svetlobo (Lakowicz, 1999). Pri vsaki meritvi smo izmerili tudi vrednost G-faktorja (t.j. korekcijski faktor za meritve anizotropije), ki je definiran kot razmerje občutljivosti detekcijskega sistema za vertikalno in horizontalno polarizirano svetlobo (Lakowicz, 1999). Rezultat pri vsakemu od pogojev je povprečje najmanj dveh neodvisnih eksperimentov.

Iz vrednosti anizotropije smo izračunali ureditveni parameter (enačba 3) (Pottel in sod., 1983):

$$S = [(1 - 2r / r_0) + 5(r / r_0)^2)^{1/2} - 1 + r / r_0] / (2r / r_0) \qquad \dots (3)$$

kjer je  $r_0$  vrednost fluorescenčne anizotropije DPH oz. TMA-DPH v odsotnosti kakršnegakoli rotacijskega gibanja fluoroforja. Fluidnost membrane je definirana kot recipročna vrednost ureditvenega parametra. Teoretična vrednost za  $r_0$  znaša 0,4, medtem ko eksperimentalne vrednosti ležijo med 0,362 in 0,394 (Pottel in sod., 1983). Za izračune smo uporabili eksperimentalno določeno vrednost za DPPC pri 5 °C, ki za DPH znaša 0,370 in za TMA-DPH 0,369.



Slika 17: Strukturni formuli DPH in TMA-DPH. Figure 17: Chemical structures of the fluorescent probes DPH and TMA-DPH.

#### 3.9 CIRKULARNI DIHROIZEM

S pomočjo cirkularnega dihroizma (CD; ang. circular dichroism) smo določili vsebnost sekundarne strukture proteinom v pufrski raztopini in po vezavi na modelne membrane. CD je spektroskopska metoda, ki jo uporabljamo za merjenje optične aktivnosti molekul v raztopini. Ob prehodu linearno polarizirane svetlobe (ki je vsota levo in desno cirkularno polarizirane svetlobe) skozi vzorec, pride do faznega zamika in diferencialnega zmanjšanja amplitude levo in desno cirkularno polarizirane svetlobe. Izhodni žarek je posledično eliptično polariziran. To omogoča analizo konformacijskih stanj proteinov, saj polipeptidne amidne vezi  $\alpha$ -strukture,  $\beta$ -strukture in konformacije naključnega klopčiča, kažejo različno absorbcijo UV svetlobe. Pri proteinih uporabljamo dve območji merjenja: daljno UV- območje (190 – 250 nm) in bližnje UV-območje (250 – 320 nm). V daljnem UV območju prevladujejo prispevki peptidnih vezi in tako dobimo predvsem informacijo o sekundarni strukturi proteinov. V bližnjem UV območju prevladujejo prispevki aromatskih aminokislin in v manjšem obsegu tudi disulfidnih vezi, ki nam dajo informacije o terciarni strukturi (Greenfield, 2006).

### Pogoji merjenja

CD meritve smo opravili na CD spektrometru 62A DS (AVIV, ZDA), opremljenim s termoelektrično enoto za temperaturno regulacijo. Za meritve smo uporabili 1-mm kvarčno kiveto (Starna, ZDA). Posneli smo spektre pufra, proteina in proteina s SUV v daljnem UV območju (200 - 260 nm). Interval merjenja je bil 0,5 nm in čas integriranja 4 s, spektri so bili posneti v temperaturnem območju od 25 do 70 °C. Koncentracija proteina je bila 35  $\mu$ M, koncentracijo SUV smo prilagodili, da smo dosegli R = 10. Od spektrov proteina in proteina z vezikli smo odšteli spekter pufra posnetega pri enakih pogojih. Za primerjavo CD spektrov različnih proteinov smo eksperimentalne vrednosti o eliptičnosti  $\theta$  (mdeg) pretvorili v povprečno molarno eliptičnost AK ostanka (deg cm<sup>2</sup>/dmol). Molsko eliptičnost pri dani  $\lambda$ ([ $\theta$ ]<sub> $\lambda$ </sub>) smo izračunali po enačbi (enačba 4):

 $[\theta]_{(\lambda)} = (\theta_{(\lambda)} \cdot \mathbf{M}_0) / (100 \cdot c \cdot \mathbf{l}) \qquad \dots (4)$ 

kjer je  $M_0$  povprečna molska masa AK ostanka (g/mol), *c* je koncentracija proteina (mg/ml), l pa dolžina poti žarka skozi vzorec (cm). Za izračun deleža  $\alpha$ -vijačnice v sekundarni strukturi proteinov smo uporabili program Contin. Program primerja spekter preučevanega proteina s spektri 16 proteinov, ki jim je bila določena sekundarna struktura s pomočjo rentgenske kristalografije, pri čemer določi tudi interval napake (Provencher in Gloeckner, 1981).

### 3.10 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC; ang. Differential Scanning Calorimetry) je zelo uporabna metoda za proučevanje toplotno induciranih sprememb lipidnih struktur pri interakciji z ostalimi spojinami ali makromolekulami. Z DSC smo merili vpliv  $\alpha$ -sinukleina na termične in termodinamske lastnosti membranskih veziklov (temperaturo in entalpijo faznega prehoda lipidov).

Termični blok instrumenta DSC vsebuje dve identični merilni celici, referenčno in vzorčno. Metoda temelji na ohranjanju enake temperature v obeh celicah ob hkratnem segrevanju s konstantno hitrostjo. Procesi v vzorcu, pri katerih se sprošča ali porablja toplota, dq, povročijo spremembo v temperaturi. Če senzor zazna nižjo temperaturo celice z vzorcem, kot je v primeru faznega prehoda lipidov (endotermi proces), dovaja dodatno toplotni tok (dq/dt), da se ohrani enaka temperatura v obeh celicah. Termično inducirani procesi v vzorcu, pri katerih se toplota sprošča ali pa porablja, povzročijo spremembo v toplotnem toku, ki ga beležimo kot funkcijo temperature (termogram). Če toplotni tok (dq/dt) pomnožimo z recipročno vrednostjo hitrosti segrevanja,  $(dT/dt)^{-1}$ , in delimo z molarno koncentracijo lipidov, dobimo presežno molarno toplotno kapaciteto (C<sub>p</sub>) v odvisnosti od temperature (Skoog in sod., 2007; Goñi in Alonso, 2006).

Presežna molarna toplotna kapaciteta je definirana kot (enačba 5):

$$C_p = q_p / \Delta T \qquad \dots (5)$$

kjer je  $q_p$  toplota,  $\Delta T$  pa razlika v temperaturi.

Količina toplote  $q_p$ , ki jo sistem prejema ali oddaja pri konstantnem tlaku, je enaka spremembi entalpije  $\Delta H$  (enačba 6),

$$\Delta H_{cal} = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \qquad \dots (6)$$

kjer sta T<sub>1</sub> in T<sub>2</sub> temperaturi, pri katerih se proces začne oz. konča. Sprememba entalpije,  $\Delta H_{cal}$ , je enaka površini pod krivuljo  $C_p$  v odvisnosti od temperature (Atkins in De Paula, 2006; Goñi in Alonso, 2006).

#### Pogoji merjenja

Prehode lipidov iz tekočega urejenega stanja v tekoče neurejeno stanje smo spremljali z NANO DSC serije III sistemom (Calorimetry Science, ZDA). Merili smo specifično toplotno kapaciteto MLV, sestavljenih iz DPPC, DPPC:DPPG 1:1 ali DPPG, v prisotnosti  $\alpha$ -sinukleina (in tudi SUV brez proteina). Koncentracija lipidov je bila vedno 0,5 mg/ml (~680  $\mu$ M), koncentracijo proteina smo prilagodili, da je bilo doseženo razmerje R = 10. Pred merjenjem smo raztopine odzračevali (vakuumska črpalka Thermolyne Nuova Stirrer, Thermo Scientific, ZDA), da smo preprečili nastanek mehurčkov med meritvami. Referenčno celico smo napolnili s HEPES pufrom. Segrevanje je potekalo od 10 - 70 °C s hitrostjo 1 °C/min. Iz prve meritve smo določili temperaturo (T<sub>m</sub>) in entalpijo ( $\Delta$ H<sub>cal</sub>) faznega prehoda. Iz naslednjih dveh meritev smo ocenili reverzibilnost faznega prehoda lipidov. Iz DSC poskusov dobljene termograme smo analizirali z uporabo programskega orodja OriginPro8.1 (OriginLab Corporation, ZDA). Termogrami so prikazani kot presežna molarna toplotna kapaciteta <Cp> (kJ/molK) v odvisnosti od temperature (°C).

#### 3.11 PREHOD SKOZI KRVNO-MOŽGANSKO PREGRADO IN ZAŠČITA NEVRONOV

Prehod izbranih spojin, t.j. kvercetina (Q), epigalokatehin galata (EGCG), cianidin-3glukozida (C3G) in nikotina (N) (slika 13) preko *in vitro* modela BBB (ang. blood-brain barrier; krvno-možganska pregrada) smo spremljali s HPLC analizo. Zaščitni učinek izbranih spojin na živčne celice smo ovrednotili iz deleža apoptotičnih in nekrotičnih celic primarne kulture nevronov pri pogojih oksidativnega stresa.

Vse celične kulture smo gojili pri 37 °C v atmosferi s 5 % vsebnostjo CO<sub>2</sub> (inkubator HERAcell 150, Thermo Scientific, ZDA). Izbrane spojine smo pripravili kot založne raztopine v etanolu in jih shranili pri -20 °C. Pripravili smo takšne založne raztopine, da je bila končna koncentracija etanola (v/v) v celičnem mediju 1 % (študij transmembranskega transporta; glej 3.11.3) oz. 0,5 % (študij nevroprotektivnosti; glej 3.11.4). Za kontrolo smo celično linijo (glej 3.11.1) in nevrone (glej 3.11.1.2) inkubirali z ekvivalentno količino

etanola. Stabilnost izbranih spojin v celičnem inkubacijskem mediju, t.j. raztopini Ringer-HEPES pH 7,4 in mediju Neurobasal, smo določili s HPLC analizo (glej 3.11.2) in s spremljanjem antioksidativne učinkovitosti spojin (glej 3.12.2).

# 3.11.1 Celična kultura in vzdrževanje

### 3.11.1.1 Celična linija HBMEC

Možganske mikrovaskularne endotelijske celice tvorijo osnovo BBB in se zato pogosto uporabljajo kot poenostavljen model te pregrade *in vitro* (Bernas in sod., 2010). Za ovrednotenje transporta izbranih spojin skozi model BBB (glej 2.11.3) smo uporabili konfluentno monoslojno celično linijo HBMEC (ang. Human Brain Microvascular Endothelial Cells), ki je možganska endotelijska celična linija človeškega izvora in izhaja iz primarne kulture HBMEC transfecirane z velikim T-antigenom virusa SV40 (Stins in sod., 2001). Transfecirane endotelijske celice se morfološko ne razlikujejo od nativnih endotelijskih celic in izražajo specifične endotelijske markerje, kot je faktor VIII-Rag.

Celice HBMEC smo gojili v HBMEC-kultivacijskem mediju (obogateni RPMI medij). Ob doseženi konfluentnosti smo celične povezave ter povezave med celicami in podlago pri 37 °C prekinili s 5 min tretiranjem z raztopino tripsina (Sigma-Aldrich, ZDA). Delovanje tripsina smo zaustavili z dodatkom 10 % FBS (Biochrom AG, Nemčija) v RPMI mediju. Celice z gostoto  $0.8 \times 10^5$  celic/insert smo prenesli na semipermeabilne vstavke oz. inserte ( $0.4 \mu m$ , Corning Costar Corp., ZDA), prekrite s kolagenom I (Biosciences BD, Belgija), ki so bili nameščeni v ploščah z 12 jamicami.

### 3.11.1.2 Primarna kultura nevronov

Primarno kulturo kortikalnih nevronov smo pripravili iz možganskega korteksa 18 dni starih fetusov podgan Wistar. Breje podgane smo žrtvovali s CO<sub>2</sub>, možganski korteks fetusov pa zbrali v HBSS-1 raztopini (Gibco, ZDA). Po fragmentaciji smo tkivo 15 min pri 37 °C inkubirali z 0,025 % tripsinom (Sigma-Aldrich, ZDA) v HBSS-2 (Gibco, ZDA). Celice smo centrifugirali (1 min, 700 g), jih sprali v HBSS-2 z dodanim 10 % FBS (Biochrom AG, Nemčija), resuspendirali in ponovno centrifugirali (5 min, 1.500 g). Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v obogatenem Neurobasal mediju. Celice z gostoto  $1 \times 10^5$  celic/cm<sup>2</sup> smo prenesli na s poli-D-lizinom (Sigma-Aldrich, ZDA) prekrita krovna stekla, položena v plošče z 12 jamicami in jih vzdrževali v celičnem inkubatorju pri 37 °C. Vsake 3 dni smo 500 µl starega medija zamenjali z istim volumnom svežega obogatenega Neurobasal medija brez glutaminske kisline. Celice smo uporabili za eksperiment po 11-dnevni inkubaciji.

### 3.11.2 HPLC analiza izbranih spojin

Vse izbrane spojine v preučevanem apikalnem in bazolateralnem mediju (glej 3.11.3) smo kvalitativno in kvantitativno določili s HPLC-DAD (Agilent Technologies, Nemčija). Prav tako smo s HPLC analizo določili celični privzem izbranih spojin (glej 3.11.3.2) in stabilnost izbranih spojin v celičnem mediju (Ringer-HEPES pH 7,4 in Neurobasal medij). Uporabili smo reverzno C18 kolono (Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, Agilent Technologies, Nemčija) in analitsko zaščitno kolono Agilent Eclipse XBD-C18. Pogoji ločbe za posamezne izbrane spojine so navedeni v preglednici 4. Posneli smo kromatograme v območju valovnih dolžin od 200 do 600 nm.

spojina	mobilna faza	pogoji HPLC analize
kvercetin, EGCG	A: 0,1 % HCOOH B: acetonitril z 0,1 % HCOOH	$\begin{array}{l} T_{kolone}: 30 \ ^{\circ}\text{C} \\ V_{injekcijski}: 40 \ \mu\text{l} \\ pretok: 0,8 \ m\text{l/min} \\ gradient: 0 - 30 \ min: 5 - 25 \ \% \ B, 30 - 35 \ min: 25 - 40 \ \% \\ B, 35 - 40 \ min: 40 - 95 \ \% \ B, 40 - 45 \ min: 95 \ \% \ B, 45 - 45,5 \ min: 5 \ \% \ B \end{array}$
C3G	A: 3 % HCOOH B: acetonitril:metanol = 85:15 (v/v)	$\begin{array}{l} T_{kolone}: 40 \ ^{\circ}\text{C}, \\ V_{injekcijski}: 80 \ \mu\text{l} \\ \text{pretok: } 25 \ \text{min } 0,8 \ \text{ml/min, nato } 30 \ \text{min } 1,0 \ \text{ml/min} \\ \text{gradient: } 0 \ \text{-} \ 13 \ \text{min: } 5 \ \text{-} \ 8 \ \% \ B, \ 13 \ \text{-} \ 25 \ \text{min: } 8 \ \text{-} \ 9 \ \% \ B, \\ 25 \ \text{-} \ 45 \ \text{min: } 9 \ \text{-} \ 13 \ \% \ B, \ 45 \ \text{-} \ 46 \ \text{min: } 13 \ \text{-} \ 100 \ \% \ B, \ 46 \\ \text{-} \ 48 \ \text{min: } 100 \ \% \ B, \ 48 \ \text{-} \ 49 \ \text{min: } 95 \ \text{-} \ 5 \ \% \ B, \ 49 \ \text{-} \ 55 \ \text{min: } \\ 5 \ \% \ B \end{array}$
nikotin	A: 10 mM amonijev acetat B: 10 mM amonijev acetat v metanolu	$\begin{array}{l} T_{kolone}: 25 \ ^{\circ}\text{C} \\ V_{injekcijski}: 40 \ \mu\text{l} \\ \text{pretok: } 0,8 \ \text{ml/min.} \\ \text{gradient: } 0 \  3,75 \ \text{min: } 10 \  100 \ \% \ \text{B}, 3,75 \  15 \ \text{min: } 100 \\ \% \ \text{B}, 15 \  15,5 \ \text{min: } 100 \  10 \ \% \ \text{B}, 15,5 \  20 \ \text{min: } 10 \ \% \ \text{B} \end{array}$

Preglednica 4: Pogoji HPLC-analize vzorcev. Table 4: The HPLC analysis conditions.

### 3.11.3 Transport skozi model krvno-možganske pregrade

Eksperimente transendotelijske permeabilnosti izbranih spojin smo izvedli 8 dni po nacepitvi celic HBMEC na semipermeabilne inserte (0,4  $\mu$ m, Corning Costar Corp., ZDA) (glej 3.11.1.1). Inserti imajo dva dobro definirana razdelka (slika 18): apikalni ali zgornji razdelek (*krvna stran*) in bazolateralni ali spodnji razdelek (*možganska stran*).



Slika 18: Prikaz ene vdolbinice posebne gojiščne plošče z 12 vdolbinicami. Vsaka vdolbinica vsebuje vstavek z mikroporno membrano, na katero smo nacepili celice HBMEC.

Figure 18: The well of a special incubation 12-wells plate. Each well contains an insert with a microporus membrane on which HBMEC cells were grown.

Konfluentno monoslojno HBMEC linijo smo inkubirali z različnimi koncentracijami izbranih spojin in v časovnih intervalih sledili transendotelijskemu transportu. Kot inkubacijski medij smo uporabili Ringer-HEPES pH 7,4. Na kratko, po odstranitvi HBMEC-kultivacijskega medija smo 500  $\mu$ l izbrane spojine, raztopljene v Ringer-HEPES raztopini, dodali na apikalno stran celic. Isti medij (1.500  $\mu$ l) brez dodane izbrane spojine smo dodali v spodnji razdelek. Po končani inkubaciji in po meritvi TEER (glej 3.11.3.1.1) smo medij (t.j. vzorce) iz zgornjega in spodnjega razdelka shranili na -80 °C do HPLC analize (glej 3.11.2). Učinkovitost transporta smo podali v odstotkih; izračun je podan v enačbi 7.

### Učinkovitost transporta (%) = $c_{\text{spod}} / c_{\text{zgor}} \times 100$ ... (7)

 $c_{\text{spod}}$  predstavlja koncentracijo izbrane spojine v spodnjem razdelku ob času X,  $c_{\text{zgor}}$  pa koncentracijo izbrane spojine v zgornjem razdelku ob času X.

Uporabljene inserte smo nadalje uporabili za test permeabilnosti (glej 3.11.3.1.2) ali za določanje privzema izbranih spojin v celice (glej 3.11.3.2).

### 3.11.3.1 Ovrednotenje integritete celic HBMEC

Izbrane spojine bi lahko prečkale endotelijski monosloj preko transcelularnega ali paracelularnega mehanizma. Da bi izključili transport zaradi izgube integritete HBMEC monosloja med izvedbo eksperimenta, smo merili transendotelijsko električno upornost (TEER) in permeabilnost natrijevega fluoresceina (Na-F). Padec vrednosti TEER in/ali povišana transcelularna permeabilnost za majhne molekulske poročevalce kažejo na povišano permeabilnost in s tem izgubo funkcije bariere.

### 3.11.3.1.1 Meritve TEER

TEER odraža upornost endotelijske pregrade za prehod majhnih ionov in je zato uporaben indikator paracelularnega ionskega toka (Cardoso in sod., 2010). Celicam, ki so rasle na mikroporni membrani insertov, smo merili TEER z EndOhm<sup>TM</sup> komoro, sklopljeno z EVOMX uporometrom (World Precision Instruments, Inc., ZDA). Meritve smo opravili pred dodatkom izbranih spojin (t = 0) in ob koncu vsake inkubacijske dobe. Rezultat TEER meritev je podan kot odstotek odstopanja od TEER vrednosti kontrolnega inserta po odšteti TEER vrednosti praznega inserta.

### 3.11.3.1.2 Permeabilnost Na-F

Po končanem eksperimentu in po odstranitvi medija (t.j. vzorcev) smo izvedli test permeabilnosti z Na-F (Mr = 376 Da), kot je opisano v Veszelka in sod. (2007). Na kratko, inserte smo prenesli v plošče z 12 jamicami, ki so v spodnjem razdelku vsebovale raztopino Ringer-Hepes pH 7,4. V zgornji razdelek smo dodali raztopino Na-F (10  $\mu$ g/ml v Ringer-HEPES pH 7,4). Inserte smo po 20, 40 in 60 min prenesli v nove jamice in nato določili količino Na-F v raztopinah iz spodnjih razdelkov (Hitachi F-2000 fluorescenčni spektrofotometer, vzbujevalna svetloba: 440 nm, emisija: 525 nm). Merili smo tudi prehod preko insertov brez celic. Endotelijski permeabilnostni koeficient (*Pe*) je izračunala dr. Inês Palmela (iMed, Lizbona, Portugalska) po postopku, opisanem v Deli in sod. (2005).

# 3.11.3.2 Privzem izbranih spojin v celice

Privzem izbranih spojin v celice HBMEC smo preučili, kot je opisano v Youdim in sod. (2003), z določenimi modifikacijami. Inserte smo po odstranitvi medija (t.j. vzorcev) sprali s hladnim PBS pufrom (pH 7,4). Celice smo postrgali z inserta z uporabo 100 - 150  $\mu$ l lizirnega pufra (50 % metanol, 0,1 M HCl z/brez 10  $\mu$ M internim standardom). Celice smo nato homogenizirali s sonikacijo (20 s; cikel 0,5 s, amplituda 100 %). Lizat smo centrifugirali (10.000 g, 10 min, 4 °C) in z metodo po Bradfordu (BioRad, ZDA) določili količino proteinov v supernatantu. Pri metodi se barvilo Comassie briljantno modrilo veže na proteine, pri čemer se mu barva spremeni iz rdeče v modro, kar sledimo z merjenjem A<sub>595</sub>. Umeritveno krivuljo smo pripravili z raztopino BSA (Sigma-Aldrich, ZDA). Supernatant smo shranili pri -80 °C do HPLC analize (glej 3.11.2). Koncentracijo izbranih spojin smo izračunali iz razmerij površin vrhov glede na interni standard (HPLC analiza) in jo izrazili v mg/g proteina.

### 3.11.4 Določitev zaščitnega učinka na nevrone

Za ovrednotenje sposobnosti zaščite nevronov s strani izbranih spojin, smo primarno kulturo 11 dni starih podganjih nevronov (glej 3.11.1.2) najprej inkubirali z izbranimi spojinami in jo nato podvrgli oksidativnim pogojem. Na kratko, obogateni Neurobasal medij smo odstranili in ga nadomestili s 500  $\mu$ l izbrane spojine (1  $\mu$ M ali 50  $\mu$ M), raztopljene v Neurobasal mediju. Po 24 urni inkubaciji smo z dodatkom 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, ZDA) inducirali oksidativno poškodbo ter celice gojili nadaljnjih 24 ur. Za kontrolo smo celice gojili v odsotnosti izbranih spojin. Celice smo nato primerno obarvali (glej 3.11.4.1) ter iz morfologije in obarvanosti celičnih jeder sklepali na delež nekrotičnih in apoptočnih celic.

### 3.11.4.1 Določitev nekroze in apoptoze

Za določitev nekrotične in apoptotične celične smrti smo nevrone obarvali s fluorescentnimi barvili propidijevim jodidom (PJ) (Sigma-Aldrich, ZDA) in Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, ZDA).

Postopek smo izvedli v temi, da smo se izognili bledenju. Odstranili smo rastni medij in dodali 400 µl 75 µM PJ barvila v PBS ter inkubirali 20 min. PJ smo odstranili in celice 30 min fiksirali s 500 µl 4 % sveže pripravljene raztopine paraformaldehida (Sigma-Aldrich, ZDA) v PBS. Krovna stekla smo sprali s PBS in jih nato 2 min inkubirali v 500 µl barvila Hoescht 33258 (5 µg/ml v PBS). Krovna stekla smo odstranili, oprali z metanolom in prilepili na objektna mikroskopska stekla. Mikroskopiranje celic smo opravili s fluorescenčnim mikroskopom AxioScope.A1 (Zeiss, Nemčija), ki ima vgrajeno kamero Leica DFC 490 (Leica, Nemčija). Za vsak vzorec smo trije neodvisni raziskovalci prešteli vsaj 4 naključna mikroskopska polja. S preštetjem vseh modro obarvanih (barvilo Hoescht) jeder z uporabo ImageJ 1.29x programske opreme (N.I.H., ZDA) smo določili skupno število celic. Nekrotično celično smrt smo ovrednotili iz rdeče PJ fluorescence celičnega jedra (vzbujanje pri 493 nm, emisija pri 630 nm). PJ hitro prehaja in se veže na dsDNA neviabilnih celic, ne more pa prečkati membrane viabilnih celic. Apoptotično celično smrt smo določili
iz morfologije jedra Hoescht-obarvanih celic, kot je opisano v Silva in sod. (2001). Apoptotična jedra so fragmentirana in kažejo kondenziran kromatin.

Rezultat smo izrazili kot odstotek nekrotičnih in apoptotičnih celic glede na celotno število celic.

# 3.11.5 Statistična analiza podatkov

Vse eksperimente smo izvedli v najmanj treh ponovitvah. Rezultati so izraženi kot aritmetična sredina  $\pm$  SEM. Za statistično analizo rezultatov smo uporabili Studentov t-test, s 95 % stopnjo zaupanja, ali pa ANOVA test. Razlike smo določili za statistično značilne, če je bil p < 0,05.

# 3.12 DOLOČITEV ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI

Izbranim spojinam smo določili antioksidativno učinkovitost (v nadaljevanju AOU) z 2,2difenil-1-pikrilhidrazilnim (DPPH) testom. Ko antioksidant reagira z DPPH-radikalom (DPPH<sup>-</sup>), se tvori stabilna molekula DPPH<sub>2</sub>, kar povroči zmanjšanje absorbance pri 520 nm.

# 3.12.1 Antioksidativna učinkovitost v standardnih raztopinah

950 µl DPPH<sup>•</sup> (Sigma-Aldrich, ZDA) raztopine (100 µM v metanolu) smo dodali k 50 µl testne spojine v etanolu. Koncentracijo izbrane spojine smo prilagodili tako, da je po inkubaciji povzročila padec DPPH<sup>•</sup> absorbance za 50 %. Mešanico smo inkubirali natanko 30 min pri 25 °C in nato izmerili A<sub>520</sub> (HP 8453, Hewlett-Packard, Nemčija). Kot slepi poskus smo uporabili mešanico metanol:etanol 20:1 (v/v). Kontrolne raztopine so vsebovale 950 µl DPPH<sup>•</sup> raztopine in 50 µl etanola. Sposobnost lovljenja DPPH<sup>•</sup> smo izrazili kot TEAC (ang. <u>T</u>rolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina (Sigma-Aldrich, ZDA)) <u>e</u>quivalent <u>a</u>ntioxidant <u>c</u>apacity). 1 TEAC je enaka spremembi A<sub>520</sub>, ki jo povzroči 1 mM Trolox. Za vsako testirano spojino smo naredili tri neodvisne ponovitve.

## 3.12.2 Antioksidativna učinkovitost v celičnem mediju

Stabilnost izbranih spojin v celičnem inkubacijskem mediju, t.j. raztopini Ringer-HEPES pH 7,4 in mediju Neurobasal, smo določili s spremljanjem njihove antioksidativne učinkovitosti. 20 µl založne raztopine testiranih spojin smo dodali k 980 µl izbranega medija, tako da je bila končna koncentracija testiranih spojin 200 µM. Mešanico smo inkubirali pri 37 °C. Kontrolna raztopina medija (KRM) je vsebovala samo ekvivalentno količino etanola v mediju. V različnih časovnih intervalih smo jemali vzorce in določili sposobnost lovljenja DPPH radikala, kot je opisano prej (glej 3.12.1), z nekaj modifikacijami. 940 µl DPPH<sup>-</sup> raztopine smo dodali k 60 µl vzorca. Kontrola (Cnt) je vsebovala 940 µl DPPH<sup>-</sup> raztopine in 60 µl KRM. Za slepo probo smo uporabili mešanico metanola in KRM raztopine. Antioksidativno učinkovitost smo izrazili kot odstotek zmanjšanja absorbance DPPH<sup>-</sup> (enačba 8):

AOU (%) = 
$$(100 - A_{V 520} / A_{Cnt 520}) \times 100$$
 ... (8)

kjer je  $A_{V 520}$  absorbanca vzorca po 30 min inkubaciji in  $A_{Cnt 520}$  absorbanca kontrolne raztopine brez dodatka testirane raztopine.

# 4 REZULTATI

#### 4.1 PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA α-SINUKLEINA

α-Sinuklein WT ter mutanta Y39A in Y(125,133,136), smo pripravili v bakterijskem sevu *E. coli* BL21-Gold (DE3). Iz bakterijske kulture smo z obarjanjem pridobili proteinski vzorec, katerega smo nadalje ločili s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije z anionsko izmenjevalno kolono monoQ<sup>TM</sup> 4.6/100 PE (GE Healthcare Biosciences, Švedska), kjer so se proteini ločili glede na njihov naboj. Program gradientne ločbe smo sestavili s spreminjanjem deleža pufra B. Vsi trije proteini so eluirali v širokem območju okoli 300 mM NaCl (slika 19). Širina vrha je verjetno posledica različnih konformacijskih stanj proteina. Absorbanca v območju elucije α-sinukleina je nižja, kot bi pričakovali glede na veliko količino eluiranega proteina v primerjavi z ostalimi vrhovi. To pripisujemo zasledovanju proteina s spremljanjem A<sub>280</sub>, kjer absorbirajo aromatske aminokisline. WT α-sinuklein ima le 4 Tyr in 2 Phe, medtem ko ima trojna Tyr mutanta celo samo eden Tyr. Posledično detekcija α-sinukleina s spremljanjem A<sub>280</sub> ni najprimernejša, vendar je bilo merjenje pri A<sub>230</sub>, kjer absorbirajo peptidne vezi, zaradi velikega šuma onemogočeno. Najoptimalnejša bi verjetno bila detekcija proteinov z detektorjem, ki deluje na principu sipanja svetlobe (ang. dynamic light scattering; DLS), ki se pri kromatografski ločbi α-sinukleina tudi največkrat uporablja.



Slika 19: Kromatogram vzorca divjega tipa  $\alpha$ -sinukleina po ionsko-izmenjevalni kromatografiji na koloni monoQ 4.6/100 PE. Ločba je potekala v pufru A (50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4) s postopnim povečevanjem deleža pufra B (1 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4) od 0 – 100 % (siva črta). Obarvano je področje v katerem je eluiral  $\alpha$ -sinuklein.

Figure 19: The chromatographic profile of the wild-type  $\alpha$ -synuclein on ion-exchange monoQ 4.6/100 PE column. Elution was performed in buffer A (50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4) with gradual increase in buffer B content (1 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4) from 0 – 100 % (grey line). The coloured bracket represents  $\alpha$ -synuclein elution area.

α-Sinukleinske frakcije smo določili z NaDS-PAGE, jih združili in jih nato intenzivno dializirali proti MQ vodi (minimalno 36 ur). Pri dializi je prišlo do obarjanja večine proteinskih nečistoč (slika 20). Tako smo se izognili dodatnemu čiščenje proteina z gelsko kromatografijo. Glede na analizo z NaDS-PAGE in masno spektrometrijo sklepamo, da je bila čistost izoliranih proteinov več kot 95 %.



Slika 20: Analiza proteinskega vzorca z NaDS-PAGE pred dializo in v supernatantu po dializi. Figure 20: SDS-PAGE of the protein sample before the dialysis and in the supernatant fraction after the dialysis.

## 4.2 KARAKTERIZACIJA PROTEINOV

Najprej smo preverili ali zamenjava Tyr z Ala v zaporedju α-sinukleina vpliva na strukturne lastnosti in/ali agregacijsko težnjo proteina v pufrski raztopini. α-Sinuklein WT ter mutanta Y39A in Y(125,133,136)A smo raztopili v HEPES pufru (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0).

## 4.2.1 Določitev sekundarne strukture proteinov

Sekundarno strukturo proteinov smo določili s CD spektroskopijo. Posneli smo spektre od 200 do 260 nm, pri različnih temperaturah (slika 21). Znano je, da ima  $\beta$ -struktura minimum pri 217 nm, medtem ko ima  $\alpha$ -struktura dva minimuma, pri 209 ± 1 nm in 220 ± 2 nm. Vsi trije proteini kažejo pri vseh merjenih temperaturah karakteristični spekter za pretežno nestrukturirano sekundarno strukturo. Vrednost [ $\theta$ ]<sub>220</sub> pri vseh proteinih z naraščanjem temperature rahlo pada. S programom Contin (Provencher in Gloeckner, 1981) smo določili deleže elementov sekundarne strukture. Na sliki 22 so prikazani deleži  $\alpha$ -vijačne strukture pri različnih temperaturah. Na celotnem temperaturem območju delež  $\alpha$ -vijačnice pri nobenem od proteinov ne preseže 10 %.

## 4.2.2 Analiza z algoritmom TANGO

V kompleksnem procesu fibrilacije nativno nezviti  $\alpha$ -sinuklein pridobiva  $\beta$ -strukturo (Apetri in sod., 2006). Algoritem TANGO omogoča napoved proteinskih regij s težnjo po tvorbi  $\beta$ agregatov (Fernandez-Escamilla in sod., 2004). Nekoliko nižjo težnjo po tvorbi agregatov ima regija v bližini mutacije Y39A, medtem ko se za C-terminalnega mutanta Y(125,133,136)A napoved za tvorbo agregatov ne razlikuje od napovedi za WT protein (slika 23). temperatures. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.

program.



Slika 21: CD spektri divjega tipa  $\alpha$ -sinukleina (WT) in mutantov (Y39A in Y(125,133,136)A) pri različnih temperaturah. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0. Figure 21: CD spectra of the wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein at different



Slika 22: Delež sekundarne strukture  $\alpha$ -vijačnice divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina in mutantov (Y39A in Y(125,133,136)A) pri različnih temperaturah. Izračuni so bili opravljeni s programom Contin. Figure 22: The percentage of the helical structure of the wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein at different temperatures. The calculations were performed with Contin



Slika 23: Napoved  $\beta$ -agregacijskih regij divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina in mutantov (Y39A in Y(125,133,136)A) z algoritmom TANGO.

Figure 23: Prediction of  $\beta$ -aggregating regions of wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein using the TANGO algorithm.

# 4.2.3 Kemično povezovanje proteinov z glutaraldehidom

Na NaDS-PAGE gelu so tako WT  $\alpha$ -sinuklein kot oba mutanta potovali kot monomerne oblike z velikostjo ~15 kDa (slika 24A). Pri vseh treh proteinih smo opazili zelo šibko proteinsko liso okoli 35 kDa, kar ustreza velikosti dimera. Znano je, da  $\alpha$ -sinuklein na NaDS poliakrilamidnem gelu potuje pri nekoliko višjih molekulskih masah, kot bi pričakovali glede na teoretično določene vrednosti. Neobičajno počasno mobilnost pripisujejo slabši vezavi NaDS na močno kisel C-terminalni konec proteina (Weinreb in sod., 1996). Ker bi NaDS lahko porušil strukturo morebitnih oligomernih zvrsti, ki jih posledično na gelu ne bi mogli zaznati, smo proteinske vzorce kemično povezali z 2,5 % glutaraldehidom (slika 24B). Poleg prevladujoče monomerne oblike so bile v vzorcih povezanih proteinov na gelu vidne še proteinske lise pri ~35 in ~60 kDa (slika 24B), kar kaže na prisotnost manjše količine dimerov in tetramerov.

Da bi se izognili napačni interpretaciji rezultatov zaradi nespecifičnega kemijskega povezovanja, smo za optimizacijo postopka uporabili različne koncentracije glutaraldehida (slika 25A). Pri zelo nizki koncentraciji glutaraldehida je na gelu dobro vidna le monomerna oblika WT  $\alpha$ -sinukleina. S poviševanjem koncentracije povezovalca se na gelu začnejo pojavljati oligomerne zvrsti. Ker se ob 125× povišanju količine glutaraldehida od 0,16 do 20 % (v/v), elektroforetski profil proteinov ni spremenil, sklepamo na specifičnost povezovanja. Nadalje smo uporabljali 2,5 % raztopino glutaraldehida. Na sliki 25B je prikazano, da razredčevanje proteina pomakne ravnotežje med proteinskimi zvrstmi v prid monomerne oblike. Tvorba agregiranih zvrsti je torej odvisna od koncentracije  $\alpha$ -sinukleina.



Slika 24: NaDS-PAGE ne-povezanega (A) in povezanega  $\alpha$ -sinukleina (B). Koncentracija proteina je bila 70  $\mu$ M (~1 mg/ml) in koncentracija glutaraldehida 2,5 % (v/v).

Figure 24: SDS-PAGE of non-crosslinked (A) and the crosslinked protein (B). The protein and glutaraldehyde concentrations were 70  $\mu$ M (~1 mg/ml) and 2.5 % (v/v), respectively.



Slika 25: Optimizacija povezovanja proteinov z glutaraldehidom. Spreminjali smo (A) koncentracijo glutaraldehida (ob 70  $\mu$ M koncentraciji proteina in 30 min inkubacijskem času) ter (B) koncentracijo  $\alpha$ -sinukleina in inkubacijski čas (povezovanje z 2,5 % glutaraldehidom).

Figure 25: Optimization of protein crosslinking with glutaraldehyde. (A) Glutaraldehyde concentration was varied (at 70  $\mu$ M protein concentration and 30 min incubation time). (B) Protein concentration and incubation time were varied (at 2.5 % glutaraldehyde).

## 4.2.4 Ultracentrifugiranje

Pri pripravi raztopin  $\alpha$ -sinukleina za eksperimente se v večini primerov morebitnih agregiranih zvrsti proteina znebijo z ultracentrifugiranjem. Za odstranitev višjih molekularnih agregatov smo po raztapljanju proteina uporabili ultrafiltracijske mikrocentrifugirke z izključitveno maso 100 kDa (Amicon Ultra, Millipore, Irska). Uporaba mikrocentrifugirk z MWCO 30 kDa se je izkazala za neprimerno, saj protein filtra skorajda ni prehajal. To lahko pripišemo razviti strukturi  $\alpha$ -sinukleina, ki tudi v monomerni obliki na gelski koloni potuje kot globularni protein z molekulsko maso nad 50 kDa (Weinreb in sod., 1996).

V nadaljevanju smo želeli preveriti ali bi se lahko oligomernih struktur, ki smo jih opazili na NaDS-PAGE gelu kemijsko povezanih proteinov, znebili z ultracentrifugiranjem. 1-urno centrifugiranje WT  $\alpha$ -sinukleina pri pospešku 200.000 g ni vplivalo na ravnotežje med monomernimi in oligomernimi zvrstmi (slika 26).



Slika 26: NaDS-PAGE  $\alpha$ -sinukleina po ultracentrifugiranju. Uporabili smo 82  $\mu$ M WT  $\alpha$ -sinuklein. Figure 26: SDS-PAGE of  $\alpha$ -synuclein after ultracentrifugation. The 82  $\mu$ M concentration of WT  $\alpha$ -synuclein was used.

### 4.2.5 ANS fluorescenca

Ker na agregacijsko težnjo  $\alpha$ -sinukleina lahko vpliva površinska hidrofobnost, smo določili stopnjo izpostavljenosti hidrofobnih regij v  $\alpha$ -sinukleinu. Fluorescentno barvilo ANS kaže povišano intenziteto fluorescence in moder pomik (k nižjim valovnim dolžinam) emisijskega maksimuma po interakciji z izpostavljenimi hidrofobnimi regijami proteinov (Hawe in sod., 2008). Kot je prikazano na sliki 27, niti WT niti mutanta ne vplivajo na ANS fluorescenco, kar kaže, da ni regij z močno agregacijsko težnjo.



Slika 27: Izpostavljenost hidrofobnih regij divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina in mutantov (Y39A in Y(125,133,136)A) merjena z ANS fluorescenco. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0.

Figure 27: Exposure of hydrophobic protein regions of wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein, as monitored by ANS fluorescence. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.

### 4.3 FIBRILACIJA α-SINUKLEINA

Za določitev vpliva Tyr na fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina, smo kot funkcijo časa spremljali fibrilacijo proteina WT ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A. Proteine s koncentracijo 70  $\mu$ M (~1 mg/ml) smo nekaj dni ob močnem mešanju inkubirali v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH 7,0, pri 37 °C. Iz inkubiranih proteinskih raztopin smo v določenih časovnih intervalih jemali vzorčke in jih analizirali z dodanimi fluorescentnimi barvili (ThT in ANS), NaDS-PAGE in AFM.

## 4.3.1 ThT fluorescenca

Fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina WT in obeh Tyr mutantov smo spremljali s fluorescenčnim barvilom tioflavinom T (ThT), ki se mu po interakciji z amiloidnimi  $\beta$ -strukturami karakteristično spremeni emisijski spekter (Baicalana in Koide, 2010). Na sliki 28 lahko vidimo, da zamenjava N-terminalnega Tyr ali pa vseh treh C-terminalnih Tyr z Ala vodi v močno inhibicijo fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina. V časovnem obdobju potrebnem za zaključek fibrilacije WT proteina (3 dni), se ThT fluorescenca mutant ni povišala, kar kaže, da ni fibrilarne agregacije. Da bi preverili ali odsotnost Tyr v  $\alpha$ -sinukleinu zavira predvsem tvorbo

nukleacijskega jedra, smo podaljšali čas inkubacije mutiranih proteinov na 8 dni. Medtem ko časovni potek fibrilacije WT  $\alpha$ -sinukleina kaže tipično sigmoidni profil z lag fazo krajšo od 20 ur, pa je pri obeh mutantih prišlo do povišanja ThT-fluorescence šele po ~100 h inkubacije (slika 28). ThT fluorescenca obeh mutant je bila zelo majhna celo ob koncu inkubacijske dobe (dan 8), kar kaže na odsotnost večjih količin fibrilarnih struktur.



Slika 28: Fibrilacijski profili divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A merjeni s ThT fluorescenco. Proteine smo inkubirali v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH 7,0, pri 37 °C. Figure 28: The fibrillation profiles of wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein as monitored by ThT fluorescence. Proteins were incubated in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH 7.0, at 37 °C.

### 4.3.2 NaDS-PAGE elektroforeza

Ker fibrilacija poteka preko inkorporacije topnih proteinskih zvrsti v rastočo fibrilo, smo z NaDS-PAGE spremljali relativno količino topnega  $\alpha$ -sinukleina. Pred tem smo inkubirane proteinske vzorce centrifugirali, da smo se znebili netopnih agregatov. Po 3-dnevni inkubaciji je NaDS-PAGE supernatanta  $\alpha$ -sinukleina WT pokazal na zmanjšanje koncentracije topnega proteina (slika 29A, primerjaj z dnevom 0, slika 24), kar potrjuje vgradnjo  $\alpha$ -sinukleina v netopne agregate. Nasprotno pa po 3-dnevni inkubaciji ni prišlo do zmanjšanja količine topnega proteina v supernatantu vzorcev Tyr mutant (slika 29A). To potrjuje odsotnost makromolekularnih netopnih agregatov Y39A in Y(125,133,136)A po 3-dnevni inkubaciji in sovpada z rezultati ThT-fluorescence (glej 4.3.1). Po 8-dnevni inkubaciji je pri obeh mutantih prišlo do znižanja količine topnega proteina (slika 29B), kar kaže na tvorbo netopnih agregatov. Opaženo manjšo degradacijo  $\alpha$ -sinukleinskih mutant (slika 29B) lahko pripišemo pogojem podaljšane inkubacije (8 dni pri temperaturi 37 °C).



Slika 29: NaDS-PAGE kemično ne-povezanega in povezanega divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A v supernatantu po 3 dnevni (A) in 8 dnevni inkubaciji (B). Figure 29: SDS-PAGE of non-crosslinked and crosslinked wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein in supernatant samples after 3 days (A) and 8 days (B) of incubation.

### 4.3.3 ANS fluorescenca

Delno zviti intermediati in tranzientni oligomeri a-sinukleina, ki so na glavni poti do *fibrilacije* (ang. *on-pathway*), imajo na svoji površini izpostavljene hidrofobne predele (Uversky in sod., 2001; Dusa in sod., 2006). Te regije lahko zasledimo s fluorescenco ANS. V skladu s prejšnjimi rezultati za amiloidne proteine (Uversky in sod., 2001; Bolognesi in sod., 2010) je intenziteta fluorescence ANS v prisotnosti α-sinukleina WT (slika 30) naraščala skladno z naraščanjem ThT-fluorescence (slika 28) in dosegla maksimum, ko je proces fibrilacije vstopil v stacionarno fazo (dan 2). Nasprotno pa Y39A in Y(125,133,136)A mutanta nista reagirala z ANS vse do četrtega dneva inkubacije (slika 30, preglednica 5), kar sovpada z odsotnostjo ThT-fluorescence v tem časovnem obdobju (slika 28). Po 4-dnevni inkubaciji (~100 h) začneta Y39A mutant, nekoliko manj pa tudi trojni Tyr mutant, kazati spremembe v emisijskem profilu ANS (slika 30), kar korelira s simultano majhno spremembo ThT-fluorescence (slika 28). V naslednjih dveh dneh inkubacije (dnevi 4 - 6), je intenziteta fluorescence ANS + mutantov progresivno naraščala in prekoračila maksimalno intenziteto ANS +  $\alpha$ -sinukleina WT (slika 30, preglednica 5). To kaže na izpostavljenost več ANS-veznih področij pri Y39A in Y(125,133,136)A v primerjavi s proteinom WT. Poleg tega se je pri obeh mutantih tudi maksimum intenzitete fluorescence ANS premaknil k nižjim valovnim dolžinam in sicer od 525 nm (dnevi 0 - 4) k 488 nm (dan 6), medtem ko je bil premik pri WT proteinu od 525 nm (dan 0) k 500 nm (dneva 2 in 3) (preglednica 5). To kaže na prisotnost bolj hidrofobnega okolja mutantov (Campioni in sod., 2010).



Slika 30: ANS-spektri inkubiranih proteinov (divji tip (WT) ter mutanta Y39A in Y(125,133,136)) posneti v različnih časovnih obdobjih. ANS-spektri mutantov se prve 3 dni inkubacije praktično niso spreminjali in na sliki niso prikazani. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0.

Figure 30: ANS fluorescence emission spectra for the incubated protein (wild-type (WT) and mutants (Y39A, Y(125,133,136)A) mixtures monitored over time. The ANS emission spectra of the mutant proteins over the first 3 days of incubation showed almost superimposable profiles and were therefore omitted for clarity. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.

	WT		Y39A		Y(125,133,136)A	
Dnevi	$\lambda_{max} (nm)$	I (a.e.)	$\lambda_{max} (nm)$	I (a.e.)	$\lambda_{max} (nm)$	I (a.e.)
0	525	111	525	111	525	108
1	515	133	526	109	525	109
2	501	176	525	111	525	108
3	500	193	525	110	525	110
4	/	/	500	166	508	116
5	/	/	491	206	498	170
6	/	/	488	291	488	282

Preglednica 5: Fluorescenčni ANS-profili inkubiranih proteinov. Table 5: The ANS binding profiles of the incubated proteins.

## 4.3.4 Morfologija agregatov

Da bi primerjali morfologijo agregatov Y39A in Y(125,133,136)A s strukturami, ki jih tvori  $\alpha$ -sinuklein WT, smo proteinske vzorce poslikali z AFM. Po 3-dnevni inkubaciji  $\alpha$ -sinuklein WT tvori značilne fibrile (slika 31), kar potrjuje visoko ThT-fluorescenco v tem časovnem obdobju (slika 28). Istočasno so pri obeh mutiranih proteinih prisotni raznoliki agregati. Pri Y39A mutanti so to majhne paličaste strukture z višinami 1,7 ± 0,3 nm in pri Y(125,133,136)A večji, okrogli do ovalni oligomeri. Tu smo razločili dve populaciji oligomernih zvrsti: eno v območju premerov od 50 - 70 nm in z višinami 17,7 ± 2,3 nm ter drugo s premerom 35 - 45 nm in z višinami 10,2 ± 1,2 nm (slika 31). Ker pri mutantah po 3-dnevni inkubaciji ni prišlo do zmanjšanja količine topnega proteina (slika 29; primerjaj z

dnevom 0, slika 24) in nismo detektirali sprememb v ANS fluorescenci (preglednica 5), sklepamo, da te oligomerne zvrsti predstavljajo manjši del celokupnega proteina (tukaj smo posneli neredčene vzorce). Po 8-dnevni inkubaciji pa so pri obeh mutantah prisotne fibrilam-podobne strukture (slika 31). Te fibrile so morfološko podobne fibrilam  $\alpha$ -sinukleina WT, z višinami v območju 6 - 9 nm, kar je v skladu s prejšnjimi objavami za WT  $\alpha$ -sinuklein (Khurana in sod., 2003).



Slika 31: AFM slike agregiranih proteinov po 3-dnevni (A) in 8-dnevni inkubaciji (B). Črta predstavlja 300 nm. Figure 31: AFM images of the aggregated proteins after 3 days (A) and 8 days (B) of incubation. Scale bar,

300 nm.

# 4.4 INTERAKCIJA α-SINUKLEINA Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI

Interakcijo  $\alpha$ -sinukleina z vezikli iz fosfolipidov z nevtralno glavo (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DPPC) in 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (POPC)), anionsko glavo (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DPPG) in 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POPG)) (slika 15) in mešanico lipidov DPPC:DPPG v molskem razmerju 1:1 in 1:2 smo preučili s CD spektroskopijo, fluorescenčno anizotropijo dveh membransko vezanih prob, diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in z metodo sproščanja kalceina. Preučili smo, kako različni fizikalno-kemijski parametri (sestava in faza lipidnih veziklov) vplivajo na interakcijo med  $\alpha$ -sinukleinom in lipidi, oziroma kako vezava  $\alpha$ -sinukleina vpliva na lastnosti (urejenost) lipidnega dvosloja. S CD spektroskopijo in metodo sproščanja kalceina smo preverili tudi specifičnost interakcije med  $\alpha$ -sinukleinom in gangliozidoma GM1 ter GM3 (slika 10).

Z uporabo Y39A in Y(125,133,136)A mutant, ki smo jih uporabili v nekaterih eksperimentih, smo želeli preučiti tudi vpliv Tyr ostankov na interakcijo  $\alpha$ -sinukleinmembrana.

## 4.4.1 SUV kot modelni membranski sistem

V naši študiji interakcije med  $\alpha$ -sinukleinom in membrano smo kot modelni sistem uporabili majhne unilamelarne vezikle (SUV), ki jih pridobimo s soniciranjem. Za to smo se odločili, ker naj bi bila afiniteta  $\alpha$ -sinukleina do teh veziklov večja (Davidson in sod., 1998) in ker služijo kot dober model za ~40 nm sinaptične vezikle (Takamori in sod., 2006). Poleg tega tudi uporaba spektroskopskih tehnik (CD spektroskopija in fluorimetrija) zaradi sipanja svetlobe omejuje uporabo liposomov z večjo velikostjo. Čeprav takšen preprost membranski model odstopa od kompleksnosti bioloških membran, pa omogoča natančno kontrolo določenih parametrov s katerimi lahko posnemamo celične membrane. Uporabili smo SUV iz DPPC, DPPG, POPC, POPG in mešanice DPPC:DPPG 1:1 (mol/mol). Palmitoil/oleoil maščobne kisline smo izbrali za posnemanje asimetrije acilnih verig in mononenasičenosti fizioloških lipidov, nevtralni PC pa je najpogostejši fosfolipid v večini evkariontskih membran (van Meer in sod., 2008). Čeprav je bila vsebnost anionskih lipidov višja (50 ali 100 %) kot pri sinaptičnih veziklih (~30 %) (Takamori in sod., 2006), in so specifični lipidi kot je PG, z izjemo mitohondrijske membrane, le malo zastopani v celični (in sinaptični) membrani (van Meer in sod., 2008; Takamori in sod., 2006), pa izbira takšne sestave omogoča lažjo primerjavo s prejšnjimi študijami, kjer so uporabili vezikle z visoko vsebnostjo anionskih lipidov.

## 4.4.1.1 Temperaturno območje faznega prehoda SUV

Za lipidni dvosloj, sestavljen iz ene vrste lipida, je značilen fazni prehod med stanjem nizke (faza gela) in visoke mobilnosti lipidov (tekoča neurejena faza). Lipidna repa POPG in POPC sta asimetrična v dolžini in vsebujeta eno nenasičeno verigo; nasprotno pa sta repa DPPG in DPPC simetrična in nasičena. Medtem ko POPG in POPC pri sobni temperaturi tvorita tekočo neurejeno fazo ( $T_m$  teh veziklov je pod 0 °C (Avanti Polar Lipids, ZDA)), DPPG in DPPC pri sobni temperaturi tvorita fazo gela (Jacobson in Papahadjopoulos, 1975). MLV vezikli sestavljeni iz DPPC, DPPG in mešanice DPPC:DPPG imajo glavni fazni

prehod pri 41 - 42 °C (glej 4.4.5). V nasprotju z MLV so fazni prehodi SUV nekooperativni (Nuscher in sod., 2004). Do tega pride zaradi zelo ukrivljene membrane majhnih SUV, ki povzroči nepravilnosti v pakiranju lipidov. Tako smo z DSC najprej preverili, v katerem temperaturnem območju imajo SUV pripravljeni iz nasičenih lipidov fazni prehod. Slika 32 prikazuje, da imajo SUV pripravljeni iz treh različnih lipidov oziroma lipidne mešanice, širok nekooperativni fazni prehod v območju od približno 33 °C do 45 °C. Tako smo za nadaljnje raziskave izbrali temperaturo meritev T = 25 °C (faza gela), T = 40 °C (T<sub>m</sub>) in T = 50 °C (tekoča neurejena faza). Tudi meritve fluorescenčne anizotropije oziroma ureditvenega parametra lipidov so potrdile obstoj treh različnih faz pri teh treh različnih temperaturah (glej 4.4.3).

Temperaturo v kiveti pri merjenju eliptičnosti v CD spektropolarimetru ter pri merjenju anizotropizma in sproščanja kalceina v fluorimetru smo dodatno preverili z uporabo termistorja (YSI 44004 Precision Thermistor, YSI Inc., ZDA).



Slika 32: DSC termogrami SUV pripravljenih iz DPPC, DPPG in DPPC:DPPG 1:1 v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0. Puščice označujejo izbrane temperature za nadaljne eksperimente. Figure 32: DSC thermograms of SUVs composed of DPPC, DPPG and DPPC:DPPG 1:1 in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0. Arrows indicate the selected temperatures for subsequent experiments.

### 4.4.2 Sekundarna struktura α-sinukleina po vezavi na lipidne vezikle

Znano je, da ob vezavi  $\alpha$ -sinukleina na določene lipidne vezikle pride do spremembe v sekundarni strukturi proteina iz neurejene v  $\alpha$ -vijačno strukturo (Davidson in sod., 1998). Vezavo  $\alpha$ -sinukleina WT ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A na SUV različne sestave smo tako spremljali preko strukturnih sprememb proteinov s CD spektroskopijo. Minimum povprečne molarne eliptičnosti AK ostanka [ $\theta$ ] pri 220 nm je značilen za proteine z  $\alpha$ -vijačno sekundarno strukturo (Chen in sod., 1972). Nižja ko je [ $\theta$ ]<sub>220</sub>, višji delež predstavlja  $\alpha$ vijačnica. Ker čisti lipidi ne kažejo CD signala v daljnem UV območju, CD spektri odražajo strukturne/konformacijske značilnosti proteinov (Poklar in sod., 1999). Na slikah 33 - 38 so prikazani CD spektri proteinov v daljnem UV-območju v prisotnosti SUV pri pH = 7,0. Posneli smo spektre v temperaturnem območju 25 - 70 °C pri molarnem razmerju lipidi/protein (R) je 10.

Vezikli (SUV) pripravljeni iz DPPC (slika 33) in POPC (slika 34) na sekundarno strukturo proteinov nimajo znatnega vpliva pri nobeni od preiskovanih temperatur. Spektri proteinov

v prisotnosti teh nevtralnih SUV se namreč ne razlikujejo bistveno od spektrov samih proteinov brez veziklov (slika 21), kar potrjuje odsotnost interakcije proteina s temi vezikli. Nasprotno pa imajo negativno nabiti vezikli DPPG (slika 35) in POPG (slika 36) velik vpliv na CD spektre proteinov. Pri POPG veziklih je pri vseh izmerjenih temperaturah (25 °C, 45 °C in 70 °C) značilen CD spekter za  $\alpha$ -vijačno strukturo z nizko  $[\theta]_{220}$ , temperatura pa na spektre nima večjega vpliva. Nasprotno pa ima temperatura velik vpliv na sekundarno strukturo DPPG veziklov, kjer začne  $[\theta]_{220}$  padati nad temperaturo 40 °C in doseže minimum v temperaturnem območju 50 - 60 °C, nato pa spet naraste. Ti rezultati kažejo, da tvorbo maksimalne  $\alpha$ -vijačne strukture inducirajo negativno nabiti fosfolipidi, ki se nahajajo v tekoči neurejeni fazi. Ker smo želeli preveriti pomembnost anionskih lipidov za indukcijo α-vijačnice, smo pripravili ekvimolarno mešanico lipidov DPPC:DPPG. Pričakovali smo, da bodo ti vezikli povzročili znižanje  $[\theta]_{220}$ , ki bi približno ustrezalo sredinskim vrednostim za čiste DPPC in DPPG. Vendar pa je nasprotno pri temperaturi nad 40 °C prišlo le do neznatnega znižanja  $[\theta]_{220}$  (slika 37). Tudi povišanje deleža DPPG v lipidni mešanici (DPPC:DPPG 1:2) ne inducira znatnega znižanja vrednosti  $[\theta]_{220}$  (slika 38). Na sliki 39 so prikazani spektri WT proteina brez in v prisotnosti različnih veziklov pri temperaturi 55 °C, ki v povprečju inducira največje znižanje  $[\theta]_{220}$  (POPC in POPG pri T = 45 °C).

Za lažjo primerjavo so vrednosti  $[\theta]_{220}$  pri različnih temperaturah dodatno predstavljene na slikah 40 in 41. Vpliv temperature na sekundarno strukturo proteinov brez veziklov ter v prisotnosti DPPC in POPC veziklov je majhen.  $[\theta]_{220}$  v primeru proteina brez veziklov, DPPC in POPC pri vseh treh proteinih z naraščanjem temperature rahlo pada. V prisotnosti DPPG in POPG veziklov je  $[\theta]_{220}$  pri vseh temperaturah nižja kot brez veziklov ali v prisotnosti nevtralnih veziklov. V primeru DPPG  $[\theta]_{220}$  v območju od 40 - 50 °C strmo pade in doseže najnižje vrednosti v primeru proteina WT, sledi Y(125,133,136)A in nato Y39A. Tudi vrednosti pri POPG veziklih so najnižje pri proteinu WT in so ekvivalentne vrednostim DPPG veziklov v območju 50 - 60 °C, pri obeh mutantih pa je trend ravno obraten kot pri DPPG veziklih.

Pri DPPC:DPPG 1:1 se  $[\theta]_{220}$  v primerjavi z DPPC vezikli le malo zniža in kaže podoben trend pri vseh treh proteinih. DPPC:DPPG 1:2 vezikli v gel stanju (oziroma do ~40 °C) inducirajo znižanje  $[\theta]_{220}$ , ki približno ustreza  $\frac{2}{3}$  vrednosti  $[\theta]_{220}$  med DPPC in DPPG. Presenetljivo pa je, da prisotnost lipidov v tekoči neurejeni fazi le malo zmanjša  $[\theta]_{220}$  oz. malo poveča delež vijačne strukture.



Slika 33: CD spektri divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPC. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0. Figure 33: CD spectra of wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein at different temperatures in presence of DPPC vesicles. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 34: CD spektri divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz POPC. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0. Figure 34: CD spectra of wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein at different temperatures in presence of POPC vesicles. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 35: CD spektri divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPG. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0. Figure 35: CD spectra of wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein at different temperatures in presence of DPPG vesicles. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 36: CD spektri divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz POPG. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0. Figure 36: CD spectra of wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein at different temperatures in presence of POPG vesicles. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 37: CD spektri divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina ter mutantov Y39A in Y(125,133,136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPC:DPPG 1:1. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0.

Figure 37: CD spectra of wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133,136)A)  $\alpha$ -synuclein at different temperatures in presence of DPPC:DPPG 1:1 vesicles. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 38: CD spektri divjega tipa α-sinukleina pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPC:DPPG 1:2. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0. Figure 38: CD spectra of wild-type α-synuclein at different temperatures in presence of DPPC:DPPG 1:2

Figure 38: CD spectra of wild-type  $\alpha$ -synuclein at different temperatures in presence of DPPC:DPPG 1:2 vesicles. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 39: CD spektri divjega tipa  $\alpha$ -sinukleina brez veziklov in v prisotnosti veziklov (SUV) različne sestave pri T = 55 °C. Spektra POPC in POPG veziklov sta posneta pri 45 °C. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0.

Figure 39: CD spectra of wild-type  $\alpha$ -synuclein withouth vesicles and in the presence of vesicles (SUV) of different composition at T = 55 °C. Spectra of POPC and POPG vesicles were recorded at 45 °C. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 40: Povprečna molarna eliptičnost aminokislinskega ostanka proteinov pri 220 nm ( $[\theta]_{220}$ ) pri različnih temperaturah (T) brez veziklov in v prisotnosti veziklov (SUV) različne sestave, kot je označeno na sliki. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0.

Figure 40: Average mean residue ellipticity of proteins at 220 nm ( $[\theta]_{220}$ ) at different temperatures (T) in the absence and presence of vesicles (SUV) of different composition, as indicated. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 41: Povprečna molarna eliptičnost aminokislinskega ostanka proteinov pri 220 nm ( $[\theta]_{220}$ ) pri različnih temperaturah (T) brez veziklov in v prisotnosti veziklov (SUV) iz DPPG, DPPC:DPPG 1:1 in POPG. Spektre smo posneli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,0.

Figure 41: Average mean residue ellipticity of proteins at 220 nm ( $[\theta]_{220}$ ) at different temperatures (T) in the absence and presence of vesicles (SUV) composed of DPPG, DPPC:DPPG 1:1 and POPG. Spectra were recorded in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.0.



Slika 42: Delež (v odstotkih)  $\alpha$ -vijačnice divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina in mutantov Y39A in Y(125,133, 136)A pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov (SUV) različne sestave, kot je označeno na sliki. Izračuni so bili opravljeni s programom Contin.

Figure 42: The percentage of the helical structure of the wild-type (WT) and mutant (Y39A and Y(125,133, 136)A  $\alpha$ -synuclein at different temperatures in the presence of SUV of different composition. The calculations were performed with Contin program.

Za izračun deleža α-vijačnice v sekundarni strukturi proteinov smo uporabili program Contin (Provencher in Gloeckner, 1981), rezultati so prikazani na sliki 42. Delež α-vijačnice pri nobenemu od proteinov nikoli ne preseže 30 %. Pri vseh proteinih je največ α-vijačnice v prisotnosti DPPG in POPG veziklov, medtem ko je delež α-vijačnice v prisotnosti DPPC in POPC primerljiv s tistim pri proteinih brez prisotnosti veziklov (slika 22) in ne preseže 10 %. Spreminjanje deleža  $\alpha$ -vijačnice s temperaturo je pri vseh treh proteinih v prisotnosti DPPG veziklov podobno; od 25 °C do približno 35 - 40 °C delež vijačne strukture rahlo upada, nato pa strmo naraste do maksimalne vrednosti pri okoli 50 °C, nakar z zvišanjem temperature ponovno upade. Ti rezultati so skladni z ugotovitvijo, da se  $\alpha$ -vijačnica tvori v prisotnosti negativno nabitih lipidov v tekoči neurejeni fazi. Pri nižjih temperaturah je pri DPPG veziklih delež  $\alpha$ -vijačnice nekoliko višji pri mutantah kot pri WT proteinu. Pri WT proteinu je vsebnost vijačnice pri POPG veziklih bolj temperaturno odvisna kot v primeru mutant.

# 4.4.3 Vpliv α-sinukleina na ureditev lipidnega dvosloja

Z uporabo fluorescenčne anizotropije dveh membransko vezanih prob smo ovrednotili urejenost oz. fluidnost lipidnega dvosloja. Anizotropija je odvisna od stopnje nasičenosti in faznega stanja fosfolipidov ter narašča z urejenostjo lipidov v lipidnem dvosloju. Da bi ugotovili, kakšen vpliv ima protein na urejenost lipidnega dvosloja, smo v suspenzijo SUV titrirali protein in merili fluorescenčno anizotropijo fluoroforjev DPH in TMA-DPH (vrednosti so podane v prilogah A - F). Iz fluorescenčne anizotropije smo izračunali (enačba 3) ureditveni parameter lipidov (S). Fluorofor DPH smo uporabili za spremljanje sprememb anizotropije v notranjosti lipidnega dvosloja, njegov kationski derivat TMA-DPH pa za spremljanje sprememb anizotropije v vodno-lipidni medfazi.

Na slikah 43 - 48 so prikazane odvisnosti ureditvenega parametra (S) veziklov (SUV) različne sestave od molarnega razmerja lipidi/protein (R) pri različnih temperaturah (25 °C, 40 °C in 50 °C). Za kontrolo smo vezikle namesto z založno raztopino proteina titrirali z ekvivalentnim volumnom 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufra pH 7,0. Titracija s pufrom v nobenem primeru ni vplivala na fluorescenčno anizotropijo DPH in TMA-DPH oziroma se kontrolne vrednosti niso razlikovale od začetne vrednosti S brez dodanega proteina ali pufra (stolpci s črtkanim polnilom).

Vrednosti fluorescenčne anizotropije in posledično ureditvenega parametra (S) so najvišje v gel stanju, srednje v tekočem urejenem stanju in najnižje v tekočem neurejenem stanju (Xu in London, 2000). Tudi v našem primeru so vrednosti S pri veziklih, ki vsebujejo nasičene lipide DPPC, DPPG in mešanico DPPC:DPPG, tako v notranjem delu dvosloja (detekcija z DPH) kot v zunanjem delu (detekcija s TMA-DPH) najvišje v fazi gela (pri 25 °C), srednje pri T faznega prehoda lipidov (pri 40 °C) in najnižje v tekoči neurejeni fazi (pri 50 °C) (slike 43, 45, 47). Pri 25 °C in 50 °C so vrednosti S nasičenih lipidov identične, pri 40 °C je vrednost S DPPG nekoliko nižja od DPPC in DPPC:DPPG. Vrednosti S nasičenih lipidov pri 50 °C (slike 43, 45, 47) so primerljive z vrednostimi S nenasičenih lipidov. Vrednosti anizotropije fluorescentnih prob smo v primeru nenasičenih lipidov POPC in POPG pomerili pri 25 °C. Mobilnost nenasičenih acilnih verig pri 25 °C je nekoliko nižja kot v primeru nasičenih acilnih verig pri 50 °C, kljub temu da se oboji nahajajo v tekoči neurejeni fazi.

Vpliv α-sinukleina WT na ureditveni parameter lipidov v DPPC liposomih je prikazan na sliki 43. Pri nobeni temperaturi nismo niti v zgornjem delu membrane niti v regiji acilnih verig zaznali učinka proteina na spremembo S. Prav tako ni prišlo do sprememb v

ureditvenem parametru lipidov ob titraciji POPC veziklov z  $\alpha$ -sinukleinom WT (slika 44). Na osnovi teh rezultatov lahko sklepamo, da  $\alpha$ -sinuklein ne vpliva na ureditev acilnih verig v lipidnem dvosloju nevtralnih lipidov ne glede na to, v katerem faznem stanju se nahajajo.

V primeru DPPG veziklov (slika 45) α-sinuklein WT ni povzročil sprememb v ureditvenem parametru membrane pri 25 °C, ko se lipidi nahajajo v fazi gela. Do sprememb pa pride pri in nad temperaturo faznega prehoda lipidov (40 °C in 50 °C). V obeh primerih smo po dodatku proteina opazili povečanje vrednosti S na vodno-lipidni meji (določeno s TMA-DPH) in v notranjem delu membrane (določeno z DPH). Zvišanje vrednosti S pomeni večjo urejenost v okolici fluorescentnih sond oziroma zmanjšanje fluidnosti membrane. Vpliv  $\alpha$ sinukleina na urejenost lipidnega dvosloja je pri obeh temperaturah različen. Pri 40 °C se ureditveni parameter v regiji acilnih verig in v regiji lipidnih glav namreč poveča že pri nizki koncentraciji proteina (R = 500), ostane nespremenjen pri R = 100 in nato rahlo upade pri R = 10. Dobljeni rezultati kažejo, da ima protein sposobnost ureditve lipidnega dvosloja, ko se ta nahaja v stanju faznega prehoda. Nad temperaturo faznega prehoda lipidov, ko je membrana v tekočem neurejenem stanju, je prišlo do povečanja S lipidov pri višjih koncentracijah proteina, in sicer pri R = 100 v notranjosti membrane in pri R = 10 v regiji lipidnih glav. Ti rezultati so primerljivi z učinkom  $\alpha$ -sinukleina na ureditveni parameter POPG lipidov v SUV (slika 46), kjer pride do rahlega zvišanja ureditvenega parametra v notranjem delu membrane pri R = 100, rigidnost membrane pa se poviša pri R = 10. Spremembe fluorescenčne anizotropije TMA-DPH, s katerim zaznavamo spremembe na površini membrane (medfazni prostor), so bile v primeru POPG skoraj neznatne. Vrednost S v regiji acilnih verig pri R = 10 je okoli 0,5, kar je primerljivo z vrednostjo S pri DPPG pri 50 °C. Kljub temu, da pride pri DPPG veziklih v primerjavi s POPG v notranjem in zunanjem delu membrane do večje spremembe S, ki se v primeru DPH pri R = 10 poviša za ~118 % (pri POPG za ~42 %) in v primeru TMA-DPH za ~16 %, pa je potrebno upoštevati, da so vrednosti S pri POPG že v izhodišču nekoliko višje in so tako končne vrednosti S dokaj primerljive.

Sliki 47 in 48 prikazujeta vpliv WT  $\alpha$ -sinukleina in Y39A mutante na ureditveni parameter membrane iz ekvimolarne mešanice DPPC:DPPG. Pri 25 °C ne opazimo sprememb S v okolici sond DPH in TMA-DPH. Do največjega učinka na ureditev lipidov je prišlo pri temperaturi faznega prehoda (40 °C), kjer je dodatek proteina v suspenzijo veziklov vodil do postopnega povečanja ureditve acilnih verig lipidov in regije na vodno-lipidni meji. Rigidnost dvosloja se je najbolj povečala pri R = 10. Nad temperaturo faznega prehoda (50 °C) smo opazili spremembo fluorescenčne anizotropije le v notranjosti membrane pri visoki koncentraciji proteina (R = 10). Učinek mutanta Y39A na S se ni razlikoval od učinka proteina WT (slika 48).

Povzamemo lahko, da α-sinuklein WT ne povzroči sprememb v urejenosti lipidov, ko se ti nahajajo v fazi gela, četudi so negativno nabiti. Protein povzroči urejanje membrane samo v območju faznega prehoda veziklov (gel – tekoča faza) oz. samo, ko se vezikli nahajajo v vsaj delno tekoči neurejeni fazi (40 °C in 50 °C za nasičene lipide). Vpliv na urejenost lipidnega dvosloja je koncentracijsko odvisen.



Slika 43: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji DPPC veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C, 40 °C in 50 °C do doseženega R (molarno razmerje lipidi/protein) je 500, 100 in 10 (stolpci z enobarvnim polnilom). Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (stolpci s črtkanim polnilom; Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

Figure 43: The changes in lipid order parameter (S) after titration of DPPC vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R (lipid/protein molar ratio) 500, 100 and 10 (solid fill). For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (dashed line; Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).



Slika 44: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji POPC veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C, 40 °C in 50 °C do doseženega R (molarno razmerje lipidi/protein) je 500, 100 in 10 (stolpci z enobarvnim polnilom). Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (stolpci s črtkanim polnilom; Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

Figure 44: The changes in lipid order parameter (S) after titration of POPC vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R (lipid/protein molar ratio) 500, 100 and 10 (solid fill). For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (dashed line; Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).



Slika 45: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji DPPG veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C, 40 °C in 50 °C do doseženega R (molarno razmerje lipidi/protein) je 500, 100 in 10 (stolpci z enobarvnim polnilom). Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (stolpci s črtkanim polnilom; Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

Figure 45: The changes in lipid order parameter (S) after titration of DPPG vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R (lipid/protein molar ratio) 500, 100 and 10 (solid fill). For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7,0 (dashed line; Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).



Slika 46: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji POPG veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C, 40 °C in 50 °C do doseženega R (molarno razmerje lipidi/protein) je 500, 100 in 10 (stolpci z enobarvnim polnilom). Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (stolpci s črtkanim polnilom; Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

Figure 46: The changes in lipid order parameter (S) after titration of POPG vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R (lipid/protein molar ratio) 500, 100 and 10 (solid fill). For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (dashed line; Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).



Slika 47: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji DPPC:DPPG 1:1 veziklov z divjim tipom  $\alpha$ sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C, 40 °C in 50 °C do doseženega R (molarno razmerje lipidi/protein) je 500, 100 in 10 (stolpci z enobarvnim polnilom). Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (stolpci s črtkanim polnilom; Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

Figure 47: The changes in lipid order parameter (S) after titration of DPPC:DPPG 1:1 vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R (lipid/protein molar ratio) 500, 100 and 10 (solid fill). For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (dashed line; Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).



Slika 48: Spremembe ureditvenega parametra (S) po titraciji DPPC:DPPG 1:1 veziklov z  $\alpha$ -sinukleinom Y39A. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C, 40 °C in 50 °C do doseženega R (molarno razmerje lipidi/protein) je 500, 100 in 10 (stolpci z enobarvnim polnilom). Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (stolpci s črtkanim polnilom; Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

Figure 48: The changes in lipid order parameter (S) after titration of DPPC:DPPG 1:1 vesicles with Y39A  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R (lipid/protein molar ratio) 500, 100 and 10 (solid fill). For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (dashed line; Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).

#### 4.4.4 Permeabilizacija veziklov

Z uporabo metode sproščanja fluorescenčnega barvila kalceina iz SUV smo preverili permeabilizacijsko sposobnost WT  $\alpha$ -sinukleina in mutant. Liposome različne lipidne sestave smo inkubirali s proteini in spremljali sproščanje barvila, ki se odraža v povišanju fluorescenčne intenzitete. Merili smo fluorescenčno intenziteto po 20 min inkubaciji. Sproščanje kalceina iz SUV inducirano z  $\alpha$ -sinukleinom je relativno hitro (slika 49), v 20 min je proces zaključen. Hitrostni profil sproščanja barvila ima začetno hitro fazo in nato počasnejšo fazo. Sproščanje kalceina je tudi koncentracijsko odvisno in je največje pri molarnem razmerju lipidi/protein (R) je 10, ko je koncentracija proteina 13  $\mu$ M. Membrana POPG, ki je negativno nabita, je zelo permeabilna za kalcein po dodatku  $\alpha$ -sinukleina.



Slika 49: Kinetika sproščanja kalceina iz 130  $\mu$ M POPG SUV po dodatku divjega tipa  $\alpha$ -sinukleina (R = 10, 100, 500). Meritve smo izvedli pri T = 25 °C v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0. Puščica označuje dodatek proteina. Vsaka krivulja predstavlja tri ločene eksperimente (SD < 15 %). Figure 49: Kinetics of calcein efflux from 130  $\mu$ M POPG SUV as induced by WT  $\alpha$ -synuclein (R = 10, 100, 500). Measurments were performed at T = 25 °C in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0. Arrow indicates protein addition. Each curve is representative of three separate experiments (SD < 15 %).

Na sliki 50 so prikazane permeabilnosti veziklov za kalcein po 20 min inkubaciji s proteini pri različnih temperaturah. Rezultati kažejo, da po dodatku  $\alpha$ -sinukleina barvilo prepuščajo le vezikli sestavljeni iz negativno nabitih fosfolipidov PG (ali ekvimolarne mešanice DPPC:DPPG) pri temperaturi faznega prehoda ali v tekoči neurejeni fazi. Vezikli iz nevtralnih DPPC in POPC so bili odporni za protein WT in mutant Y39A in kalceina niso prepuščali pri nobeni od temperatur (25 °C, 40 °C in 50 °C), torej niti v gel fazi niti v tekoči neurejeni fazi. Prav tako ni prišlo do znatne permeabilizacije negativno nabitih veziklov DPPG ali mešanice DPPC:DPPG 1:1 pri temperaturi 25 °C, ko so lipidi v fazi gela. Pri temperaturi faznega prehoda nasičenih lipidov (T = 40 °C) in v tekoči neurejeni fazi (T = 50°C) po 20 min inkubaciji z α-sinukleinom pride tako pri DPPC:DPPG 1:1 kot pri DPPG veziklih do sproščanja kalceina, ki je v slednjem primeru intenzivnejše (~95 % v primerjavi z mešanico DPPC:DPPG, kjer je  $\sim$ 70 %). Permeabilnost veziklov je pri obeh temperaturah približno enaka za obe lipidni sestavi. Permeabilnost DPPG veziklov pri 40 °C in 50 °C tudi sovpada s permeabilnostjo POPG veziklov pri 45 °C. Permeabilnost POPG veziklov pri 25 °C je bila nekoliko nižja kot pri 45 °C. Permeabilnost veziklov za Y39A in Y(125,133,136)A (v primeru POPG veziklov pri 25 °C) se ni razlikovala od permeabilnosti, ki jo inducira WT

protein. Zaključimo lahko, da  $\alpha$ -sinuklein permeabilizira le negativno nabite lipide, ki se nahajajo v območju faznega prehoda ali v tekoči neurejeni fazi.



Slika 50: Sproščanje kalceina iz SUV različne sestave po 20 min inkubaciji z divjim tipom (WT)  $\alpha$ -sinukleina, mutantom Y39A ali Y(125,133,136)A. Meritve smo izvedli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0 pri različnih temperaturah in R = 10. Vrednosti so normalizirane in predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta.

Figure 50: Calcein efflux from SUV of different lipid compositions induced by wild-type (WT), Y39A or (125,133,136)A  $\alpha$ -synuclein after 20 min incubation. Measurements were performed in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 at different temperatures and R = 10. Values are normalized, error bars represent the standard error from at least two independent experiments.

## 4.4.5 Spremljanje faznih prehodov liposomov ob dodatku α-sinukleina

Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) merimo spremembe v entalpiji in temperaturi faznih prehodov lipidov iz gel v tekoče neurejeno stanje. Ostre fazne prehode v ozkem temperaturnem območju imajo samo lipidni sistemi z nasičenimi maščobnimi kislinami (Budai in sod., 2003). Ker v temperaturnem območju 0 - 100 °C v suspenziji veziklov sestavljenih iz nenasičenih lipidov z DSC metodo ne moremo določiti faznih prehodov, smo uporabili samo liposome pripravljene iz DPPC, DPPG in DPPC:DPPG 1:1. Kot že omenjeno (glej 4.4.1) imajo SUV nekooperativni fazni prehod v širokem temperaturnem območju, zato je težko realno ovrednotiti vpliv proteina na strukturo lipidov. Namesto SUV smo zato uporabili multilamelarne vezikle (MLV). Posneli smo termograme veziklov in veziklov v prisotnosti  $\alpha$ -sinukleina pri R = 10. Iz prve meritve smo določili temperaturo in spremembo entalpije faznega prehoda. Drugo meritev smo uporabili za oceno reverzibilnosti faznega prehoda iz gel v tekoče neurejeno stanje. DSC termogrami so prikazani na sliki 51, v preglednici 6 pa so podane termodinamske vrednosti faznih prehodov v prisotnosti  $\alpha$ -sinukleina.

Fazni prehodi samih veziklov brez proteina so ozki, temperatura glavnega prehoda je v območju 41 - 42 °C. Predprehod je opažen samo pri DPPC in DPPC:DPPG 1:1 veziklih, medtem ko pri DPPG veziklih izgine. Kooperativnost prehoda rahlo pada v vrstnem redu

DPPC, DPPC:DPPG in DPPG. Sprememba entalpije prehoda je za DPPC  $\approx$  DPPC:DPPG 1:1, vrednosti za DPPG pa so nekoliko nižje.

Dodatek  $\alpha$ -sinukleina k DPPC lipidom pri R = 10 ni bistveno vplival na fazni prehod lipidov, saj tako temperatura kot entalpija faznega prehoda ostaneta nespremenjeni, prav tako predprehod.



Slika 51: DSC termogrami multilamelarnih veziklov brez in v prisotnosti  $\alpha$ -sinukleina, posneti v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0. Posneli smo termograme od 10 do 70 °C pri R = 10. Figure 51: DSC thermograms of the multillamelar lipid vesicles in the absence and presence of  $\alpha$ -synuclein in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0. The thermograms from 10 to 70 °C were recorded at R = 10.

Preglednica 6: Termodinamski profili faznih prehodov multilamelarnih veziklov v prisotnosti in brez  $\alpha$ -sinukleina. T<sub>m</sub>, temperatura prehoda iz gel v tekoče neurejeno stanje;  $\Delta H_{cal}$ , entalpija prehoda iz gel v tekoče neurejeno stanje.

Table 6: Thermodynamic profiles of the phase transitions of the multillamelar lipid vesicles in the presence and absence of  $\alpha$ -synuclein. T<sub>m</sub>, temperature of the gel-to-liquid crystalline phase transition;  $\Delta H_{cal}$ , enthalpy of the gel-to-liquid crystalline phase transition.

Vzorec	T <sub>m</sub> (°C)	$\Delta H_{cal} (kJ/mol)$
DPPC	41,8±0,5	$29,7 \pm 3,0$
DPPC + WT	41,8 ± 0,5	$30,3 \pm 3,0$
DPPC:DPPG 1:1	41,9 ± 0,5	31,2 ± 3,0
DPPC:DPPG 1:1 + WT	$44,6 \pm 0,5$	32,8 ± 3,0
DPPC:DPPG 1:1 + Y39A	$44,5 \pm 0,5$	31,9 ± 3,0
DPPG	41,0 ± 0,5	24,6 ± 3,0
DPPG + WT	$42,4 \pm 0,5$	21,0 ± 3,0

Do sprememb v termodinamskih parametrih prehoda pride, ko so v veziklih prisotni anionski fosfolipidi. Tako pri DPPG:DPPC 1:1 kot pri DPPG veziklih je  $\alpha$ -sinuklein WT povzročil termično stabilizacijo lipidov ter zmanjšal kooperativnost prehoda (prehod obsega širše

temperaturno območje). Pri DPPC:DPPG 1:1 veziklih predprehod izgine,  $T_m$  se zviša za ~3 °C, medtem ko je vpliv na entalpijo glavnega faznega majhen. Opazimo pojav novih vrhov, od tega najmanjši vrh ustreza  $T_m$  samih lipidov brez proteina. Učinek mutanta Y39A na fazni prehod DPPC:DPPG 1:1 veziklov se ni razlikoval od učinka proteina WT. Pri DPPG veziklih pa nasprotno od DPPC:DPPG 1:1 pride do znižanja entalpije faznega prehoda, prehod postane manj kooperativen,  $T_m$  se zviša za ~1,5 °C. Drugi DSC termogram WT  $\alpha$ -sinukleina se je razlikoval od prvega, ki je prikazan na sliki 51, kar kaže na to, da proces ni popolnoma reverzibilen pri segrevanju do temperature 70 °C. Termična stabilizacija (zvišanje  $T_m$ ) veziklov pomeni, da protein stabilizira gel stanje.

# 4.4.6 Interakcija α-sinukleina z gangliozidi

Poročali so, da pride ob interakciji  $\alpha$ -sinukleina s SUV, ki vsebujejo določene gangliozide, do tvorbe  $\alpha$ -vijačne strukture (Martinez in sod., 2007). Da bi določili ali  $\alpha$ -sinuklein specifično interagira z gangliozidoma GM1 in GM3 in preverili vlogo Tyr39 pri takšni morebitni vezavi (Di Pasquale in sod., 2010; Fantini in Yahi, 2011), smo s CD spektroskopijo opazovali spremembe v [ $\theta$ ]<sub>220</sub>  $\alpha$ -sinukleina WT in mutanta Y39A v prisotnosti SUV sestavljenih iz 2:1 (mol:mol) mešanice DPPC ali DPPG z izbranim gangliozidom. Meritve smo izvedli pri temperaturi 25 °C in 50 °C. Poskuse smo izvedli pri R = 10.

Slika 52 prikazuje vpliv inkubacije WT in Y39A proteina z vezikli iz mešanice nevtralnega DPPC z GM1 ali GM3, na tvorbo  $\alpha$ -vijačne strukture. Kot že prikazano (slika 33), je CD spekter  $\alpha$ -sinukleina WT in Y39A v prisotnosti DPPC veziklov tako pri 25 °C kot 50 °C tipičen za neurejeno strukturo, kar potrjuje odsotnost interakcije proteinov s temi lipidi. Inkubacija proteina z DPPC:GM3 2:1 vezikli pri 25 °C ni inducirala znatne spremembe v vrednosti eliptičnosti pri 220 nm, medtem ko je bila eliptičnost pri isti temperaturi nekoliko nižja v primeru DPPC:GM1 2:1 veziklov. V primeru DPPC:GM1 veziklov je inkubacija vzorcev pri 50 °C, ko je membrana v tekoči neurejeni fazi, vodila do majhnega povečanje količine  $\alpha$ -vijačne strukture, medtem ko vpliv povišane temperature na DPPC:GM3 ni signifikanten. Znižanje eliptičnosti pri mutanti Y39A je bilo v vseh primerih primerljivo s tistim pri proteinu WT.

Anionski DPPG vezikli so inducirali tvorbo  $\alpha$ -vijačnice tako pri proteinu WT kot Y39A, pri čemer je bil delež vijačnice signifikantno višji pri 50 °C, ko so lipidi v tekoči neurejeni fazi (slika 35). Kot pričakovano, pride v primeru DPPG:gangliozid do večjega porasta  $\alpha$ -vijačne strukture kot v primeru mešanice gangliozidov z nevtralnimi DPPC (slika 53). Trend znižanja vrednosti [ $\theta$ ]<sub>220</sub> je podoben kot pri DPPC:gangliozid. Najmanjše znižanje [ $\theta$ ]<sub>220</sub> je induciral GM3 pri 25 °C, nato pa sledijo po vrsti GM1 pri 25 °C, GM3 pri 50 °C in GM1 pri 50 °C. Tudi v tem primeru se znižanje [ $\theta$ ]<sub>220</sub> med proteinom WT in mutantom Y39A ni znatno razlikovalo. Že pri 25 °C, ko je membrana v fazi gela, je prišlo v primerjavi s 100 % DPPG pri DPPG:GM1 2:1 do znižanja [ $\theta$ ]<sub>220</sub>, medtem ko je bil delež vijačnice pri 50 °C med obema lipidnimi sestavama primerljiv. Ti rezultati kažejo na večjo afiniteto proteina do GM1 kot DPPG v fazi gela, medtem ko pride v tekoči neurejeni fazi verjetno do saturacije in indukcije maksimalne količine  $\alpha$ -vijačnice. Nasprotno pa mešanica DPPG:GM3 2:1 ni vplivala na tvorbo vijačne strukture pri 25 °C. Do znižanja eliptičnosti pri 220 nm je prišlo pri 50 °C, vendar pa je bil delež vijačnice nižji kot v primeru čistih DPPG oz. mešanice DPPG:GM1. Na osnovi teh meritev lahko sklepamo, da  $\alpha$ -sinuklein ne interagira z GM3 in je manjši delež inducirane vijačne strukture posledica zmanjšanega deleža DPPG v veziklih. Vendar pa je zanimivo, da je znižanje [ $\theta$ ]<sub>220</sub> večje kot v primeru DPPC:DPPG 1:2 (slika 38). DPPG:GM3 2:1 in DPPC:DPPG 1:2 vezikli vsebujejo isti molski delež DPPG. Če torej prisotnost GM3 ne bi vplivala na količino inducirane vijačnice, bi pričakovali podobno znižanje [ $\theta$ ]<sub>220</sub> v obeh primerih.



Slika 52: CD spektri divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina in mutanta Y39A posneti v daljnem UV-območju v prisotnosti DPPC:GM1 2:1 in DPPC:GM3 2:1 SUV. Spektre smo posneli pri temperaturi 25 °C in 50 °C. Meritve smo izvedli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0.

Figure 52: Far-UV CD spectra of wild-type (WT)  $\alpha$ -synuclein and Y39A mutant in the presence of DPPC:GM1 2:1 and DPPC:GM3 2:1 SUVs. Measurements were performed at 25 °C and 50 °C in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0.



Slika 53: CD spektri divjega tipa (WT)  $\alpha$ -sinukleina in mutanta Y39A posneti v daljnem UV-območju v prisotnosti DPPG:GM1 2:1 in DPPG:GM3 2:1 SUV. Spektre smo posneli pri temperaturi 25 °C in 50 °C. Meritve smo izvedli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0.

Figure 53: Far-UV CD spectra of wild-type (WT)  $\alpha$ -synuclein and Y39A mutant in the presence of DPPG:GM1 2:1 and DPPG:GM3 2:1 SUVs. Measurements were performed at 25 °C and 50 °C in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0.

Na sliki 54 so prikazane permeabilnosti DPPG:GM1 2:1 in DPPG:GM3 2:1 veziklov za kalcein po 20 min inkubaciji z  $\alpha$ -sinukleinom WT. Kalcein se iz veziklov sprošča predvsem pri 50 °C, ob čemer je bilo sproščanje večje (~100 %) v primeru veziklov, ki vsebujejo gangliozid GM1. V primeru DPPG:GM3 veziklov je pri 50 °C prišlo do sprostitve ~75 % barvila.  $\alpha$ -Sinuklein je povzročil manjšo permeabilnost SUV pri 25 °C, ko je membrana v fazi gela (~11 % pri DPPG:GM1 in ~7 % pri DPPG:GM3).



Slika 54: Sproščanje kalceina iz SUV sestavljenih iz DPPG:GM1 2:1 ali DPPG:GM3 2:1 po 20 min inkubaciji z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Meritve smo izvedli v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0, pri temperaturi 25 °C in 50 °C in R = 10. Vrednosti so normalizirane in predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta.

Figure 54: Calcein efflux from SUVs composed of DPPG:GM1 2:1 or DPPG:GM3 2:1 induced by wild-type  $\alpha$ -synuclein after 20 min incubation. Measurements were performed at 25 °C and 50 °C in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0, and R = 10. Values are normalized, error bars represent the standard error from at least two independent experiments.

### 4.5 INHIBICIJA FIBRILACIJE α-SINUKLEINA

*In vitro* smo testirali sposobnost štirih izbranih spojin za inhibicijo fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina. Kot izbrane spojine smo izbrali tri strukturno raznolike flavonoide (kvercetin (Q), epigalokatehin galat (EGCG), cianidin-3-glukozid (C3G)) in alkaloid nikotin (N). Strukturne formule vseh štirih spojin so predstavljene na sliki 13. Eksperiment smo izvedli tako, da smo 70  $\mu$ M  $\alpha$ -sinuklein WT več dni inkubirali s 300  $\mu$ M testiranimi spojinami. Tvorbo fibril smo zasledovali s fluorescenco ThT (slika 55). Pred začetkom eksperimenta (t = 0) in po končani 5-dnevni inkubaciji smo z NaDS-PAGE preverili tudi količino topnega proteina v vzorcih (slika 56).

Slika 55 prikazuje spremembe v intenziteti emisijske fluorescence ThT, iz katerih lahko sklepamo o hitrosti fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina. Časovni potek fibrilacije proteina brez dodane izbrane spojine (Cnt) kaže tipičen sigmoidni profil z začetno lag fazo, ki ji sledi faza rasti fibril in se konča z ravnotežno fazo. Inhibitorni učinek testiranih spojin bi se lahko odražal v podaljšanju lag faze in/ali znižanju intenzitete fluorescence ThT, kar bi kazalo na tvorbo manjše količine fibril v primerjavi s samim proteinom brez dodanih testiranih spojin (Cnt). Zaradi občasnega neskladja med ThT signalom in prisotnostjo fibril (Meng in sod., 2010; tudi naši rezultati (primerjaj 4.3.1 in 4.3.4)), so predlagali, da se kot inhibitorni učinek (vsaj v primeru flavonoidov, ki bi lahko tudi ugasnili fluorescenco ThT) upošteva zgolj

podaljšanje lag faze (Meng in sod., 2010). Glede na nespremenjeni ThT signal po 5-dnevni inkubaciji proteina z izbranimi spojinami, lahko sklepamo, da vsi trije flavonoidi (Q, EGCG, C3G) pri molarnem razmerju flavonoid/protein 4,2 popolnoma inhibirajo fibrilacijo  $\alpha$ sinukleina. Nasprotno pa je ThT fluorescenca v primeru inkubacije proteina z nikotinom (N) celo višja kot v primeru Cnt, medtem ko dolžina lag faze ostane nespremenjena.



Slika 55: Vpliv izbranih spojin na kinetiko fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina. Protein (70  $\mu$ M) smo brez (Cnt) ali v prisotnosti izbranih spojin (300  $\mu$ M) inkubirali v 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufru, pH = 7,0. Q (kvercetin); EGCG (epigalokatehin galat); C3G (cianidin-3-glukozid); N (nikotin).

Figure 55: Effect of selected compounds on fibrillation kinetics of  $\alpha$ -synuclein. Protein (70  $\mu$ M) without (Cnt) or in the presence of selected compounds (300  $\mu$ M) was incubated in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0. Q (quercetin); EGCG (epigallocatechin gallate); C3G (cyanidin-3-glucoside); N (nicotine).

S kemičnim povezovanjem (2,5 % glutaraldehid) in NaDS-PAGE (glej 3.4.2 in 3.4.3) smo analizirali topne proteinske zvrsti v vzorcih. Iz slike 56A je razvidno, da dodatek izbranih spojin (t = 0) ne vpliva na intrinzično porazdelitev zvrsti  $\alpha$ -sinukleina. Kot je prikazano že na sliki 24, so poleg monomerne oblike (~15 kDa) prisotne tudi manjše količine na NaDSneodpornih dimerov (~35 kDa; te proteinske lise so vidne le pri z glutaraldehidom tretiranih vzorcih) in neznatne količine višjih oligomerov. Da bi preverili inhibitorni učinek izbranih spojin na fibrilacijo α-sinukleina, smo po končani 5-dnevni inkubaciji vzorce centrifugirali (24.000 g, 30 min, 20 °C), da smo se znebili morebitnih zrelih fibril, in ovrednotili količino, porazdelitev in stabilnost topnih proteinskih zvrsti v supernatantu. V kontrolni liniji (Cnt) je opazna samo šibka proteinska lisa, ki ustreza velikosti monomera. To kaže, da je večina proteina netopnega in skupaj s ThT signalom (slika 55) potrjuje tvorbo fibril. Prav tako je prišlo do porabe topnega proteina v prisotnosti nikotina (N), kar kaže, da N ne zavira fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina. Nasprotno pa je v prisotnosti flavonoidov (Q, EGCG, C3G), ki jih glede na ThT profil (slika 55) lahko označimo kot močne inhibitorje, praktično ves protein prisoten v supernatantu. Proteinske lise, ki ustrezajo monomeru so mnogo intenzivnejše kot pri kontroli (slika 56B) in jih lahko primerjamo z intenzivnostjo lis pred inkubacijo (slika 56A). Ti rezultati potrjujejo učinkovito inhibicijo tvorbe fibril in/ali drugih visoko molekularnih agregatov. Glede na porazdelitev proteinskih zvrsti lahko sklepamo, da vsi trije flavonoidi stabilizirajo predvsem monomerno obliko proteina (slika 56B). Pri Q in

EGCG se tvori še nekaj višjih oligomerov (lisa na vrhu gela), medtem ko pri C3G opazimo šibko liso, ki ustreza dimerni obliki. Ti višji oligomeri so odporni na NaDS, saj so proteinske lise vidne tudi pri nepovezanih vzorcih (slika 56B).



Slika 56: NaDS-PAGE kemično ne-povezanega in povezanega  $\alpha$ -sinukleina brez ali z dodanimi izbranimi spojinami. (A) NaDS-PAGE proteinskih vzorcev pred 5-dnevno inkubacijo. (B) NaDS-PAGE supernatanta centrifugiranih proteinskih vzorcev po končani 5-dnevni inkubaciji. Proteine smo kemično povezali z glutaraldehidom. Q (kvercetin); EGCG (epigalokatehin galat); C3G (cianidin-3-glukozid); N (nikotin); Cnt (kontrola).

Figure 56: SDS-PAGE of non-crosslinked and crosslinked protein samples without or in the presence of selected compounds. (A) SDS-PAGE of the protein sample before the 5-day incubation. (B) SDS-PAGE of the supernatant fraction after 5-day incubation. Glutaraldehyde was used as a chemical cross-linker. Q (quercetin); EGCG (epigallocatechin gallate); C3G (cyanidin-3-glucoside); N (nicotine); Cnt (control).

## 4.6 PREHOD SKOZI KRVNO-MOŽGANSKO PREGRADO IN ZAŠČITA NEVRONOV

Po določitvi sposobnosti inhibicije fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina (glej 4.5) smo določili še sposobnost prehajanja teh spojin preko modela BBB (t.j. krvno-možganske pregrade) in testirali njihov zaščitni učinek na nevrone v pogojih induciranega oksidativnega stresa. Določili smo tudi antioksidativno učinkovitost izbranih spojin.

### 4.6.1 Antioksidativna učinkovitost in stabilnost izbranih spojin

V preglednici 7 so navedene antioksidativne učinkovitosti (AOU) izbranih spojin, ki smo jih določili z DPPH testom in izrazili kot TEAC, t.j. kot koncentracijo troloxa, ki ima ekvivalentni učinek kot 1 mM testirana spojina. Med vsemi izbranimi spojinami se je kot najboljši antioksidant izkazal EGCG s 4,3× višjo AOU od troloxa. Tudi Q in C3G kažeta nekoliko višjo AOU od troloxa, medtem ko pri nikotinu nismo zaznali antioksidativnega učinka.

Preglednica 7: Antioksidativna učinkovitost (AOU) izbranih spojin. AOU smo določili z DPPH testom in izrazili kot ekvivalent AOU troloxa (TEAC). Q (kvercetin); EGCG (epigalokatehin galat); C3G (cianidin-3-glukozid); N (nikotin).

Table 7: Antioxidant capacity of selected compounds. Antioxidant capacity is expressed as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) determined by DPPH radical scavenging assay. Q (quercetin); EGCG (epigallocatechin gallate); C3G (cyanidin-3-glucoside); N (nicotine).

spojina	TAEC (mM)		
Q	$1,69 \pm 0,20$		
EGCG	$4,\!29\pm0,\!16$		
C3G	$1,\!12\pm0,\!02$		
Ν	nismo zaznali		

Nadalje smo preverili stabilnost izbranih spojin pri pogojih uporabljenih pri testiranju prehoda spojin preko modela BBB (glej 4.6.2) in določitvi zaščitnega učinka na nevrone (glej 4.6.4). V ta namen smo vse tri flavonoide (Q, EGCG, C3G) pri 37 °C inkubirali v Ringer-HEPES pH 7,4 ali v Neurobasal mediju ter v določenih časovnih intervalih določevali AOU (slika 57) in koncentracijo spojin (slika 58).



Slika 57: Časovna odvisnost antioksidativne učinkovitosti (AOU) izbranih spojin v Ringer-HEPES pH 7,4 in v mediju Neurobasal. Inkubacijo smo izvedli pri 37 °C. AOU smo izrazili kot odstotek znižanja absorbance DPPH<sup>•</sup> (glej 3.12.2). Q (kvercetin); EGCG (epigalokatehin galat); C3G (cianidin-3-glukozid); N (nikotin). Figure 57: Time-dependent antioxidant capacity of selected compounds in Ringer-HEPES pH 7,4 and in Neurobasal media. Incubations were performed at 37 °C and the antioxidant capacity (AOU) was expressed as the percentage of DPPH<sup>•</sup> absorbance reduction (see 3.12.2 for details). Q (quercetin); EGCG (epigallocatechin gallate); C3G (cyanidin-3-glucoside); N (nicotine).

Inkubacija ima najmanjši vpliv na AOU C3G, saj ostane le-ta praktično nespremenjena v Ringer-HEPES pH 7,4, v mediju Neurobasal pa začne po 3 h inkubaciji počasi upadati, vendar pa po 48 h inkubaciji še vedno znaša ~46 % začetne AOU. Do najhitrejšega padca AOU je prišlo v primeru EGCG, saj se je AOU spojine po 6 h inkubaciji v Ringer-HEPES pH 7,4 znižala za 45 %, medtem ko je bilo znižanje v mediju Neurobasal še večje (62 %). Po 48 h inkubaciji je AOU EGCG v Neurobasal znašala le 14 % začetne AOU. Med prvimi 6 h je bil Q v Ringer-HEPES pH 7,4 relativno stabilen (obdržal je 90 % začetne AOU), medtem ko se je AOU Q hitreje znižala v mediju Neurobasal (64 % začetne AOU). Po 48 h inkubaciji v mediju Neurobasal je Q obdržal 36 % začetne AOU.



Slika 58: Časovna odvisnost koncentracije izbranih spojin v Ringer-HEPES pH 7,4 in mediju Neurobasal. Inkubirali smo pri 37 °C. Koncentracijo kvercetina (Q), epigalokatehin galata (EGCG) in cianidin-3-glukozida (C3G) smo določili s HPLC (glej 3.11.2).

Figure 58: Time-dependent concentration of selected compounds in Ringer-HEPES pH 7.4 and in Neurobasal media. Incubations were performed at 37 °C and the concentrations of quercetin (Q), epigallocatechin gallate (EGCG) and cyanidin-3-glucoside (C3G) were determined by HPLC system (see 3.11.2 for details).

Med inkubacijo flavonoidov v Ringer-HEPES pH 7,4 in Neurobasal mediju pride do razpada vseh treh spojin (slika 58). Najhitreje razpade EGCG, ki ga v Neurobasal nismo več zasledili že po 1 h inkubaciji in v Ringer-HEPES pH 7,4 po 2 h inkubaciji. Q se razgrajuje počasneje od EGCG, in sicer ga po 6 h inkubaciji v Ringer-HEPES pH 7,4 ostane 10 % začetne količine, v Neurobasal pa le 2 %. Podobno kot velja v primeru AOU, je tudi za degradacijo najmanj dovzeten C3G. Po 6 h inkubaciji v Ringer-HEPES pH 7,4 smo določili 62 % začetne koncentracije C3G, v Neurobasal pa smo ga zasledili tudi po 24 h inkubaciji (15 % začetne vrednosti).

Kot pričakovano, je bil nikotin stabilen v obeh medijih in se njegova koncentracija med 24 h inkubacijo ni znižala (rezultati niso prikazani).

### 4.6.2 Transport izbranih spojin skozi krvno-možgansko pregrado

Učinkovitost transporta izbranih spojin skozi BBB smo testirali z modelom HBMEC. Predhodno so opazili, da so izbrane spojine v določenih rastnih medijih (RPMI, DMEM,

HBSS) zelo nestabilne (dr. Lea Pogačnik, osebni razgovor), zato smo kot celični medij izbrali raztopino Ringer-HEPES pH 7,4. 100  $\mu$ M raztopino izbrane spojine v Ringer-HEPES pH 7,4 smo dodali na apikalno stran celic in 6 h (ter v primeru EGCG 1 h in nikotina 24 h) spremljali koncentracijo spojine v apikalnem in bazolateralnem predelku. Po inkubaciji smo s HPLC analizirali raztopini iz obeh predelkov. Takoj po končanem eksperimentu smo z meritvami TEER (priloga G) in določitvijo permeabilnosti celičnega monosloja za Na-F (*Pe*) (priloga H) ovrednotili tudi integriteto HBMEC monosloja. Z izjemo Q ni nobena od izbranih spojin poškodovala BBB modela (TEER vrednosti po inkubaciji niso bile značilno nižje in *P*e vrednosti niso bile značilno višje od kontrolnih vrednosti). Ker je 100  $\mu$ M koncentracija Q poškodovala celice (prilogi G in H), smo dodatno testirali tudi nižje koncentracije (50, 25 in 10  $\mu$ M). Samo najnižja, 10  $\mu$ M koncentracija Q, s katero smo celice tretirali 1 h, ni poškodovala HBMEC monosloja. V primeru N smo zaradi visoke stabilnosti spojine in predvidoma hitrega prehoda v možganski parenhim, poleg 100  $\mu$ M koncentracije testirali tudi 50  $\mu$ M raztopino.



Slika 59: Časovna odvisnost transporta izbranih spojin skozi celice linije HBMEC. Celice, ki so rasle na poroznih insertih smo za različna časovna obdobja tretirali s 100  $\mu$ M epigalokatehin galatom (EGCG) ali cianidin-3-glukozidom (C3G), ter s 50  $\mu$ M in 100  $\mu$ M nikotinom (N). Raztopine iz apikalnega in bazolateralnega predelka smo analizirali s HPLC. Rezultate smo izrazili kot učinkovitost transporta (%), izračunano kot opisano v 3.11.3.

Figure 59: Time-dependent transport efficiency of selected compounds across HBMEC line. Cells grown in transwell inserts were treated for several time periods with 100  $\mu$ M epigallocatechin gallate (EGCG) or cyanidin-3-glucoside (C3G), as well as with 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M nicotine (N); solutions from apical and basolateral compartments were collected for HPLC analysis and results expressed as transport efficiency (%), calculated as described in 3.11.3.
Slika 59 prikazuje učinkovitost transporta EGCG, C3G in N pri pogojih, ki ne vodijo v poškodbo HBMEC monosloja. Vse tri testirane spojine učinkovito prečkajo BBB model, vendar pa je kinetika prehoda med spojinami različna. Najhitrejši transport smo opazili v primeru EGCG, kjer je več kot 40 % spojine prečkalo HBMEC monosloj v 1 uri. Kinetika prehoda je bila v primeru C3G veliko počasnejša, saj je v 1 h bazolateralni razdelek dosegel le 1 % spojine, v 6 h pa 8,5 %. V primeru 50  $\mu$ M N je 3,2 % spojine prečkalo monosloj po 1 h, 17,7 % po 6 h in 35,5 % po 24 h inkubaciji. Kinetika prehoda je bila v primeru 100  $\mu$ M N celo hitrejša; 3 % spojine je celice prešlo po 1 h, 21 % po 6 h in 63 % po 24 h inkubaciji.

Kot pričakovano, je Q pri koncentracijah, ki so poškodovale monosloj HBMEC, hitro dostopal do bazolateralne strani, medtem ko ga v primeru 10  $\mu$ M koncentracije po 1 h inkubaciji nismo zaznali v bazolateralnem razdelku.

### 4.6.3 Celični privzem izbranih spojin

Preverili smo tudi sposobnost endotelijskih celic, da privzamejo izbrane spojine (rezultati so v preglednici 8). Izmed izbranih spojin smo po 1 h inkubaciji v celicah zasledili le Q in C3G. Ne moremo pa izključiti možnosti, da bi lahko bila koncentracija EGCG zaradi nizke stabilnosti spojine (glej 4.6.1) pod mejo določanja. Pomembno je poudariti, da smo najvišje vrednosti zaznali v primeru Q, ki je ali poškodoval ali pa ni prehajal BBB pri eksperimentalnih pogojih.

Preglednica 8: Celični privzem izbranih spojin v celice HBMEC po 1 h inkubaciji. Koncentracije izbranih spojin smo določili, kot je opisano v 3.11.3.2.

Table 8: Cellular uptake of selected compounds by HBMEC after1 h incubation period. Concentration of selected compounds was evaluated as described in 3.11.3.2.

spojina	mg/g protein
Q	$1,33 \pm 0,22$
EGCG	nismo zaznali
C3G	$0,\!27 \pm 0,\!04$
Ν	nismo zaznali

#### 4.6.4 Zaščitni učinek izbranih spojin na nevrone

Zaščitni učinek izbranih spojin (Q, EGCG, C3G, N) na nevrone v pogojih oksidativnega stresa smo testirali z uporabo primarne nevronske kulture iz podganjega možganskega korteksa (glej 3.11.1.2). Glede na rezultate časovno-odvisne učinkovitosti transporta preko modela BBB (slika 59) in v skladu s količinami, ki bi eventuelno lahko bile prisotne v možganskem parenhimu (Ishisaka in sod., 2011; Lambert in sod., 2006; Miyazawa in sod., 1999), smo testirali 1  $\mu$ M in 50  $\mu$ M raztopine izbranih spojin v mediju Neurobasal. Kljub temu, da pri Q nismo določili prehajanja skozi celice HBMEC (glej 4.6.2), smo testirali tudi to spojino, saj bi Q morda lahko dosegel možgane brez poškodovanja BBB v koncentracijah, ki so pod mejo naše detekcije.

Viabilnost nevronov znižata samo 50  $\mu$ M koncentraciji Q in EGCG (slika 60A), kjer stopnja nekrozi-podobne celične smrti doseže ~26 % (P < 0,01). Obe spojini sta pri isti koncentraciji

povišali tudi stopnjo apoptozi-podobne celične smrti (P < 0,01 za Q in P < 0,05 za EGCG) (slika 60C). Apoptotično smrt nevronov sta inducirali tudi obe testirani koncentraciji C3G (P < 0,05) (slika 60C). V nasprotju z viabilnostjo nevronov (slika 60A), je bila raven apoptozi-podobne celične smrti pri vseh izbranih spojinah nižja (maksimalno ~11 % pri 1  $\mu$ M C3G) (slika 60C).



Slika 60: Učinek izbranih spojin na zaščito nevronov v pogojih oksidativno-inducirane nekrozi-podobne in apoptozi-podobne celične smrti. Primarno kulturo nevronov podganjega možganskega korteksa smo pred določitvijo celične viabilnosti (A) in apoptoze (C) (glej 3.11.4.1), za 48 h izpostavili 1  $\mu$ M in 50  $\mu$ M koncentracijam kvercetina (Q), epigalokatehin galata (EGCG), cianidin-3-glukozida (C3G) in nikotina (N). V sestrski kulturi nevronov smo po prvih 24 h z dodatkom 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducirali oksidativno poškodbo in po 48 h določili celično viabilnost (B) in apoptozo (D) (glej 3.11.4.1). Rezultate smo primerjali s kontrolnimi celicami (Cnt), ki smo jih tretirali zgolj z medijem Neurobasal (A, C) ali 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B, D). \*\*P < 0,01, \*P < 0,05 v primerjavi s kontrolo (Cnt).

Figure 60: Neuroprotective effects of selected compounds from oxidative-induced necrotic-like and apoptotic-like cell death. Primary neuronal cultures from rat brain cortex were exposed to 1  $\mu$ M and 50  $\mu$ M concentrations of quercetin (Q), epigallocatechin gallate (EGCG), cyanidin-3-glucoside (C3G) and nicotine (N) for 48 h before evaluation of cell viability (A) and apoptosis (C) as described in 3.11.4.1. In sister cultures, 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was further added after the first 24 h to cause oxidative damage, and cell viability (B) and apoptosis (D) were determined at 48 h as described above. Results were compared with control cells (Cnt) treated with vehicle alone (A, C) or 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B, D), as appropriate. \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 vs. respective control (Cnt).

Izpostavitev 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zviša delež celične smrti v primarni kulturi nevronov. Nekrozipodobna celična smrt se je povišala na ~36 % in apoptozi-podobna na ~15 % (slika 60B, D). Izmed izbranih spojin samo 50  $\mu$ M koncentraciji Q (kot pričakovano) in C3G nista značilno znižali stopnje nekrotične smrti, inducirane z oksidativno poškodbo (slika 60B). Obe koncentraciji EGCG in 1  $\mu$ M koncentacija N so znižale celično smrt za ~40 % (1  $\mu$ M EGCG in N, P < 0,01; 50  $\mu$ M EGCG, P < 0,05). 1  $\mu$ M C3G je nekrozi-podobno celično smrt znižal za ~37 % (P < 0,05) in 50  $\mu$ M N za ~31 % (P < 0,05). Tudi 1  $\mu$ M Q je znižal nekrotično smrt (za ~26 %, P < 0,05) (slika 60B). Obe koncentraciji EGCG sta zaščitili nevrone tudi pred apoptozi-podobno celično smrtjo (slika 60D), in sicer je 1  $\mu$ M koncentracija zmanjšala odmiranje nevronov za ~37 % (P < 0,01) in 50  $\mu$ M za ~27 % (P < 0,05). Apoptozi-podobno celično smrt so sicer najbolj znižali (~60 %) 1  $\mu$ M Q in obe koncentraciji N (P < 0,01). V vseh treh primerih je prišlo do znižanja apoptotične smrti nevronov na raven netretirane kontrole, t.j. na ~6 % (P = 0,841 ob primerjavi z netretirano kontrolo).

Ti rezultati kot najboljši nevroprotektivni flavonoid izpostavljajo EGCG, ki mu sledi Q v nizkih koncentracijah. Najmanj učinkovita spojina je bila C3G, ki je v nizkih koncentracijah zaščitila nevrone le pred nekrozi-podobno celično smrtjo. Nevroprotektivne sposobnosti N so primerljive z ali pa celo presegajo učinkovitost EGCG.

# 5 RAZPRAVA

#### 5.1 IZOLACIJA PROTEINOV

Obstaja več postopkov za izolacijo rekombinantnega  $\alpha$ -sinukleina. Za vse je značilna izolacija iz grobega celičnega ekstrakta, ki ga lahko pridobimo s sonikacijo. Večino citoplazemskih proteinov nato obarjamo toplotno, z amonijevim sulfatom ali s kislo precipitacijo, sledita pa zaporedni ionsko-izmenjevalna in gelska kromatografija (Weinreb in sod., 1996; Narhi in sod., 1999; Giasson in sod., 1999). Za izolacijo smo uporabili nekoliko spremenjeni postopek, ki so ga za  $\alpha$ -sinuklein WT optimizirali v skupini prof. Antonyja Finka na Univerzi v Kaliforniji, Santa Cruz, ZDA in so ga predhodno za izolacijo tako WT kot mutantov Tyr $\rightarrow$ Ala uporabili tudi Ulrih in sod. (2008). Po obarjanju z amonijevim sulfatom smo proteine ločili z ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Nadaljna ločba z gelsko kromatografijo ni bila potrebna, saj smo se z intenzivno dializo znebili večine proteinskih nečistoč (slika 20).

Izolacija primerno očiščenega rekombinantnega α-sinukleina WT je v primerjavi s kompleksno zvitimi globularnimi proteini precej preprosta, saj je protein nativno nezvit, ne vsebuje Cys ostankov in je odporen tako na visoko temperaturo kot na povišano koncentracijo soli (Weinreb in sod., 1996; Jo in sod., 2000). Vendar pa se je v našem primeru izolacija izkazala kot zelo zahtevna. Glavni problem so predstavljali predvsem izjemno nizki donosi, predvidoma zaradi agregacije proteina med dolgotrajnim izolacijskim postopkom. Tako smo v nadaljevanju vse postopke izvajali pri 4 °C, razen kromatografske ločbe, ki je potekala pri 10 °C. Najzahtevnejša je bila izolacija trojne tirozinske mutante, ki smo jo v večih poskusih uspeli izolirati le enkrat. O težavah pri izolaciji Y(125,133,136)A so že poročali (prof. dr. Nataša Poklar Ulrih, osebni razgovor). Presenetljivo pa je bil izkoristek mutanta Y39A celo višji kot izkoristek proteina WT. To bi lahko kazalo na drugačno zvitje oz. konformacije vseh treh proteinov, česar pa v nadaljevanju nismo potrdili (glej 5.2). Iz 1 bakterijske kulture lahko pridobimo od 10 - 80 mg čistega α-sinukleina (Weinreb in sod., 1996). V povprečju smo pridobili maksimalno okoli 10 mg proteina na liter kulture.

#### 5.2 ZAČETNO STANJE α-SINUKLEINA V RAZTOPINI

V večini študij poročajo, da je izolirani rekombinantni  $\alpha$ -sinuklein v monomerni konformaciji. Pri tem se sklicujejo predvsem na analizo z NaDS-PAGE elektroforezo in SEC filtracijo. Monomerni  $\alpha$ -sinuklein je nativno nezviti protein, ki ima v raztopini različna konformacijska stanja (Weinreb in sod., 1996; Bertoncini in sod., 2005; Dedmon in sod., 2005). Vendar pa je nedavno več raziskav pokazalo, da je *in vitro*, in verjetno tudi *in vivo*,  $\alpha$ -sinuklein v dinamičnem ravnotežju med heterogenimi monomernimi in oligomernimi konformacijami (Wu in Baum, 2010; Frimpong in sod., 2010; Wang in sod., 2011), kar širi skupino različnih konformacijskih stanj  $\alpha$ -sinukleina tudi proti oligomernim oblikam (Frimpong in sod., 2010; Moriarty in sod., 2013). Tudi Ulrih in sod. (2008) so na podlagi nativne-PAGE 210 µM proteinov poročali, da so v raztopini tako  $\alpha$ -sinukleina WT kot Tyr mutanta prisotni tudi oligomeri, ob čemer pa bližnji-UV CD spekter ni pokazal tipične terciarne strukture (Ulrih in sod., 2008). Tako smo najprej preverili ali mutacije Tyr→Ala vplivajo na strukturo in/ali lastno agregacijsko težnjo  $\alpha$ -sinukleina.

Zamenjava Tyr z Ala bi lahko vplivala na strukturo  $\alpha$ -sinukleina, saj je Ala v primerjavi s Tyr manjša in manj hidrofobna AK, ki je ne najdemo pogosto v  $\beta$ -strukturi. CD analiza je pokazala, da v pufrski raztopini tako  $\alpha$ -sinuklein WT kot mutant Tyr $\rightarrow$ Ala nimajo urejene strukture (slika 21). Analiza s programom Contin kaže, da je delež α-vijačnice pri vseh treh proteinih majhen (slika 22). Pri 25 °C vsebuje WT protein  $8 \pm 1,1$  %, Y39A  $4 \pm 2,8$  % in Y(125,133,136)A 4  $\pm$  1,1 %  $\alpha$ -vijačne strukture, povečana temperatura pa ne vpliva na strukturo proteinov (slika 22). Rezultati za protein WT so primerljivi z ostalimi objavami (Narayanan in Scarlata, 2001). Sekundarno strukturo mutantov Tyr→Ala so že predhodno določili (Ulrih in sod., 2008; Rojko, 2009) in pokazali, da zamenjava Tyr39 z Ala nekoliko zniža količino  $\alpha$ -vijačne strukture, medtem ko se količina le-te nekoliko poviša pri trojni Tyr mutanti. V našem primeru je bila količina α-vijačnice manjša pri obeh mutantih. Vpliv Nterminalnega Tvr na strukturo  $\alpha$ -sinukleina je pričakovan, saj ima ta regija proteina sama po sebi težnjo do α-vijačne strukture tudi ob odsotnosti negativno nabitih fosfolipidov (Eliezer in sod., 2001). Do odstopanja pri trojnem mutantu bi lahko prišlo zaradi drugačne sestave pufra, saj smo za razliko od prejšnjih meritev (Ulrih in sod., 2008; Rojko, 2009) uporabili 150 mM NaCl, kar bi lahko vplivalo na konformacijo α-sinukleina.

Fibrile  $\alpha$ -sinukleina so sestavljene iz karakterističnega  $\beta$ -strukturiranega jedra, ki ga tvorijo AK ostanki ~30 do 100 (Slika 3) (Heise in sod., 2005; Qin in sod., 2007; Vilar in sod, 2008). Razvili so več računalniških algoritmov, s pomočjo katerih lahko napovemo težnjo proteinov za tvorbo amiloidne strukture. Algoritem TANGO, ki napoveduje  $\beta$ -agregacijske regije v proteinu, kaže večji vpliv aminokislinske zamenjave na mestu 39 na  $\beta$ -agregacijo (slika 23). To sovpada s strukturnim modelom fibrile (Heise in sod., 2005; Qin in sod., 2007; Vilar in sod, 2008), kjer le Tyr39 sodeluje pri tvorbi navzkrižne  $\beta$ -strukture. NMR je pokazala, da so spremembe, inducirane z mutacijo Y39A, omejene le na neposredno bližino tega Tyr (Lamberto in sod., 2009).

Agregacija proteinov je neposredno odvisna od površinske hidrofobnosti. Ta lastnost je pri  $\alpha$ -sinukleinu še posebej pomembna, saj imajo delno zviti intermediati in začasni oligomeri, ki so na *glavni poti do fibrilacije* (ang. *on-pathway*), za razliko od nestrukturiranega monomera, na površini izpostavljena hidrofobna področja (Uversky in sod., 2001; Dusa in sod., 2006). Kot je prikazano na sliki 27, niti WT niti mutanti niso vzbudili fluorescence ANS, kar kaže, da mutacije Tyr $\rightarrow$ Ala ne vplivajo na hidrofobnost proteina. Povezovanje proteinov z glutaraldehidom je pokazalo, da v raztopini  $\alpha$ -sinukleina prevladuje monomerna oblika, ki obstaja v koncentracijsko odvisnem ravnotežju z oligomernimi oblikami (slika 24). Prisotnost dimerov kot prevladujočih oligomernih zvrsti so potrdili tudi ostali (Wu in Baum, 2010; Frimpong in sod., 2010). Pomembno je poudariti, da se vzorec elektroforetske mobilnosti proteinov ni razlikoval, kar kaže na enako agregacijsko težnjo vseh treh proteinov.

Glede na CD spektroskopijo, *in silico* analizo, NaDS-PAGE ter ANS fluorescenco sklepamo, da zamenjava Tyr z Ala ne vpliva signifikantno na strukturo in ravnotežje med monomernimi in oligomernimi zvrstmi α-sinukleina.

### 5.3 VLOGA TYR V FIBRILACIJI α-SINUKLEINA

Molekularni mehanizem fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina je slabo poznan, kar predstavlja veliko oviro pri razvoju novih terapevtikov za Parkinsonovo bolezen in sorodna nevrodegenerativna stanja. *In vitro* je fibrilacija  $\alpha$ -sinukleina kompleksen proces, ki se prične s strukturno pretvorbo nezvitega monomera v delno zvite intermediate (Uversky in sod., 2001). Nato se preko raznolike skupine oligomernih konformacij tvorijo zrele fibrile z značilno navzkrižno  $\beta$ -strukturo (Serpell in sod., 2000; Fink, 2006). Strukturne pretvorbe monomernih in oligomernih zvrsti spremlja povišana izpostavljenost hidrofobnih področij (Uversky in sod., 2001; Dusa in sod., 2006; Cremades in sod., 2012). Kljub znani promovirajoči vlogi Tyr ostankov za tvorbo fibril (Ulrih in sod., 2008; Yamin in sod., 2003; Lamberto in sod., 2009; Izawa in sod., 2012), pa je njihova natančna vloga v tem procesu nepojasnjena. Da bi pridobili podrobnejši vpogled v prispevek N-terminalnega in C-terminalnih Tyr ostankov v fibrilaciji, smo primerjali fibrilacijske profile Y39A in Y(125,133,136)A mutant s fibrilacijo WT proteina. Proteine smo inkubirali pri nevtralnem pH in 37 °C ob intenzivnem mešanju in z dodatkom 150 mM NaCl, da bi bolje posnemali fiziološke pogoje.

Odsotnost N-terminalnega Tyr ali vseh treh C-terminalnih Tyr je močno inhibirala fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina, s čimer smo potrdili prejšnja opažanja (Izawa in sod., 2012; Ulrih in sod., 2008; Lamberto in sod., 2009). V času, ki je zadosten za zaključek fibrilacije proteina WT, mutirana proteina ne kažeta znakov fibrilacije, kot lahko sklepamo iz nespremenjene fluorescence ThT in ANS (slika 28, 30), nespremenjenega NaDS-PAGE profila (slika 29; primerjaj z dnevom 0; slika 24) ter odsotnosti fibrilarnih struktur v primerjavi z WT  $\alpha$ -sinukleinom (slika 31). Vendar pa za razliko od prejšnjih raziskav naši rezultati kažejo, da pri podaljšanem inkubacijskem času (8 dni) obe Tyr $\rightarrow$ Ala mutanti tvorita fibrilam-podobne strukture (slika 31). Glede na približno 5× daljšo lag fazo pri obeh mutantah sklepamo, da Tyr39 in C-terminalni Tyr prispevajo predvsem k začetnim korakom fibrilacije.

Tvorbo fibrilam-podobnih struktur pri obeh mutantih (slika 31) spremlja znatno manjši porast v fluorescenci ThT kot v primeru proteina WT (slika 28). O neskladju med fluorescenco ThT in pojavom fibril so že poročali (Cloe in sod., 2011; Cukalevski in sod., 2012; Meng in sod., 2009). Molekularni mehanizem vezave ThT na fibrile je nepoznan, vendar pa so med drugim predlagali tudi preferenčno interakcijo barvila z aromatskimi AK na površini fibrile (Biancalana in Koide, 2010; Biancalana in sod., 2009). Tako bi bilo možno, da je odsotnost Tyr direktno povezana z nizkim signalom ThT. Vendar pa glede na predlagani model strukture fibrile (Heise in sod., 2005; Qin in sod., 2007; Vilar in sod, 2008), le Tyr39 sodeluje v  $\beta$ -strukturiranem jedru (slika 3) in tako potencialno prispeva k vezavi ThT. Ker obe mutanti kažeta podobno nizko afiniteto ThT, pripisujemo neskladje v vezavi ThT strukturnim razlikam v sestavi fibril WT in mutant, ki pa jih ne moremo detektirati z resolucijo naših AFM slik.

 $\alpha$ -Sinuklein WT in oba mutanta kažejo podobno nezvito strukturo in začetno agregacijsko težnjo (glej 5.2). Zaradi tega bi lahko sklepali, da je opažen zamik v fibrilaciji predvsem posledica odsotnosti običajne funkcije aromatskih AK v tem procesu. NMR struktura za Y(125,133,136)A sicer ni določena, za Y39A pa so strukturne spremembe le majhne in lokalne (Lamberto in sod., 2009). Omeniti velja, da so s FTIR-analizo, ki je primernejša za detekcijo  $\beta$ -strukture kot CD spektroskopija, sicer določili nekoliko manjši delež  $\beta$ -strukture

pri obeh Tyr mutantih (Ulrih in sod., 2008), pri čemer poročajo tudi o spremembi iz antiparalelne  $\beta$ -strukture pri proteinu WT v paralelno  $\beta$ -strukturo pri mutantih (Ulrih in sod., 2008). Ta strukturni premik bi potencialno lahko bil neugoden za tvorbo fibril, saj monomeri v fibrilah zavzamejo strukturo antiparalelne  $\beta$ -strukture (slika 6) (Vilar in sod., 2008).

Z NMR-analizo konformacijskih stanj α-sinukleina so pokazali, da N- in C-terminalni del proteina sodelujeta v intramolekularnih (Dedmon in sod., 2005; Bertoncini in sod., 2005) in tudi intermolekularnih (Wu in Baum, 2010) interakcijah. Še posebej opazna je bila daljnosežna interakcija med C-terminalnimi AK ostanki 120 - 140 in osrednjo regijo, ki zajema AK ostanke 30 - 100 (Bertoncini in sod., 2005), ter antiparalelni N/C - C/N kontakti med polipeptidnima verigama, in sicer med ostanki 35 - 50 in 110 - 140 (Wu in Baum, 2010). Za vzdrževanje teh kontaktov naj bi bile pomembne predvsem elektrostatske interakcije (Bertoncini in sod., 2005; Wu in Baum, 2010), vendar pa te regije vsebujejo tudi Tyr ostanke, ki bi lahko tvorili hidrofobni aromatski skupek in stabilizirali te interakcije. Predlagali so, da C/N intramolekularne interakcije ščitijo regijo NAC pred samoasociacijo (Bertoncini in sod., 2005), vendar pa je več kasnejših študij nasprotno pokazalo, da ti kontakti ne vplivajo ali pa celo ojačajo agregacijsko težnjo α-sinukleina (Ulrih in sod., 2008; Ullman in sod., 2011; Rospigliosi in sod., 2009; Sung in Eliezer, 2007). Poleg tega je nedavna računalniška študija eksperimentalno pridobljenih podatkov pokazala, da je v nezanemarljivem deležu αsinukleinskih konformacij regija NAC izpostavljena topilu in tako neposredno dostopna za intermolekularne interakcije (Ullman in sod., 2011). To kaže, da zgolj izpostavljenost zelo hidrofobne regije NAC ni edini predpogoj za iniciacijo amiloidogene fibrilacije. Možno je, da zamenjava tirozina(ov) z alaninom(ni) prekine specifične aromatske interakcije med Nterminalno in C-terminalno regijo  $\alpha$ -sinukleina, kar upočasni fibrilacijo. Te N/Cmedaromatske interakcije bi lahko omogočile lažjo energijsko neugodno pretvorbo nurejenega monomernega  $\alpha$ -sinukleina v oligomerni intermediat s težnjo agregacije. Če teh stabilizacijskih interakcij ni, se čas spontane konformacijske pretvorbe in interakcije med NAC regijami podaljša, oligomerne zvrsti na poti do fibrilacije so znatno manj pakirane (slika 30), kar pa vodi do zakasnitve pri fibrilaciji in spremenjenega pakiranja fibril.

Karakterizacija fibrilacije α-sinukleina na ravni AK ostankov je pomembna pri načrtovanju novih terapevtskih sredstev. Antiamiloidogene spojine, ki bi se specifično vezale na Tyr ostanke, bi lahko tako zavrle neželjene fibrilacijo-promovirajoče N/C medaromatske interakcije in zaustavile tvorbo fibril. Upočasnjena pretvorba bi lahko omogočila učinkovitejše celične popravljalne mehanizme (Cremades in sod., 2012). V prid našim rezultatom so tudi raziskave, v katerih so pokazali, da vezava določenih spojin na Tyr prepreči konformacijske spremembe proteina in posledično inhibira fibrilacijo (Lamberto in sod., 2009; Meng in sod., 2009). Skupaj z našimi rezultati je torej mogoče, da takšna blokada N- ali C-terminalnih Tyr prepreči medaromatske N/C-interakcije v začetnih fazah fibrilacijskega procesa.

## 5.4 INTERAKCIJA α-SINUKLEINA Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI

Funkcija  $\alpha$ -sinukleina ni poznana, vendar pa obstajajo nekateri dokazi, ki predlagajo vlogo proteina v povezavi z lipidnimi membranami, še posebej z membrano transportnih veziklov (Auluck in sod., 2010; Bendor in sod., 2013). V nevronih se  $\alpha$ -sinuklein nahaja v bližini in/ali asociiran s sinaptičnimi vezikli (George in sod., 1995; Iwai in sod., 1995; Maroteaux in sod., 1988; Jensen in sod., 1998; Fortin in sod., 2004). Protein bi lahko imel vlogo v transportu veziklov ter regulaciji sinaptične plastičnosti in velikosti zaloge presinaptičnih veziklov in s tem v prenosu nevrotransmiterja (Auluck in sod., 2010).

Fiziološki pomen interakcije med  $\alpha$ -sinukleinom in lipidnimi membranami je dokaj jasen, medtem ko molekulske podrobnosti asociacije monomernega proteina z membrano niso znane. Kljub intenzivnim raziskavam na tem področju, je veliko izsledkov povsem nasprotujočih. Tako še vedno ni pojasnjena selektivnost  $\alpha$ -sinukleina za sestavo in fazo lipidov ter ukrivljenost veziklov (Auluck in sod., 2010; Pfefferkorn in sod., 2012; Dikyl in Eliezer, 2012; Pirc in Ulrih, 2011; Alderson in Markley, 2013; Shvadchak in sod., 2011a). K temu najverjetneje prispeva uporaba raznolikih membranskih modelov in eksperimentalnih pogojev, ki pogosto tudi zelo odstopajo od fizioloških razmer. Poleg tega so se študije večinoma osredotočale na vpliv membrane na vezavo, strukturo in agregacijsko težnjo  $\alpha$ -sinukleina, manj pa na učinek proteina na lastnosti membrane.

Sinaptični vezikli imajo premer okoli 40 nm (Takamori in sod., 2006), čemur se v pogojih *in vitro* najbolj približajo majhni enoslojni vezikli (SUV) (Pffeferkorn in sod., 2012). S sistematičnim preučevanjem interakcije med  $\alpha$ -sinukleinom in lipidnimi membranami pri nevtralnem pH in ionski jakosti pri fizioloških pogojih smo želeli ugotoviti, katere sile (elektrostatske in/ali hidrofobne) prispevajo k interakciji  $\alpha$ -sinukleina z lipidno membrano in kako vezava  $\alpha$ -sinukleina vpliva na termotropne lastnosti in strukturo membrane.

## 5.4.1 Vpliv lipidne membrane na strukturo α-sinukleina

Z merjenjem spektrov v daljnjem UV območju valovnih dolžin s CD spektroskopijo lahko iz karakterističnega minimuma pri 220 nm ocenimo vsebnost  $\alpha$ -vijačnice v proteinu. Znano je namreč, da interakcijo  $\alpha$ -sinukleina z membrano spremlja konformacijska pretvorba iz neurejene v  $\alpha$ -vijačno strukturo (Davidson in sod., 1998). Do konformacijske spremembe  $\alpha$ -sinukleina (tvorbe  $\alpha$ -vijačne strukture) je prišlo v prisotnosti negativno nabitih SUV, ne pa tudi nevtralnih (slike 33 - 38).

Na osnovi trenutnih literaturnih podatkov ni jasno, ali  $\alpha$ -sinuklein interagira z nenabitimi membranami, saj so vezavo opisali le v nekaterih študijah (Zhu in sod., 2003; Nusher in sod., 2004; Narayanan in Scarlata, 2001; Kamp in Beyer, 2006; Rhoades in sod., 2006; Middelton in Rhoades, 2010; Mihajlovic in Lazaridis, 2008). Poročali so o tvorbi  $\alpha$ -vijačnice v prisotnosti SUV iz DPPC v fazi gela, ne pa tudi v tekočem neurejenem stanju (Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006; Bartels in sod., 2010). Predlagali so tudi vezavo  $\alpha$ -sinukleina na POPC vezikle (Narayanan in Scarlata, 2001). Naši rezultati so pokazali, da se CD spektri  $\alpha$ -sinukleina po dodatku DPPC in POPC veziklov pri nobeni od preiskovanih temperatur (25 - 70 °C) niso spremenili in s tem tudi ne vrednost [ $\theta$ ]<sub>220</sub> (slika 33, 34). Iz tega

sklepamo, da protein ostaja v nezviti konformaciji in ne interagira z membrano, katere neto naboj je 0.

Zmanjšanje  $[\theta]_{220} \alpha$ -sinukleina je bilo v primeru DPPG veziklov zelo odvisno od temperature (slika 40). V fazi gela (oz. do ~40 °C) je bil delež  $\alpha$ -vijačnice v primerjavi s proteinom brez veziklov ali v prisotnosti nevtralnih veziklov le malo višji. Delež  $\alpha$ -vijačne strukture pa je pričel naraščati pri in nad temperaturo faznega prehoda lipidov (T<sub>m</sub>). Do faznega prehoda pride, ko se alkilne verige lipidnih molekul iz relativno rigidne in iztegnjene, v glavnem trans konformacije v gel stanju, pretvorijo v orientacijsko bolj neurejeno stanje, za katerega je značilna povečana stopnja intra- in intermolekularnega gibanja (McElhaney, 1986). Količina α-vijačnice je bila najvišja v temperaturnem območju 50 - 60 °C, ko so lipidi v tekočem neurejenem stanju, kar je potrdila tudi analiza s programom Contin (slika 42). Pri večji T delež  $\alpha$ -vijačnice ponovno upade, kar bi lahko pripisali tudi denaturaciji urejene sekundarne strukture proteina in/ali pa posledici prevelike gibljivosti acilnih verig. Membranskoinducirano zvitje  $\alpha$ -vijačnice je eksotermni proces, zato zvišanje temperature vodi v denaturacijo α-vijačnice (Seelig, 2004). Od T odvisno tvorbo α-vijačnice v prisotnosti DPPG so pokazali tudi Kjaer in sod. (2009), vendar samo za vezikle večjih velikosti (nad 200 nm), ne pa tudi za sonicirane vezikle. Kot kažejo rezultati, tvorbo α-vijačnice določata tako površinski naboj kot fazno stanje lipidne membrane. To potrjujejo tudi rezultati z mononenasičenimi POPG vezikli (slika 36), saj se CD spektra DPPG pri 55 °C in POPG pri 45 °C praktično ne razlikujeta (slika 39).

Mnenja o preferenčni asociaciji  $\alpha$ -sinukleina z anionskimi lipidi v fazi gela ali v tekoči neurejeni fazi so deljena (Davidson in sod., 1998; Jo in sod., 2000; Zhu in sod., 2003; Chandra in sod., 2003; Ramakrishnan in sod., 2003; Middelton in Rhoades, 2010). Poročali pa so tudi, da je za vezavo pomembna prisotnost dveh faz membrane (Rojko, 2009; Kubo in sod., 2005). Tudi v nekaterih prejšnjih raziskavah so pokazali, da se  $\alpha$ -sinuklein veže izključno na negativno nabite vezikle v tekoči neurejeni fazi (Kjaer in sod., 2009; Stöckl in sod., 2008; Ramakrishnan in sod., 2003). Asociacijo so pripisali elektrostatskim interakcijam med pozitivno nabitimi  $\epsilon$ -amino skupinami Lys, ki se nahajajo v nepopolnih ponovitvah N-terminalne regije, ter anionskimi lipidi (Davidson in sod., 1998; Jao in sod., 2008; Bartels in sod., 2010; Perlmutter in sod., 2009; Pranke in sod., 2011). Na splošno velja, da so v tvorbo amfipatične vijačnice na vodno-lipidni medfazi membrane vpleteni vsaj trije različni koraki (White in Wimley, 1998; 1999; Seelig, 2004); daljnosežne elektrostatske interakcije med anionskimi lipidi in kationskim polipeptidom zvišajo koncentracijo proteina v bližini površine membrane, nato pa sledita (zaporedno ali simultano) adsorbcija in zvitje proteina (Seelig, 2004).

Vpliv površinskega naboja na tvorbo vijačnice smo preučili z vezikli sestavljenimi iz mešanice nevtralnih (DPPC) in negativno nabitih (DPPG) lipidov, kjer dodatek DPPC k DPPG lipidom zmanjša gostoto površinskega naboja membrane (Schwieger in Blume, 2007). Elektrostatski učinek je sicer odvisen od naboja proteina, membranskega površinskega potenciala oz. gostote naboja membrane ter ionske jakosti raztopine (Seelig, 1997; 2004; McLaughlin, 1989). Zelo poenostavljeno, povprečni neto naboj (naboj/lipid) 100 % DPPG veziklov je -1, DPPC:DPPG 1:2 veziklov -0,66 in DPPC:DPPG 1:1 veziklov -0,5 (Shvadchak in sod., 2011b). Medtem ko pri DPPG veziklih povišanje deleža α-vijačnice sovpada s taljenjem lipidnih verig, pa tekoča neurejena faza v primeru DPPC:DPPG veziklov

ni inducirala znatne spremembe v  $[\theta]_{220}$  (slike 37, 38, 40). Iz CD analize ne moremo sklepati o tem, ali s PC:PG vezikli asocira manj proteina ali pride do tvorbe krajše vijačnice ob isti količini vezanega proteina kot v primeru DPPG. Tudi Bartels in sod. (2010) niso zasledili večjih razlik v količini vijačnice med fazo gela in tekočo neurejeno fazo, vendar pa so določili primerljivo količino vijačnice tudi v prisotnosti DPPC pod T<sub>m</sub>. EPR-analiza je pokazala, da znižanje gostote površinskega naboja zmanjša afiniteto  $\alpha$ -sinukleina do POPC:POPG, pri čemer pa tako kot v našem primeru niso detektirali signifikantne vezave s POPC (Robotta in sod., 2012). Nasprotno pa rezultati pridobljeni s fluorescenčno korelacijsko spektroskopijo (FCS) kažejo na večjo afiniteto proteina za ekvimolarno mešanico DPPC:DPPG v fazi gela kot za POPC:POPG (Middelton in Rhoades, 2010).

Kot kažejo naši rezultati, je določena gostota negativnega površinskega naboja nujna za adsorbcijo proteina na membrano. To potrjuje ključno vlogo N-terminalne domene z več ostankov Lys pri interakciji  $\alpha$ -sinukleina z membrano. Vendar pa so za stabilizacijo amfipatične vijačnice poleg elektrostatskih interakcij potrebne še dodatne, hidrofobne interakcije. Glavna značilnost površine zelo ukrivljene membrane je povečanje števila in velikosti defektov pakiranja lipidov, kar izpostavlja hidrofobna področja lipidnega dvosloja (Cui in sod., 2011). Ti defekti so še izrazitejši v fazi gela, ko je membrana bolj rigidna (Nuscher in sod., 2004). Pokazali so, da se  $\alpha$ -sinuklein lahko veže tako na nevtralne kot anionske lipide pod T<sub>m</sub> (Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006; Middelton in Rhoades, 2010). Do tvorbe manjše količine vijačnice je sicer prišlo tudi v prisotnosti DPPG veziklov v fazi gela, vendar pa je bila količina  $\alpha$ -vijačne strukture signifikantno višja v primeru tekoče neurejene faze (slika 35, 40). V tekočem neurejenem stanju membrane so tako lipidne glave kot acilne verige ohlapno pakirane, kar bi lahko omogočilo lažjo vstavitev proteina v hidrofobni del membrane in zvitje vijačnice. V tekoči neurejeni fazi je za akomodacijo proteina potrebna tudi manjša reorganizacija membrane.

Vezava  $\alpha$ -sinukleina na lipidne membrane različne sestave je zelo odvisna od molskega razmerja lipidi/protein (R) (Zhu in sod., 2003; Shvadchak in sod., 2011c; Lokappa in sod., 2014). Zaradi nizkega signala nismo uspeli posneti spektrov tudi pri manjši koncentraciji proteina. Določili so, da pri R  $\approx$  10 pride do nasičenja POPG SUV (Lokappa in sod., 2014). Tako ne moremo izključiti možnosti, da bi pri višjem R lahko protein tvoril vijačno strukturo tudi na rigidnih in/ali nevtralnih veziklih.

## 5.4.2 Vpliv $\alpha$ -sinukleina na lastnosti membrane

Da bi dobili vpogled v vpliv vezave  $\alpha$ -sinukleina na ureditev lipidnega dvosloja, smo merili spremembe v fluorescenčni anizotropiji dveh sond, TMA-DPH in DPH, ki se nahajata različno globoko v dvosloju. Anizotropija je odvisna od fluidnosti membrane in jo lahko povežemo z ureditvenim parametrom lipidov, S (Kuhry in sod., 1983).  $\alpha$ -Sinuklein WT ni vplival na ureditveni parameter PC veziklov pri nobeni od preiskovanih temperatur, kar skupaj z odsotnostjo vijačne strukture potrjuje, da ni vezave z nenabitimi lipidi. Prav tako protein ni vplival na urejenost anionskih veziklov, ko se ti nahajajo v fazi gela. Nasprotno pa je pri in nad T<sub>m</sub>  $\alpha$ -sinuklein uredil lipidni dvosloj DPPC:DPPG 1:1 in DPPG veziklov (slike 43 – 47). Kot pričakovano, je bil vpliv na ureditev lipidov manjši v primeru DPPC:DPPG 1:1. Stopnja ureditve lipidov je torej odvisna od naboja in faze membrane ter tudi od koncentracije proteina (glej spodaj). Ker je učinek na ureditev membrane na vodnolipidni meji (detektirano s TMA-DPH) v obeh primerih podoben učinku v regiji acilnih verig (detektirano z DPH), sklepamo na ureditev tako regije lipidnih glav kot acilnih verig.

Pri  $T_m$  pride do ureditve DPPG dvosloja pri nižji koncentraciji proteina (že pri R = 500, ko je koncentracija 0,26 µM) kot v primeru, ko je membrana v tekočem neurejenem stanju, kjer pride do ureditve lipidov pri R = 100 (koncentracija proteina je v tem primeru 1,3 µM). Tu je učinek primerljiv z učinkom na POPG vezikle. Membrana DPPG je pri  $T_m$  v ravnotežnem stanju med tekočo urejeno in tekočo neurejeno fazo. Iz tega sledi, da je v primerjavi s tekočo neurejeno fazo, pri  $T_m$  v membrani manj dostopnih hidrofobnih regij. To bi lahko bil vzrok za manjšo strukturno pretvorbo proteina, saj je na voljo manj vezavnih mest za tvorbo amfipatične vijačnice. Posledično ima lahko manjša količina vezanega proteina večji vpliv na urejenost lipidov. V tekoči neurejeni fazi je bil delež vijačnice največji, vendar pa predvidevamo, da je tudi pri R = 10 koncentracija proteina premajhna za ureditev močno dinamičnih lipidnih verig. Predvidevamo, da bi zvišanje koncentracije proteina vodilo v povišanje ureditvenega parametra membrane.

Presenetljivo pa je, da tudi v primeru DPPC:DPPG 1:1 pride do koncentracijsko-odvisne ureditve lipidov. S temi vezikli namreč pri nobeni T (25, 40, 50 °C) ni prišlo do indukcije znatne količine vijačne strukture (slika 37). Tvorba vijačne strukture je nujna za vstavitev proteina v membrano. Vpliv na ureditev lipidov kaže, da je protein adsorbiran na površini membrane. Senčenje negativnega naboja PG zaradi vezave proteina zmanjša odboj med negativnimi PG in vodi v ureditev lipidov.

Fluorescenčna anizotropija je občutljiva na dinamiko molekul v določeni bližini probe, medtem ko lahko s pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) merimo spremembe v entalpiji in temperaturi faznega prehoda lipidov in določimo termodinamske parametre povezane s toplotno induciranimi faznimi prehodi. DSC tako nudi bolj neposreden dokaz za interakcijo med proteinom in lipidi. Ker imajo SUV zelo nekooperativni fazni prehod v širokem temperaturnem območju (slika 32) smo za DSC analizo interakcije med  $\alpha$ sinukleinom in membrano izbrali MLV vezikle (slika 51, preglednica 6). Kot pričakovano, dodatek  $\alpha$ -sinukleina k DPPC lipidom pri R = 10 ni vplival na fazni prehod lipidov, je pa protein vplival na fazni prehod negativno nabitih veziklov. To v nasprotju z nekaterimi objavami (Davidson in sod., 1998) kaže tudi na interakcijo proteina z večjimi MLV. WT αsinuklein je termično stabiliziral tako DPPG kot tudi DPPC:DPPG 1:1 vezikle (v obeh primerih pride do zvišanja T<sub>m</sub>). Zvišanje T<sub>m</sub> kaže na stabilizacijo faze gela po vezavi αsinukleina. Obenem se zmanjša tudi kooperativnost faznega prehoda obeh veziklov. Protein ne vpliva na entalpijo DPPC:DPPG 1:1 veziklov, pri DPPG veziklih pa se entalpija v prisotnosti proteina nekoliko zniža. To kaže, da učinek proteina na membrano ni zgolj površinski, ampak pride do vstavitve proteina v dvosloj.

CD spektroskopija, fluorescenčna anizotropija in DSC kažejo, da  $\alpha$ -sinuklein v odvisnosti od gostote negativnega površinskega naboja in faze membrane interagira z membransko površino in se vstavi vanjo. Ureditev lipidnega dvosloja smo želeli potrditi še s testom permeabilizacije veziklov. Pričakovali smo, da  $\alpha$ -sinuklein ne bo vplival na sproščanje kalceina iz veziklov, oz. bo kvečjemu znižal spontano puščanje SUV. Vendar pa je nasprotno dodatek proteina (pri R = 10) induciral puščanje veziklov sestavljenih iz nenasičenih POPG, ter nasičenih DPPG in DPPC:DPPG 1:1 pri in nad T<sub>m</sub> (slika 50). To kaže na tvorbo por v

membrani oz. poškodbo dvosloja, kar pa lahko izključimo na osnovi merjenja fluorescenčne anizotropije. Test sproščanja kalceina ne omogoča sklepanja o mehanizmu permeabilizacije veziklov (Butterfield in Lashuel, 2010). Pokazali so, da stopnja permeabilizacije veziklov korelira z indukcijo  $\alpha$ -vijačnice (Lorenzen in sod., 2014). Vendar pa je  $\alpha$ -sinuklein permeabiliziral DPPG vezikle tudi pri temperaturi faznega prehoda (40 °C), ko je količina  $\alpha$ -vijačnice znatno nižja kot v tekoči neurejeni fazi (50 °C) (slika 35, 41). Poleg tega je prišlo do izhajanja kalceina tudi v primeru DPPC:DPPG 1:1, ki v primerjavi z DPPG vezikli inducirajo signifikantno nižjo količino vijačne strukture (slika 37, 41). Še več, permeabilnost veziklov celo sovpada z učinkom proteina na ureditev lipidnega dvosloja.

Za lipidni dvosloj naj bi bili še posebej destruktivni oligomeri  $\alpha$ -sinukleina (Volles in sod., 2001), ki bi se lahko prav tako preferenčno vezali na anionsko membrano v tekoči neurejeni fazi (van Rooijen in sod., 2008; van Rooijen in sod., 2009). Vendar pa oligomerizacijo  $\alpha$ sinukleina v raztopini izključujemo, saj smo pri vseh eksperimentih uporabili nizke koncentracije proteina (maksimalna koncentracija pri testu permeabilnosti in merjenju anizotropije je bila 13 µM) in relativno kratke čase inkubacije (iz slike 25 je razvidno, da je pri 17,5 µM koncentraciji prisoten zgolj monomer). Tudi za monomer so pokazali indukcijo sproščanja kalceina iz POPG LUV, vendar pa istočasno protein ni permeabiliziral POPC:POPG 1:1 veziklov (van Rooijen in sod., 2009), kar je v nasprotju s permeabilizacijo DPPC:DPPG 1:1 v tekoči neurejeni fazi v našem primeru. Če bi monomerni α-sinuklein tvoril poro, bi pričakovali, da bo začetna permeabilnost za kalcein nizka in bi nato postopoma naraščala do stopnje platoja, saj bi se moral protein najprej vezati in vstaviti v membrano. Vendar pa je bilo koncentracijsko odvisno sproščanje kalceina največje takoj po dodatku proteina POPG (slika 49). Poleg tega tudi ni pričakovati, da bi protein tvoril urejeno poro v dokaj nestrukturirani konformaciji. Po drugi strani so predlagali, da je tvorba pore malo verjetna, do puščanja veziklov bi lahko prišlo zaradi lateralne ekspanzije lipidov in tanjšanja membrane (Ouberai in sod., 2013). α-Sinuklein bi lahko induciral permeabilnost tudi z remodulacijo dvosloja, kot je na primer tubulacija membrane (Varkey in sod., 2010). Ker je membrana v fluidnem stanju že per se prepustna za kalcein, je možno, da adsorbcija proteina na lipidne glave še poviša sproščanje. Anionski vezikli so namreč bolj nagnjeni k disrupciji z mehansko silo (Shoemaker in Vanderlick, 2002). To tudi sovpada z nižjo permeabilnostjo DPPC:DPPG veziklov glede na DPPG in POPG. Dodatna možna razlaga bi lahko bila, da po adsorpciji proteina na negativno površino lipidnih glav pride do nevtralizacije naboja membrane, kar bi lahko olajšalo izhajanje kalceina, ki ima pri pH = 7,0 negativni naboj.

V postopku prenosa nevrotransmiterja sinaptični vezikli fuzirajo s presinaptično plazemsko membrano in se nato ponovno tvorijo z endocitozo nevrotransmiterja (Sudhof, 2004). Sklepamo, da ima  $\alpha$ -sinuklein ureditveno funkcijo in stabilizira lipidni dvosloj močno ukrivljene membrane SUV. Protein vzdržuje integriteto veziklov, kar bi v fiziološkem kontekstu lahko pomenilo, da stabilizira membrano sinaptičnih veziklov, kot so že predhodno predlagali v nekaterih študijah (Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006; Cui in sod., 2011; Perlmutter in sod., 2009). To bi lahko preprečilo prezgodnjo fuzijo veziklov s presinaptično membrano.

#### 5.4.3 Pomen tirozinskih ostankov za interakcijo α-sinukleina z membrano

Membransko vezana vijačna struktura  $\alpha$ -sinukleina leži paralelno na površini micela ali vezikla (Jao in sod., 2008; Ulmer in sod., 2005). Pri interakciji proteina z vodno-lipidno mejo bi lahko imela zaradi tako hidrofobnega kot polarnega značaja pomembno vlogo aromatska AK ostanka Tyr in Trp (Killian in von Heijne, 2000). α-Sinuklein ne vsebuje Trp, ima pa 4 Tyr ostanke, od katerih se zdi najzanimivejši Tyr na poziciji 39, ki se nahaja v membransko-vezani N-terminalni regiji proteina (slika 3). Glede na EPR model vijačnega kolesa prvih 89 AK ostankov proteina (slika 9), se Tyr39 sicer nahaja na hidrofilni, k vodnemu okolju izpostavljeni strani amfipatične vijačnice (Jao in sod., 2008) in naj tako ne bi imel večje vloge pri interakciji z lipidno membrano. Vendar pa so poročali tudi o vstavitvi Tyr39 v bolj hidrofobno okolje NaDS micela (Bisaglia in sod., 2005) in o preprečitvi dostopa encima tirozinaze do Tyr39, ko je  $\alpha$ -sinuklein vezan na lipidne vezikle (Tessari in sod., 2008). Ker trenutno struktura membransko vezanega  $\alpha$ -sinukleina ni povsem jasna, saj so poročali o tvorbi dveh vijačnic na micelih ter o tvorbi tako prekinjene kot iztegnjene vijačnice na veziklih (Ulmer in sod., 2005; Jao in sod., 2008; Bortolus in sod., 2008; Drescher in sod., 2008; za podrobnosti glej 2.6.3), je težko dejansko predvideti morebitno vlogo Tyr39 pri interakciji. V prekinjeni vijačnici se Tyr39 namreč nahaja ravno v regiji prekinitve oz. zanke (slika 8) in bi tako lahko bila njegova vloga pri interakciji drugačna kot v primeru iztegnjene vijačnice. Predlagali so tudi, da Tyr39 prekinja predvideno 11/3 vijačnico α-sinukleina (Bussell in Eliezer, 2003). Ker C-terminalni del ob vezavi proteina z membrano ostane dinamičen in nestrukturiran v raztopini (Jao in sod., 2008; Ulmer in sod., 2005), bi pričakovali, da Tyr125, 133 in 136 nimajo bistvenega vpliva na interakcijo z membrano. Vendar pa so Sevcsik in sod. (2011) poročali, da oksidativne modifikacije Cterminalnih Tyr preko alosteričnih učinkov vplivajo na afiniteto proteina do membrane.

Mutanti Y39A in Y(125,133,136)A v primerjavi z WT  $\alpha$ -sinukleinom ne kažeta večjih razlik v tvorbi  $\alpha$ -vijačnice po interakciji proteina z vezikli (slike 33 - 37). Do nekolikšne strukturne heterogenosti je prišlo pri vezavi na anionske DPPG in POPG vezikle (slika 41), kar bi lahko pripisali spremembi intrinzičnih konformacijskih stanj proteina v raztopini. Vendar pa se učinek mutante Y39A na ureditveni parameter in termodinamske lastnosti DPPC:DPPG 1:1 (slika 48, 51) ter permeabilnost veziklov različne sestave (slika 50) ni razlikoval od učinka WT proteina. Tudi vpliv trojne Tyr mutante na permeabilizacijo POPG veziklov se ne razlikuje od učinka ostalih dveh proteinov (slika 50). Predvidevamo, da bi lahko do lokalnega odstopanja od vijačne strukture prišlo tudi zaradi manjših variacij v količini  $\alpha$ -sinukleina, saj je CD spektroskopija zelo občutljiva na koncentracijo proteina (Corrêa in Ramos, 2009). To bi lahko potrdila tudi *vice versa* diskrepanca med vezavo mutant na DPPG v tekoči neurejeni fazi in POPG, medtem ko WT protein kaže enakovredno znižanje [ $\theta$ ]<sub>220</sub> (slika 41).

Kot kaže, C-terminalni Tyr nimajo kritične vloge pri vezavi  $\alpha$ -sinukleina z lipidnim dvoslojem. To potrjuje tudi selektivna vezava  $\alpha$ -sinukleina na negativno nabite vezikle. C-terminalni del ima pri nevtralnem pH namreč močan negativni naboj, ki izvira iz 14 kislih AK ostankov in C-terminalne karboksi skupine (Eliezer, 2011). Tako je interakcija C-terminalnega dela z anionsko površino membrane pri nevtralnem pH malo verjetna. Predvidevamo pa tudi, da mutacija Tyr $\rightarrow$ Ala na poziciji 39 ne vpliva na interakcijo proteina z vezikli. To bi lahko sovpadalo z ugotovitvami, da je za interakcijo proteina z membrano

ključnih le prvih 25 N-terminalnih AK, ki predstavljajo nukleacijski center za tvorbo  $\alpha$ -vijačnice, nakar pride do kooperativnega zvitja preostalega 26 – 100 segmenta (Bodner in sod., 2010; Bartels in sod., 2010). Poleg tega so v nedavnih študijah, v katerih so z uporabo enojnih Trp mutant pokazali različno vstavljenost segmentov membransko vezanega  $\alpha$ -sinukleina, predlagali šibko stopnjo penetracije Tyr39, ki naj bi bil obrnjen proti vodnemu okolju (Wietek in sod., 2013; Jain in sod., 2013).

### 5.4.4 Interakcija α-sinukleina z gangliozidi

Na zunanji strani plazemske membrane se gangliozidi nahajajo predvsem v področju lipidih raftov (Fantini in sod., 2002). Gangliozida GM1 je veliko v nevronih (Hannson in sod., 1977), medtem ko je GM3 minorni možganski gangliozid, ki se nahaja v astrocitah (Asou in sod., 1989), vendar pa njegova zastopanost narašča s starostjo (Svennerholm in sod., 1994). Afiniteta  $\alpha$ -sinukleina do določenega gangliozida bi lahko imela pomembno vlogo v lokalizaciji, funkciji in/ali patogenezi proteina. Poročali so, da  $\alpha$ -sinuklein interagira z različnimi gangliozidi, vendar pa molekularni mehanizem interakcije ni pojasnjen.  $\alpha$ -Sinuklein je imel v primerjavi z GM3 mnogo večjo afiniteto do GM1 (Martinez in sod., 2007), vendar pa so z drugačnim eksperimentalnim pristopom pokazali ravno obraten trend in izpostavili vlogo Tyr39 pri interakciji (Fantini in Yahi, 2011).

Ob interakciji  $\alpha$ -sinukleina z gangliozidi se tvori vijačna struktura (Martinez in sod., 2007). Glede na rezultate CD spektroskopije (slika 52, 53) sklepamo, da  $\alpha$ -sinuklein specifično prepozna GM1, medtem ko je afiniteta do GM3 mnogo nižja. V slednjem primeru je do največjega znižanja [ $\theta$ ]<sub>220</sub> prišlo pri mešanici GM3 z DPPG v tekoči neurejeni fazi. Na osnovi primerjave z ekvimolarno mešanico DPPG z DPPC (s katerimi se protein ne veže) (slika 38) bi lahko sklepali tudi na šibko vezavo z GM3. Tudi povišana permeabilnost veziklov kaže na interakcijo proteina z vezikli (za razlago glej zgoraj). Oba gangliozida sta zaradi prisotnosti sialične kisline negativno nabita, razlikujeta pa se v številu sladkornih komponent (slika 10). Rezultati kažejo, da za tvorbo  $\alpha$ -vijačnice ne zadostuje le prisotnost karboksilne kisline v gangliozidu, ampak pride tudi do interakcije s sladkornimi komponentami. Poleg tega bi lahko prisotnost velike polarne glave GM1 znižala gostoto površinskega naboja membrane v primeru DPPG:GM1 v primerjavi s 100 % DPPG.

Kot kažejo rezultati (glej 5.4.3), Tyr39 nima signifikantne vloge pri interakciji  $\alpha$ -sinukleina z negativno nabito fosfolipidno membrano, lahko pa bi imel pomembno vlogo pri interakciji  $\alpha$ -sinukleina z gangliozidi (Fantini in Yahi, 2011). Ker pa v prisotnosti DPPC/DPPG:gangliozid vrednosti eliptičnosti pri 220 nm med  $\alpha$ -sinukleinom WT in Y39A kažejo analogen trend, sklepamo, da Tyr39 ni ključen za interakcijo proteina z gangliozidoma. To morda niti ni presenetljivo, če upoštevamo pomembnost Tyr39 predvsem pri interakciji z GM3 (Fantini in Yahi, 2011), ki pa je bila v našem primeru zelo šibka. Uporabili smo tudi drugačen lipidni model (močno ukrivljene SUV namesto planarnega monosloja), kar bi prav tako lahko vplivalo na način vezave. Ker se naši rezultati za preferenčno vezavo z GM1 skladajo z objavo, kjer so prav tako uporabili majhne vezikle (Martinez in sod., 2007), je možno, da topologija membranskega modela vpliva na konformacijo oz. dostopnost karboksilata sialične kisline in sladkornih skupin gangliozida.

### 5.5 INHIBICIJA FIBRILACIJE α-SINUKLEINA IN ZAŠČITA NEVRONOV

Trenutno za zdravljenje ali preprečevanje degeneracije dopaminergičnih celic pri PD in ostalih sinukleinopatijah ni na voljo učinkovitega zdravila. Etiologija Parkinsonove bolezni naj bi bila poleg fibrilacije α-sinukleina povezana tudi z oksidativnim stresom, ki ga povzročajo destruktivni učinki prostih radikalov (Schildknecht in sod., 2013; Beal, 2003). Spojine, ki inhibirajo fibrilacijo proteina in obenem kažejo antioksidativne lastnosti, so tako še posebej zanimive pri razvoju novih terapevtikov. Poročali so, da lahko polifenoli, ki predstavljajo integralni del humane prehrane, delujejo preventivno ali pa zaustavijo patogenezo PD (Di Giovanni, 2009). Prav tako so epidemiološke študije pokazale, da kajenje zniža dovzetnost za nastanek PD (Fratiglioni in Wang, 2000; Quik, 2004), ob čemer se izpostavlja predvsem potencialno pozitivna vloga nikotina.

Preverili smo, ali lahko štiri izbrane spojine, t.j. trije strukturno različni flavonoidi in alkaloid nikotin (slika 13), inhibirajo fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina in zaščitijo nevrone pred oksidativno poškodbo. Izmed flavonoidov smo izbrali kvercetin (Q), ki ga uvrščamo med flavonole, najpogostejše flavonoide v naši prehrani; epigalokatehin galat (EGCG), ki je predstavnik flavanolov in ga je veliko predvsem v pravem čaju, ter cianidin-3-glukozid (C3G), ki je predstavnik antocianinov in se nahaja v rdečem jagodičevju, še posebej v borovnicah. Z DPPH testom smo potrdili antioksidativno učinkovitost (AOU) vseh treh flavonoidov, medtem ko je pri N nismo zaznali (preglednica 7). Med flavonoidi se je kot najmočnejši antioksidant izkazal EGCG. Glede na strukturo testiranih spojin (slika 13) so ti rezultati pričakovani, saj k AOU, vsaj v primeru flavonoidov, prispeva predvsem število in razporeditev hidroksilnih skupin vezanih na fenilni obroč (Bors in sod., 1990; Di Carlo in sod., 1999), le-teh pa je največ v EGCG, medtem ko v alkaloidu nikotinu niso prisotne. Ker željeno tarčo delovanja izbranih spojin predstavlja možgansko tkivo, smo preverili tudi ali so sposobne prečkati model krvno-možganske pregrade, BBB (ang. blood-brain barrier). Po oralni administraciji so vse tri flavonoide v povišanih koncentracijah zaznali v krvni plazmi (Egert in sod., 2008; Mereles in Hunstein, 2011, Kay in sod., 2005). Naša skupina je tudi pokazala, da se Q in EGCG vežeta na BSA, ki je strukturno homologen človeškemu serumskemu albuminu, kar bi lahko kazalo na možen krvni transportni mehanizem teh flavonoidov (Skrt in sod., 2009).

Vsi trije flavonoidi (Q, EGCG, C3G) so vplivali na agregacijo  $\alpha$ -sinukleina in v času meritev (5 dni) popolnoma inhibirali tvorbo fibril (slika 55). Za EGCG in Q so že pokazali, da lahko zavreta fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina (Zhu in sod., 2013; Meng in sod., 2010; Ehrnhoefer in sod., 2008; Caruana in sod., 2011). Iz NaDS-PAGE gela nepovezanih in kemično povezanih proteinskih vzorcev po končani inkubaciji je razvidno, da vse tri spojine stabilizirajo predvsem neurejeno monomerno konformacijo proteina (slika 56B). Možno je, da takšna stabilizacija preprečuje konformacijske spremembe proteina, ki vodijo v nastanek delno zvitega intermediata in posledično preprečijo tvorbo fibrilacijskega nukleacijskega jedra. Poročali so, da naj bi bila strukturna zahteva za inhibitorni učinek flavonoidov prisotnost sosednjih hidroksifenilnih skupin, ne glede na katerem obroču se nahajajo (Meng in sod., 2009; Caruana in sod., 2011). Glede na to, da ima C3G, brez upoštevanja sladkorne komponente, podobno strukturo kot Q (slika 13), inhibitorni učinek ni presenetljiv. Seveda pa je potrebno poudariti, da molekularni mehanizem inhibicije fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina s flavonoidi ni pojasnjen. Tako ni znano, na katera mesta na proteinu se flavonoidi vežejo,

poleg tega pa so poročali tudi o učinkovitejši inhibiciji s strani oksidiranih produktov flavonoidov - kinonov, ki nastanejo med inkubacijo vzorcev (Meng in sod., 2009; Zhu in sod., 2013). C3G ima v primerjavi z ostalima flavonoidoma poleg glikozidne skupine, pri pH 7,0 tudi naboj, kar bi lahko dodatno prispevalo k drugačnemu mehanizmu stabilizacije proteina. Tudi iz akrilamidnega gela (slika 56B) je razvidno, da je porazdelitev oligomernih struktur med flavonoidi različna, saj je C3G stabiliziral tudi dimerno obliko, medtem ko so pri ostalih dveh flavonoidih na NaDS odporni samo višji oligomeri. Nasprotno od prejšnjih raziskav (Hong in sod., 2009; Ono in sod., 2007) pa nismo potrdili inhibitornega učinka nikotina (slika 55, 56B), in to kljub temu, da smo eksperimente izvedli pri zelo podobnih pogojih kot Hong in sod. (2009). Do odstopanj med posameznimi študijami bi sicer lahko prišlo zaradi heterogenega začetnega materiala ali možnih raznolikih agregacijskih poti (Fink, 2006). Po drugi strani pa se inhibitorni učinek EGCG in Q ni razlikoval od ostalih objav, tako da ostaja učinek N na fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina vprašljiv.

Nadalje smo ovrednotili možgansko dostopnost in sposobnost zaščite nevronov izbranih spojin. Ker bi se zaradi antioksidativnih lastnosti flavonoidi v obeh celičnih medijih, t.j. v Ringer-HEPES pH 7,4 (transport preko BBB (glej 4.6.2)) in mediju Neurobasal (zaščita nevronov (glej 4.6.4)), zlahka oksidirali, smo najprej preverili AOU in tudi stabilnost testiranih spojin v obeh kultivacijskih medijih. Inkubacija flavonoidov pri 37 °C ni znatno vplivala na njihovo AOU (slika 57), še posebej ne v prvih 6 h (to je v inkubacijskem času BBB eksperimentov), AOU pa smo v mediju Neurobasal zasledili do t = 48 h. Vendar pa se med inkubacijo v obeh rastnih medijih vsi trije flavonoidi zlahka razgradijo (slika 58), kar je v skladu z rezultati za druge polifenole v vodnih raztopinah (Zhou in sod., 2003; Jun, 2012). Izmed izbranih spojin je bil k degradaciji najbolj nagnjen EGCG, saj smo ga v Ringer-HEPES pH 7,4 zasledili samo še po 1 h. Zato smo pri EGCG namesto t = 6 h, kot v primeru Q in C3G, eksperimente transporta v BBB izvedli v 1 uri (glej 4.6.2). Kinetika razgradnje flavonoidov je bila v Ringer-HEPES pH 7,4 nekoliko počasnejša kot v Neurobasal. Izbira medija je pomembnejša v primeru testa z BBB, saj je nujno, da je testirana spojina obstojna v časovnem obdobju, potrebnem za ocenitev dejanskega transporta preko BBB monosloja. N je bil v obeh medijih zelo stabilen, zato smo v tem primeru BBB eksperiment podaljšali na 24 ur.

Prehajanje izbranih spojin skozi model BBB smo določili z uporabo celic HBMEC (Bernas in sod., 2010). Ta izvira iz humanih možganskih endotelijskih celic. Po naših podatkih je to prvi primer uporabe te linije za ovrednotenje transporta flavonoidov in N preko modela BBB. Podobne raziskave se sicer večinoma izvajajo na živalskih modelih (Faria in sod., 2010; Faria in sod., 2012) in šele v zadnjem času so uporabili tudi humane celične linije (Faria in sod., 2014). Rezultati kažejo, da lahko EGCG, C3G in N učinkovito prehajajo HBMEC monosloj in dosežejo *možgansko stran* BBB modela (slika 59). Najhitrejšo kinetiko prehoda je imel EGCG, sledi mu N, medtem ko je transport najpočasnejši pri C3G. Ti rezultati sovpadajo z ugotovitvami drugih študij, opravljenih na različnih BBB modelih z drugimi flavonoidi (Faria in sod., 2010; Faria in sod., 2010; Faria in sod., 2010; Karia in sod., 2010; Karia in sod., 2014). Pomembno je poudariti, da smo po vsakem eksperimentu preverili tudi integriteto modela BBB. Poleg meritve TEER (transendotelijske električne upornosti), ki se uporablja v drugih študijah, smo določili tudi transendotelijsko permeabilnost (prilogi G in H). Tako smo zavrgli vse možne lažno pozitivne rezultate. Kvercetin je imel med vsemi spojinami najbolj citotoksičen učinek in je pri višjih koncentracijah (več kot 10  $\mu$ M) poškodoval celice, ki tvorijo HBMEC. Hkrati smo

po opravljenem BBB eksperimentu Q zasledili v citoplazmi HBMEC celic (preglednica 8), kar kaže, da ta flavonoid vstopi v celice. Zato je možno, da visoke koncentracije Q motijo znotrajcelične procese, kar vodi v izgubo celic in poškodbo BBB. V notranjosti celic HBMEC smo zasledili tudi C3G, medtem ko EGCG in N nismo zaznali. To bi lahko bilo povezano s kinetiko prehajanja, saj tako EGCG kot N hitro prečkata monosloj in se ne zadržujeta v endotelijskih celicah. Fiziološke koncentracije izbranih spojin v humani plazmi naj bi po oralni ali intravenozni administraciji variirale med 1  $\mu$ M in 10  $\mu$ M (Ishisaka in sod., 2011; Lambert in sod., 2006; Miyazawa in sod., 1999). Kljub temu, da smo zaradi občutljivosti HPLC sistema in stabilnosti spojin (glej zgoraj) prilagodili koncentracije spojin, pa lahko naši rezultati predstavljajo zanesljive približke, saj smo v študiji zaščite nevronov uporabili 1  $\mu$ M koncentracije, ki bi verjetno lahko dosegle možganski parenhim brez poškodovanja BBB.

V manjših koncentracijah (1  $\mu$ M) so vse izbrane spojine (Q, EGCG, C3G in N) ščitile nevrone pred oksidativnim stresom (slika 60). Oksidativno-inducirano nekrozi-podobno nevronsko celično smrt najbolj zmanjšata EGCG in N (oba za ~40 %). Obe spojini sta tudi najbolj učinkoviti pri zaščiti nevronov pred apoptozi-podobno celično smrtjo (EGCG jo zmanjša za ~30 % in N za ~60 %). Q in C3G sta manj učinkovita, in sicer Q učinkoviteje zmanjša apoptozi-podobno celično smrt (za ~60 %), C3G pa le nekrozi-podobno celično smrt (za ~37 %). Ker se je med inkubacijo v obeh medijih AOU flavonoidov spremenila znatno manj kot njihova koncentracija (slika 57, 58), lahko sklepamo, da imajo določeno stopnjo AOU tudi nekateri razgradni produkti spojin. Tako znižanja stopnje s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducirane celične smrti po 48-urni inkubaciji ne moremo pripisati zgolj izbranim flavonoidom, ampak tudi (ali pa predvsem) njihovim razgradnim produktom. Ti so v mediju Neurobasal najverjetneje v velikih količinah prisotni že po 24-urni inkubaciji, ko smo inducirali oksidativni stres. V nekaterih študijah so predlagali, da so neposredni antioksidativni učinki polifenolov (t.j. lovljenje prostih radikalov) v možganih malo verjetni. Količine teh spojin so v primerjavi z endogenimi antioksidanti namreč prenizke (Halliwell, 2007). V soglasju s tem so naši rezultati za N, ki mu z DPPH testom nismo določili AOU (preglednica 7), a je v primerjavi s flavonoidi kazal večji nevroprotektivni učinek in močno zmanjšal apoptozi-podobno celično smrt celo v pogojih oksidativno inducirane celične smrti (slika 60). Druge študije kažejo tudi, da so antioksidanti z učinkovanjem na intrinzične apoptotične mehanizme sposobni zaščititi mitohondrijsko funkcijo (Schroeder in sod., 2009). To bi bil lahko tudi način delovanja spojin, ki nimajo AOU, kot je v našem primeru N.

Zaključimo lahko, da bi nekatere izmed preiskovanih naravnih spojin lahko bile zanimive kot možni novi terapevtski agensi. Najprej pa bi bilo potrebno natančno pojasniti njihov metabolizem v telesu, sposobnost *in vivo* doseganja možganov preko BBB ter mehanizme, ki so vpleteni v zaščito nevronov. Največji potencial za zaščito pred nevrotoksičnimi poškodbami, kot tudi za doseganje možganskega parenhima, imata EGCG in N, saj se oba učinkovito transportirata preko modela BBB brez poškodovanja monosloja HBMEC, nevrone pa zaščitita tudi pred oksidativno poškodbo. Nikotin v tobačnih izdelkih sicer povzroča zdravstvene težave, vendar pa ima v čisti obliki (administracija v obliki obližev) potencial za dragocen farmacevtski agens. Skupaj z rezultati inhibicije fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina pa lahko kot najboljšega kandidata izpostavimo EGCG, saj pri N nismo določili inhibitornega učinka.

# 6 SKLEPI

- $\circ$  α-Sinuklein in Tyr $\rightarrow$ Ala mutanti spremenijo sekundarno strukturo iz nativno nezvitega stanja v α-vijačnico ob vezavi na negativno nabite vezikle. Nevtralni vezikli na sekundarno strukturo nimajo vpliva.
- $\circ$  Do največje indukcije α-vijačnice pri α-sinukleinu in mutantih pride, ko se lipidi nahajajo v tekoči neurejeni fazi.
- $\circ$   $\alpha$ -Sinuklein se na negativno nabite vezikle veže z N-terminalnim delom. N-terminalni del se ob vezavi vsaj delno vstavi v membrano. Ob vezavi se inducira struktura  $\alpha$ -vijačnice.
- $\circ$  Poleg elektrostatskih interakcij imajo pri vezavi α-sinukleina na membrano pomembno vlogo tudi hidrofobne interakcije. Mehanizem vezave α-sinukleina na membrano je prvenstveno odvisen od neto naboja polarnih lipidnih glav, površinskega naboja lipidnega dvosloja ter faznega stanja, v katerem se lipidi nahajajo.
- o α-Sinuklein uredi lipidni dvosloj in membrano termično stabilizira.
- V nasprotju s pričakovanji Tyr ostanki, od katerih se Y39 nahaja v N-terminalni regiji in Y125, Y133 ter Y136 v C-terminalni regiji, nimajo pomembnejše vloge pri interakciji α-sinukleina z membrano.
- $\circ$  Tyr39 in C-terminalni Tyr ostanki imajo pomembno vlogo pri začetni stopnji fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina.
- $\circ$   $\alpha$ -Sinuklein se specifično veže na gangliozid GM1. Tyr39 nima večje vloge pri interakciji proteina z gangliozidom.
- $\circ$  Ob vezavi  $\alpha$ -sinukleina na negativno nabite vezikle v vsaj delno tekoči neurejeni fazi pride do permeabilizacije veziklov in s tem do sproščanja kalceina.
- $\circ$  Polifenolne spojine kvercetin, epigalokatehin galat in cianidin-3-glukozid inhibirajo proces fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina *in vitro*. Alkaloid nikotin ne inhibira fibrilacije proteina. Do inhibicije pride predvsem zaradi stabilizacije monomerne oblike proteina.
- Epigalokatehin galat in nikotin učinkovito prehajata modelno krvno-možgansko pregrado in zaščitita primarno nevronsko kulturo pred induciranim oksidativnim stresom.

# 7 POVZETEK (SUMMARY)

#### 7.1 POVZETEK

 $\alpha$ -Sinuklein je majhen nativno nezvit presinaptični protein, ki je v agregirani obliki prisoten inkluzijah pri Parkinsonovi bolezni in pri možganskih številnih drugih V nevrodegenerativnih stanjih. Določene mutacije v α-sinukleinskem genu so povezane z zgodnjim pojavom bolezni. Vzrok za patogenezo α-sinukleina ni znan, predvidevajo pa, da je toksičnost proteina povezana z njegovo agregacijo in/ali fibrilacijo. Prav tako ni poznana natančna fiziološka funkcija proteina, vendar pa močni dokazi kažejo, da ima protein vlogo v sinaptični plastičnosti in prenosu nevrotransmiterja. Tako fiziološka kot patološka vloga  $\alpha$ -sinukleina pa naj bi vključevali vezavo proteina z lipidnimi membranami. Do sedaj so številne študije raziskovale interakcijo med  $\alpha$ -sinukleinom in membranami, vendar pa molekularni mehanizem vezave ostaja nepojasnjen.

Pri našem delu smo preučevali interakcijo nativnega rekombinantnega α-sinukleina in Y39A ter Y(125,133,136)A mutantov z modelnimi lipidimi membranami. S cirkularnim dihroizmom smo potrdili spremembo sekundarne strukture iz nativno nezvitega stanja v amfipatično α-vijačnico v prisotnosti negativno nabitih majhnih unilamelarnih veziklov. Do indukcije največjega deleža vijačnice je prišlo, ko se lipidi v lipidnem dvosloju nahajajo v tekoči neurejeni fazi. Protein se z N-terminalnim delom adsorbira le na površino negativno nabitih veziklov in ne asocira z nevtralnimi lipidi. Ob vezavi α-sinukleina na negativno nabite vezikle v vsaj delno tekoči neurejeni fazi pride do permeabilizacije veziklov. Sklepamo, da so za vezavo proteina z membrano pomembne tako elektrostatske kot hidrofobne interakcije. Z merjenjem fluorescenčne anizotropije in z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo pokazali, da se N-terminalni del po vezavi vsaj delno vstavi v membrano ter vpliva na ureditveni parameter lipidnega dvosloja. Sklepamo, da je mehanizem vezave α-sinukleina na membrano prvenstveno odvisen od neto naboja polarnih lipidnih glav, gostote površinskega naboja ter faznega stanja v katerem se lipidi nahajajo. Predvidevamo, da ima α-sinuklein ureditveno funkcijo in termično stabilizira vezikle. Sklepamo, da Nterminalni in C-terminalni tirozinski ostanki nimajo večje vloge pri interakciji proteina z membranami. Pokazali smo, da se a-sinuklein specifično veže na gangliozid GM1. Sklepamo, da Tyr39 nima večje vloge pri interakciji proteina z gangliozidom.

Kljub temu, da se zdi vloga tirozinskih ostankov pri interakciji  $\alpha$ -sinukleina z membrano manj pomembna, pa v primerjavi z nativnim proteinom Y39A in Y(125,133,136)A mutanta kažeta počasnejšo kinetiko fibrilacije in povišano hidrofobnost ob sestavljanju fibrilam-podobnih struktur. Predvidevamo, da imajo tako N-terminalni kot C-terminalni tirozin(i) pomembno funkcijo pri začetnih stopnjah fibrilacije proteina.

Trenutno za zdravljenje Parkinsonove bolezni ni na voljo učinkovitega zdravila. Etiologija bolezni naj bi bila poleg fibrilacije  $\alpha$ -sinukleina povezana tudi z oksidativnim stresom. Spojine, ki inhibirajo fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina in delujejo antioksidativno, se zdijo še posebej primerne za razvoj novih terapevtikov. Pokazali smo, da v nasprotju z nikotinom, flavonoidi kvercetin, epigalokatehin galat in cianidin-3-glukozid inhibirajo fibrilacijo  $\alpha$ -sinukleina *in vitro*. Epigalokatehin galat in nikotin tudi učinkovito prečkata modelno krvno-možgansko pregrado in zaščitita primarno nevronsko kulturo pred induciranim oksidativnim stresom.

### 7.2 SUMMARY

 $\alpha$ -Synuclein is a small natively unfolded presynaptic protein which, in its aggregated form, is present in the brain in Parkinson's disease and numerous other neurodegenerative conditions. Certain mutations in the  $\alpha$ -synuclein gene are associated with early-onset of the disease. The cause for the  $\alpha$ -synuclein pathogenesis is yet unknown, however, it is predicted that the protein toxicity is associated with the aggregation and/or fibrillation. Also the exact physiological function of the protein remains unknown; however, strong evidence indicates that the protein has a role in synaptic plasticity and the neurotransmitter transmission. Both physiological and pathological role of the  $\alpha$ -synuclein seem to include binding of the protein with the lipid membranes. So far many studies have investigated  $\alpha$ -synuclein-membrane interaction; however, the molecular mechanism of the binding remains unclear.

The present study investigates the interaction of native recombinant  $\alpha$ -synuclein and Y39A and Y(125,133,136)A mutants with model lipid membranes. The circular dichroism measurements confirmed the change in secondary structure from the natively unfolded to the amphipathic  $\alpha$ -helix in the presence of negatively charged small unilamellar vesicles. Lipids in liquid disordered phase induced the largest increase in helical structure. N-terminal part of the protein adsorbs onto the surface of negatively charged vesicle, but does not associates with neutral lipids. Binding of  $\alpha$ -synuclein to negatively charged vesicles in at least partially disordered phase induces vesicle permeabilisation. These results indicate that in addition to electrostatic interaction, hydrophobic interactions are also important in the association of a-synuclein with membranes. Using fluorescence anisotropy measurements and differential scanning calorimetry, we have shown that the N-terminal part of the protein at least partially inserts into the membrane and affects the order parameter of the lipid bilayer. We suggest that the mechanism of  $\alpha$ -synuclein binding to the membrane is primarily dependent on the net charge of the polar lipid heads, the density of surface charge and the lipid phase. We propose that  $\alpha$ -synuclein has an ordering function and thermally stabilizes vesicles. The N-terminal and C-terminal tyrosine residues seem not to have a greater role in the protein-membrane interaction. We have shown that  $\alpha$ -synuclein interacts with ganglioside GM1. We conclude that Tyr39 does not have a significant role in the interaction of the protein with ganglioside.

Although it seems that the Tyr residues are not crucial for  $\alpha$ -synuclein-lipid interaction, in comparison to the native protein both mutants, Y39A and Y(125,133,136)A, show delayed onset of fibrillation and exhibit increased hydrophobicity during fibril-like structures assembly. We assume that both N-terminal and C-terminal tyrosine(s) have an important role in the early stages of protein fibrillation.

Currently, there is no effective drug for the treatment of Parkinson's disease. Besides  $\alpha$ -synuclein fibrillation the etiology of the disease seem to involve oxidative stress. Compounds that inhibit  $\alpha$ -synuclein fibrillation and possess antioxidant properties seem particularly suitable for the development of new therapeutics. We have shown that, in contrast to nicotine, flavonoids quercetin, epigallocatechin gallate, and cyanidin-3-glucoside inhibit  $\alpha$ -synuclein fibrillation *in vitro*. Epigallocatechin gallate and nicotine are also

efficient in crossing the blood-brain barrier and protect primary neuronal culture against induced oxidative stress.

#### **8 VIRI**

- Abeliovich A., Schmitz Y., Farinas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. 2000. Mice lacking alphasynuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system, Neuron, 25: 239-252
- Ahmad B., Chen Y., Lapidus L.J. 2012. Aggregation of α-synuclein is kinetically controlled by intramolecular diffusion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109: 2336-2341
- Alderson T.R., Markley J.L. 2013. Biophysical characterization of α-synuclein and its controversial structure. Intrinsically Disordered Proteins, 1, 1: 18-39
- Allison J.R., Varnai P., Dobson C.M., Vendrusculo M. 2009. Determination of the free energy landscape of alpha-synuclein using spin label nuclear magnetic resonance measurments. Journal of American Chemical Society, 131: 18314-18326
- Alvarez-Erviti L., Seow Y., Schapira A.H., Gardiner C., Sargent I.L., Wood M.J., Cooper J.M. 2011. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated α-synuclein release and transmission. Neurobiology of Disease, 42: 360-367
- Antonny B. 2011. Mechanisms of membrane curvature sensing. Annular Review of Biochemistry, 80: 101-123
- Apetri M.M., Maiti N.C., Zagorski M.G., Carey P.R., Anderson V.E. 2006. Secondary structure of α-synuclein oligomers: Characterization by Raman and atomic force microscopy. Journal of Molecular Biology, 355: 63-71
- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell C., Encarnacion M., Sherman H., Yu I., Shah B., Weir D., Thompson C., Szu-Tu C., Trinh J., Aasly J.O., Rajput A., Rajput A.H., Jon Stoessl A., Farrer M.J. 2013. Alphasynuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. Movement Disorders, 28, 6: 811-813
- Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E.S., Segal M.R., Finkbeiner S. 2004. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. Nature, 431: 805-810
- Asou H., Hirano S., Uyemura K. 1989. Ganglioside composition of astrocytes. Cell Structure and Function, 14: 561-568
- Atkins P., de Paula J. 2006. Physical chemistry for the life sciences. NewYork, W.H. Freeman and Company: 699 str.
- Auluck P.K., Caraveo G., Lindquist S. 2010. α-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 26: 211-233
- Barbour R., Kling K., Anderson J.P., Banducci K., Cole T., Diep L., Fox M., Goldstein M., Soriano F., Seubert P., Chilcote T.J. 2008. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. Neurodegenerative Diseases, 5, 2: 55-59
- Bartels T., Ahlstrom L.S., Leftin A., Kamp F., Haass C., Brown M.F., Beyer K. 2010. The N-terminus of the intrinsically disordered protein alpha-synuclein triggers membrane binding and helix folding. Biophysical Journal, 99, 7: 2116-2124
- Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J. 2011. α-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. Nature, 477: 107-110
- Beal M.F. 2003. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. Annals of the New York Academy of Sciences, 991: 120-131
- Bendor J.T., Logan T.P., Edwards R.H. 2013. The function of α-synuclein. Neuron, 79, 6: 1044-1066
- Bernas M.J., Cardoso F.L., Daley S.K., Weinand M.E., Campos A.R., Ferreira A.J.; Hoying J.B., Witte M.H., Brites D., Persidsky Y., Ramirez S.H., Brito M.A. 2010. Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an *in vitro* cellular model of the blood-brain barrier. Nature Protocols, 5, 7: 1265-1272
- Bertoncini C.W., Jung Y.S., Fernandez C.O., Hoyer W., Griesinger C., Jovin T.M., Zweckstetter M. 2005. Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured α-synuclein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 1430-1435
- Betarbet R., Canet-Aviles R.M., Sherer T.B., Mastroberardino P.G., McLendon C., Kim J.H., Lund S., Na H.M., Taylor G., Bence N.F., Kopito R., Seo B.B., Yagi T., Yagi A., Klinefelter G., Cookson M.R., Greenamyre JT. 2006. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. Neurobiology of Disease, 22: 404-420

- Beyer K. 2007. Mechanistic aspects of Parkinson's disease: alpha-synuclein and the biomembrane. Cell Biochemistry and Biophysics, 47, 2: 285-299
- Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. 2009. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to the surface of β-rich peptide self-assemblies. Journal of Molecular Biology, 385: 1052-1063
- Biancalana M., Koide S. 2010. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 1804: 1405-1412
- Bieschke J., Russ J., Friedrich R.P., Ehrnhoefer D.E., Wobst H., Neugebauer K., Wanker E.E. 2010. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid beta fibrils and reduces cellular toxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107: 7710-7715
- Binolfi A., Theillet F.X., Selenko P. 2012. Bacterial in-cell NMR of human α-synuclein: a disordered monomer by nature? Biochemical Society Transactions, 40: 950-954
- Bisaglia M., Tessari I., Pinato L., Bellanda M., Giraudo S., Fasano M., Bergantino E., Bubacco L., Mammi S. 2005. A topological model of the interaction between α-synuclein and sodium dodecyl sulfate micelles. Biochemistry, 44, 1: 329-339
- Bodles A.M., Guthrie D.J., Greer B., Irvine G B. 2001. Identification of the region of non-A beta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. Journal of Neurochemistry, 78, 2: 384-395
- Bodner C.R., Dobson C.M., Bax A. 2009. Multiple tight phospholipid-binding modes of α-synuclein revealed by solution NMR spectroscopy. Journal of Molecular Biology, 390: 775-790
- Bodner C.R., Maltsev A.S., Dobson C.M., Bax A. 2010. Differential phospholipid binding of alpha-synuclein variants implicated in Parkinson's disease revealed by solution NMR spectroscopy. Biochemistry, 49: 862-871
- Bolognesi B., Kumita J.R., Barros T.P., Esbjorner E.K., Luheshi L.M., Crowther D.C., Wilson M.R., Dobson C.M., Favrin G., Yerbury J.J. 2010. ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. ACS Chemical Biology, 5: 735-740
- Borbat P., Ramlall T.F., Freed J.H., Eliezer D. 2006. Inter-helix distances in lysophospholipid micelle-bound α-synuclein from pulsed ESR measurements. Journal of the American Chemical Society, 128: 10004-10005
- Borghi R., Marchese R., Negro A., Marinelli L., Forloni G., Zaccheo D., Abbruzzese G., Tabaton M. 2000. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. Neuroscience Letters, 287: 65-67
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radicalscavenging efficiencies. Methods in Enzymology, 186: 343-355
- Bortolus M., Tombolato F., Tessari I., Bisaglia M., Mammi S., Bubacco L., Ferrarini A., Maniero A.L. 2008. Broken helix in vesicle and micelle-bound alpha-synuclein: Insights from site-directed spin labeling-EPR experiments and MD simulations. Journal of the American Chemical Society, 130, 21: 6690-6691
- Breydo L., Wu J.W., Uversky V.N. 2012. α-Synuclein misfolding and Parkinson's disease. Biochimica et Biophysica Acta, 1822: 261-285
- Brown D.A., London E. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes, Annual Review of Cell and Developmental Biology, 14: 111-136
- Budai M., Szabo Z., Szogyi M., Grof P. 2003. Molecular interactions between DPPC and morphine derivatives: a DSC and EPR study. International Journal of Pharmaceutics, 250, 1: 239-250
- Büeler H. 2009. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. Experimental Neurology, 218: 235-246
- Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Südhof T.C. 2010. α-Synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. Science, 329, 5999: 1663-1667
- Burré J., Vivona S., Diao J., Sharma M., Brunger A.T., Südhof T.C. 2013. Properties of native brain αsynuclein. Nature, 498: E4–E6
- Bussell R., D. Eliezer. 2001. Residual structure and dynamics in Parkinson's disease associated mutants of alpha-synuclein. Chemistry, 276: 45996-46003
- Bussell R., Eliezer D. 2003. A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. Journal of Molecular Biology, 329, 4: 763-778
- Bussell R., Eliezer D. 2004. Effects of Parkinson's disease-linked mutations on the structure of lipid-associated alpha-synuclein. Biochemistry, 43: 4810-4818
- Bussell R., Ramlall T.F., Eliezer D. 2005. Helix periodicity, topology, and dynamics of membrane-associated alpha-synuclein. Protein Science, 14, 4: 862-872

- Butterfield S.M., Lashuel H.A. 2010. Amyloidogenic protein-membrane interactions: Mechanistic insight from model systems. Angewandte Chemie International Edition, 49, 33: 5628-5654
- Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D., Cole N.B., Gottschalk W., McIlwain K.L., Orrison B., Chen A., Ellis C.E., Paylor R., Lu B., Nussbaum R.L. 2002. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α-synuclein. Journal of Neuroscience, 22: 8797-8807
- Campioni S., Mannini B., Zampagni M., Pensalfini A., Parrini C., Evangelisti E., Relini A., Stefani M., Dobson C.M., Cecchi C., Chiti F. 2010. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. Nature Chemical Biology, 6: 140-465
- Campos-Esparza R., Torres-Ramos M.A. 2010. Neuroprotection by natural polyphenols: molecular mechanisms. Central Nervous System Agents, 10, 4: 269-277
- Cardoso F.L., Brites D., Brito M.A. 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. Brain Research Reviews, 64, 2: 328-363
- Caruana M., Högen T., Levin J., Hillmer A., Giese A., Vassallo N. 2011. Inhibition and disaggregation of alpha-synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. FEBS Letters, 585: 1113-1120
- Chandra S., Chen X.C., Rizo J., Jahn R., Sudhof T.C. 2003. A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. Journal of Biological Chemistry, 278: 15313-15318
- Chandra S., Fornai F., Kwon H.B., Yazdani U., Atasoy D., Liu X., Hammer R.E., Battaglia G., German D.C., Castillo P.E., Südhof T.C. 2004. Double-knockout mice for α-and β-synucleins: effect on synaptic functions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: 14966-14971
- Chandra S., Gallardo G., Fernandez-Chacon R., Schluter O.M., Sudhof T.C. 2005. α-Synuclein cooperates with CSPα in preventing neurodegeneration. Cell, 123: 383-396
- Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destee A. 2004. Alphasynuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. Lancet, 364, 9440: 1167-1169
- Chen Y.H., Yang J.T., Martinez H.M. 1972. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. Biochemistry, 11, 22: 4120-4131
- Chinta S.J., Mallajosyula J.K., Rane A., Andersen J.K. 2010. Mitochondrial α-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy *in vivo*. Neuroscience Letters, 486: 235-239
- Choi W., Zibaee S., Jakes R., Serpell L.C., Davletov B., Crowther R.A., Goedert M. 2004. Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. FEBS Letters, 576, 3: 363-368
- Chu Y.P., Kordower J.H. 2007. Age-associated increases of α-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? Neurobiology of Disease, 25: 134-149
- Cloe A.L., Orgel J.P.R.O., Sachleben J.R., Tycko R., Meredith S.C. 2011. The Japanese mutant A $\beta$  ( $\Delta$ E22-A  $\beta$ 1-39) forms fibrils instantaneously, with low-thioflavin T fluorescence: Seeding of wild-type A $\beta$ 1-40 into atypical fibrils by  $\Delta$ E22-A $\beta$ 1-39. Biochemistry, 50: 2026-2039
- Cole N.B., Murphy D.D., Grider T., Rueter S., Brasaemle D., Nussbaum R.L. 2002. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. Journal of Biological Chemistry, 277, 8: 6344-6352
- Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. 1998. Accelerated *in vitro* fibril formation by a mutant α-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. Nature Medicine, 4: 1318-1320
- Conway K.A., Lee S.J., Rochet J.C., Ding T.T. Williamson R.E., Lansbury P T. 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to earlyonset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 2: 571-576
- Cookson M.R. 2009. α-Synuclein and neuronal cell death. Molecular Neurodegeneration, 4: 9, doi:10.1186/1750-1326-4-9: 14 str.
- Cooper A.A., Gitler A.D., Cashikar A., Haynes C.M., Hill K.J., Bhullar B., Liu K., Xu K., Strathearn K.E., Liu F., Cao S., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Marsischky G., Kolodner R.D., LaBaer J., Rochet J.C., Bonini N.M., Lindquist S. 2006. α-Synuclein blocks ER-golgi trafficand Rab1 rescues neuron lossin Parkinson'smodels. Science, 313, 5785: 324-328
- Corrêa D.H.A., Ramos C.H.I. 2009. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. African Journal of Biochemistry Research, 3, 5: 164-173

- Cremades N., Cohen S. L., Deas E., Abramov A.Y., Chen A.Y., Orte A., Sandal M., Clarke R.W., Dunne P., Aprile F.A., Bertoncini C.W., Wood N.W., Knowles T.P.J., Dobson C.M., Klenerman D. 2012. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α-synuclein. Cell, 149: 1048-1059
- Crowther R.A., Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M. 1998. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated α-synuclein. FEBS Letters, 436, 3: 309-312
- Cui H.S., Lyman E., Voth G.A. 2011. Mechanism of membrane curvature sensing by amphipathic helix containing proteins. Biophysical Journal, 100: 1271-1279
- Cukalevski R., Boland B., Frohm B., Thulin E., Walsh D., Linse S. 2012. Role of aromatic side chains in amyloid β-protein aggregation. ACS Chemical Neuroscience, 3, 12: 1008-1016
- D'Archivio M., Filesi C., Varì R., Scazzocchio B., Masella R. 2010. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. International Journal of Molecular Sciences, 11, 4: 1321-1342
- Danzer K.M., Haasen D., Karow A.R., Moussaud S., Habeck M., Giese A., Kretzschmar H., Hengerer B., Kostka M. 2007. Different species of a-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. Jornal of Neurosciece, 27: 9220-9232
- Danzer K.M., Kranich L.R., Ruf W.P., Cagsal-Getkin O., Winslow A.R., Zhu L., Vanderburg C.R., McLean P.J. 2012. Exosomal cell-to-cell transmission of α-synuclein oligomers. Molecular Neurodegeneration, 7: 42, doi:10.1186/1750-1326-7-42: 18 str.
- Dauer W., Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron, 39: 889-909
- Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., Georges J.M. 1998. Stabilization of α-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. Journal of Biological Chemistry, 273, 15: 9443-9449
- Dedmon M.M., Lindorff-Larsen K., Christodoulou J., Vendruscolo M., Dobson C.M. 2005. Mapping longrange interactions in α-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. Journal of the American Chemical Society, 127: 476-477
- Del Tredici K., Braak H. 2012. Spinal cord lesions in sporadic Parkinson's disease. Acta Neuropathologica, 124: 643-664
- Deleersnijder A., Gerard M., Debyser Z., Baekelandt V. 2013. The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? Trends in Molecular Medicine, 19, 6: 368-377
- Deli M.A., Ábrahám C.S., Kataoka Y., Niwa M. 2005. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology. Cellular and Molecular Neurobiology, 25, 1: 59-127
- Desplats P., Lee H.J., Bae E.J., Patrick C., Rockenstein E., Crews L., Spencer B., Masliah E., Lee S.J. 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 31: 13010-13015
- Dettmer U., Newman A.J., Luth E.S., Bartels T., Selkoe D. 2013. *In vivo* cross-linking reveals principally oligomeric forms of α-synuclein and β-synuclein in neurons and non-neural cells. Journal of Biological Chemistry, 288: 6371-6385
- Dev K.K., Hofele K., Barbieri S., Buchman V.L., van der Putten H. 2003. Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. Neuropharmacology, 45: 14-44
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences, 65, 4: 337-353
- Di Giovanni G. 2009. A diet for dopaminergic neurons? Journal of Neural Transmission Supplementa, 73: 317-331
- Di Pasquale E., Fantini J., Chahinian H., Maresca M., Taieb N., Yahi N. 2010. Altered ion channel formation by the Parkinson's-disease-linked E46K mutant of alpha-synuclein is corrected by GM3 but not by GM1 gangliosides. Journal of Molecular Biology, 397, 1: 202-218
- Dikyl I., Eliezer D. 2012. Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. Biochimica et Biophysica Acta, 1818: 1013-1018
- Ding T.T., Lee S.J., Rochet J.C., Lansbury P.T. 2002. Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. Biochemistry, 41: 10209-10217
- Dobson C.M. 1999. Protein misfolding, evolution and disease. Trends in Biochemical Sciences, 24: 329-332
- Drescher M., Veldhuis G., van Rooijen B.D., Milikisyants S., Subramaniam V., Huber M. 2008. Antiparallel arrangement of the helices of vesicle-bound alpha-synuclein. Journal of the American Chemical Society, 130, 25: 7796-7797
- Drin G., Antonny B. 2010. Amphipathic helices and membrane curvature. FEBS Letters, 584, 9: 1840-1847
- Drin G., Casella J.F., Gautier R., Boehmer T., Schwartz T. U., Antonny B. 2007. A general amphipathic αhelical motif for sensing membrane curvature. Nature Structural & Molecular Biology, 14: 138-146

- Dunker A.K., Lawson J.D., Brown C.J., Williams R.M., Romero P., Oh J.S., Oldfield C.J., Campen A.M., Ratliff C.R., Hipps K.W., Ausio J., Nissen M.S., Reeves R., Kang C.H., Kissinger C.R., Bailey R.W., Griswold M.D., Chiu M., Garner E.C., Obradovic Z. 2001. Intrinsically disordered protein. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 19, 1: 26-59
- Dusa A., Kaylor J., Edridge S., Bodner N., Hong D.P., Fink A.L. 2006. Characterization of oligomers during α-synuclein aggregation using intrinsic tryptophan fluorescence. Biochemistry, 45: 2752-2760
- Egert S., Wolffram S., Bosy-Westphal A., Boesch-Saadatmandi C., Wagner A.E., Frank J., Rimbach G., Mueller M.J. 2008. Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. Journal of Nutrition, 138, 9: 1615-1621
- Ehrnhoefer D.E., Bieschke J., Boeddrich A., Herbst M., Masino L., Lurz R., Engemann S., Pastore A., Wanker E.E. 2008. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. Natur Structural & Molecular Biology, 15, 6: 558-566
- El-Agnaf O. M., Salem S.A., Paleologou K.E., Curran M.D., Gibson M.J., Court J.A., Schlossmacher M.G., Allsop D. 2006. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. FASEB Journal, 20: 419-425
- El-Agnaf O.M.A., Jakes R., Curran M.D., Middelton D., Ingenito R., Bianchi E., Pessi A., Neill D., Wallace A. 1998. Aggregates from mutant and wild-type α-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of β-sheet and amyloid-like filaments. FEBS Letters, 440, 1-2: 71-75
- Eliezer D. 2011. The mysterious C-terminal tail of alpha-synuclein: Nanobody's guess. Journal of Molecular Biology, 425: 2393-2396
- Eliezer D., Kutluay E., Bussell R., Browne G. 2001. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. Journal of Molecular Biology, 307, 4: 1061-1073
- Ellis C.E., Murphy E.J., Mitchell D.C., Golovko M.Y., Scaglia F., Barcelo-Coblijn G.C., Nussbaum R.L. 2005. Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. Molecular and Cellular Biology, 25: 10190-10201
- Fantini J., Garmy N., Mahfoud R., Yahi N. 2002. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. Expert Reviews in Molecular Medicine, 4: 1-22
- Fantini J., Carlus D., Yahi N. 2011. The fusogenic tilted peptide (67-78) of α-synuclein is a cholesterol binding domain. Biochimica et Biophysica Acta, 1808, 10: 2343-2351
- Fantini J., Yahi N. 2011. Molecular basis for the glycosphingolipid-binding specificity of α-synuclein: key role of tyrosine 39 in membrane insertion. Journal of Molecular Biology, 408, 4: 654-669
- Faria A., Pestana D., Teixeira D., Azevedo J., Freitas V., Mateus N., Calhau C. 2010. Flavonoid transport across RBE4 cells: A blood-brain barrier model. Cellular & Molecular Biology Letters, 15, 2: 234-241
- Faria A., Mateus N., Calhau C. 2012. Flavonoid transport across blood-brain barrier: Implication for their direct neuroprotective actions. Nutrition and Aging, 1: 89-97
- Faria A., Meireles M., Fernandes I., Santos-Buelga C.M., Gonzalez-Manzano S., Duenas M., de Freitas V., Mateus N., Calhau C. 2014. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. Food Chemistry, 149: 190-196
- Farrer M.J. 2006. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. Nature Reviews Genetics, 7: 306-318
- Fauvet B., Mbefo M.K., Fares M.B., Desobry C., Michael S., Ardah M.T., Tsika E., Coune P., Prudent M., Lion N., Eliezer D., Moore D.J., Schneider B., Aebischer P., El-Agnaf O.M., Masliah E., Lashuel H.A. 2012a. Alpha-synuclein in the central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells and E. coli exists predominantly as a disordered monomer. Journal of Biological Chemistry, 287, 19:15345-15364
- Fauvet B., Fares M.B., Samuel F., Dikiyl I., Tandon A., Eliezer D., Lashuel H.A. 2012b. Characterization of semisynthetic and naturally Nα-acetylated α-synuclein *in vitro* and in intact cells: implications for aggregation and cellular properties of α-synuclein. Journal of Biological Chemistry, 287: 28243-28262
- Fernandez-Escamilla A.M., Rousseau F., Schymkowitz J., Serrano L. 2004. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. Nature Biotechnology, 22, 10: 1302-1306
- Ferreon A.C.M., Gambin Y., Lemke E.A., Deniz A.A. 2009. Interplay of alpha-synuclein binding and conformational switching probed by single-molecule fluorescence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 14: 5645-5650
- Fink A.L. 2005. Natively unfolded proteins. Current Opinion in Structural Biology, 15, 1: 35-41
- Fink, A.L. 2006. The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. Accounts of Chemical Research, 39, 9: 628-634

- Fortin D.L., Troyer M.D., Nakamura K., Kubo S., Anthony M.D., Edwards R.H. 2004. Lipid rafts mediate the synaptic localization of α-synuclein. Journal of Neuroscience, 24, 30: 6715-6723
- Fraga C.G. 2007. Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. Life, 59: 308-315
- Fratiglioni L., Wang H.X. 2000. Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. Behavioural Brain Research, 113: 117-120
- Fredenburg R.A., Rospigliosi C., Meray R.K., Kessler J.C., Lashuel H.A., Eliezer D., Lansbury P.T. 2007. The impact of the E46K mutation on the properties of α-synuclein in its monomeric and oligomeric states. Biochemistry, 46: 7107-7118
- Frimpong A.K., Abzatimov R.R., Uversky V.N., Kaltashov I.A. 2010. Characterization of intrinsically disordered proteins with electrospray ionization mass spectrometry: Conformational heterogeneity of αsynuclein. Proteins, 78: 714-722
- Gandhi, S., Abramov A.Y. 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012: 1-11
- García-Montes J.-R., Boronat-García A., Drucker-Colín R. 2012. Pharmacological strategies for Parkinson's disease. Health, 4: 1153-1166
- Gaugler M.N., Genc O., Bobela W., Mohanna S., Ardah M.T., El-Agnaf O.M., Cantoni M., Bensadoun J.C., Schneggenburger R., Knott G.W., Aebischer P., Schneider B.L. 2012. Nigrostriatal overabundance of α-synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. Acta Neuropathologica, 123: 653-669
- Gazit E. 2002. A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. FASEB Journal, 16: 77-83
- George J.M. 2002. The synucleins. Genome Biology, 3, 1: 3002.1-3002.6
- George J.M., Jin H., Woods W.S., Clayton D.F. 1995. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. Neuron, 15, 2: 361-372
- Georgieva E.R., Ramlall T.F., Borbat P.P., Freed H., Elizer D. 2008. Membrane-bound α-synuclein forms an extended helix: long distance pulsed ESR measurments using vesicles, bicelles, and rod like micelles. Journal of American Chemical Society, 130, 39: 12856-12857
- Georgieva E.R., Ramlall T.F., Borbat P.P., Freed J.H., Eliezer D. 2010. The lipid-binding domain of wild type and mutant alpha-synuclein: compactness and interconversion between the broken and extended helix forms. Journal of Biological Chemistry, 285, 36: 28261-28274
- Giasson B.I., Uryu K., Trojanowski J.Q., Lee V.M. 1999. Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies *in vitro*. Journal of Biological Chemistry, 274: 7619-7622
- Giasson B.I., Murray I.V.J., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. 2001. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of α-synuclein is essential for filament assembly. Journal of Biological Chemistry, 276: 2380-2386
- Giehm L., Svergun D.I., Otzen D.E., Vestergaard B. 2011. Low-resolution structure of a vesicle disrupting α-synuclein oligomer that accumulates during fibrillation Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108: 3246-3251
- Gitler A.D., Bevis B.J., Shorter J., Strathearn K.E., Hamamichi S., Su L.J., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Rochet J.C., McCaffery J.M., Barlowe C., Lindquist S. 2008. The Parkinson's disease protein α-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105: 145-150
- Glabe C.G. 2008. Structural classification of toxic amyloid oligomers. Journal of Biological Chemistry, 283: 29639-29643
- Goedert M. 2001. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. Nature Reviews Neuroscience, 2, 7: 492-501
- Goedert, M., Spillantini M.G., Del Tredici K., Braak H. 2013. 100 years of Lewy pathology. Nature Reviews Neurology, 9, 1: 13-24
- Goñi F.M., Alonso A. 2006. Differential scanning calorimetry in the study of lipid structures.V: Chemical biology: Techniques and applications. Larijani B., Rosser C.A., Woscholski R. (eds.). Chichester, John Wiley&Sons: 47-66
- Gosavi N., Lee H.J., Lee J.S., Patel S., Lee S.J. 2002. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. Journal of Biological Chemistry, 277: 48984-48992

- Greenbaum E.A., Graves C.L., Mishizen-Eberz A.J., Lupoli M.A., Lynch D.R., Englander S.W., Axelsen P.H., Giasson B.I. 2005. The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. Journal of Biological Chemistry, 280: 7800-7807
- Greenfield N.J. 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nature Protocols, 1: 2876-2890
- Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A.M., Nie E.H., Makani S., Tian N., Castillo P.E., Buchman V.L., Chandra S.S. 2010. αβγ-Synuclein triple knockout mice reveal agedependent neuronal dysfunction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107: 19573-19578
- Griffioen G., Duhamel H., Van Damme N., Pellens K., Zabrocki P., Pannecouque C., van Leuven F., Winderickx J., Wera S. 2006. A yeast-based model of alpha-synucleinopathy identifies compounds with therapeutic potential. Biochimica et Biophysica Acta, 1762: 312-318
- Halliwell B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? Cardiovascular Research, 73, 2: 341-347
- Hannson H.A., Holmgren J., Svennerholm L. 1977. Ultrastructural localization of cell membrane GM1 ganglioside by cholera toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 3782-3786
- Haque F., Pandey A.P., Cambrea L.R., Rochet J.C., Hovis J.S. 2010. Adsorption of α-synuclein on lipid bilayers: Modulating the structure and stability of protein assemblies. Journal of Physical Chemistry, 114: 4070-4081
- Hashimoto M., Takenouchi T., Rockenstein E., Masliah E. 2003. Alpha-synuclein up-regulates expression of caveolin-1 and down-regulates extracellular signal-regulated kinase activity in B103 neuroblastoma cells: role in the pathogenesis of Parkinson's disease. Journal of Neurochemisry, 85: 1468-1479
- Hawe A., Sutter M., Jiskoot W. 2008. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. Pharmaceutical Research, 25, 7: 1487-1499
- Heise H., Hoyer W., Becker S., Andronesi O.C., Riedel D., Baldus M. 2005. Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length α-synuclein fibrils studied by solid-state NMR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 15871-15876
- Hong D.P., Fink A.L., Uversky V.N. 2009. Smoking and Parkinson's disease: does nicotine affect alphasynuclein fibrillation? Biochimica et Biophysica Acta, 1794, 2: 282-290
- Hong D.P., Han S., Fink A.L., Uversky V.N. 2011. Characterization of the non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. Protein & Peptide Letters, 18: 230-240
- Irman Š. 2010. Vpliv podskupin antifosfolipidnih protiteles na kristalizacijo aneksina A5 na fosfolipidnem dvosloju. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 183 str.
- Ishisaka A., Ichikawa S., Sakakibara H., Piskula M.K., Nakamura T., Kato Y., Ito M., Miyamoto K., Tsuji A., Kawai Y., Terao J. 2011. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. Free Radial Biology & Medicine, 51, 7: 1329-1336
- Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H.A., Kittel A., Saitoh T. 1995. The precursor protein of non-A-β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. Neuron, 14: 467-475
- Izawa Y., Tateno H., Kameda H., Hirakawa K., Hato K., Yagi H., Hongo K., Mizobata T., Kawata Y. 2012. Role of C-terminal negative charges and tyrosine residues in fibril formation of α-synuclein. Brain and Behaviour, 2: 595-605
- Jacobson K., Papahadjopoulos D. 1975. Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. Biochemistry, 14: 152-161
- Jain N., Bhasne K., Hemaswasthi M., Mukhopadhyay S. 2013. Structural and dynamical insights into the membrane-bound α-synuclein. PLOS One, 8, 12: e83752, doi: 10.1371/journal.pone.0083752: 9 str.
- Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M. 1994. Identification of 2 distinct synucleins from human brain. FEBS Letters, 345: 27-32
- Jankovic J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry, 79, 4: 368-376
- Janle E.M., Lila M.A., Grannan M., Wood L., Higgins A., Yousef G.G., Rogers R.B., Kim H., Jackson G.S., Ho L., Weaver CM. 2010. Pharmacokinetics and tissue distribution of 14C-labeled grape polyphenols in the periphery and the central nervous system following oral administration. Journal of Medicinal Food, 13, 4: 926-933

- Jao C.C., Der-Sarkissian A., Langen R. 2004. Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by sitedirected spin labeling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 22: 8331-8336
- Jao C.C., Hegde B.G., Chen J., Haworth I.S., Langen R. 2008. Structure of membrane-bound alpha-synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 50: 19666-19671
- Jensen P.H., Nielsen M.S., Jakes R., Dotti G., Goedert M. 1998. Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. Journal of Biological Chemistry, 273, 41: 26292-26294
- Jeyarasasingam G., Tompkins L., Quik M. 2002. Stimulation of non-alpha7 nicotinic receptors partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity in culture. Neuroscience, 109: 275-285
- Jo E., McLaurin J., Yip C.M., George-Hyslop P., Fraser P.E. 2000. α-Synuclein membrane interaction and lipid specificity. Journal of Biological Chemistry, 275, 4: 34328-34334
- Jun H. 2012. Investigation of quercetin stability in cell culture medium: Role in *in vitro* experiment. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 6, 14:1069-1076
- Kahle, P. J., Neumann M., Ozmen L., Muller V., Jacobsen H., Schindzielorz A., Okochi M., Leimer U., van Der Putten H., Probst A., Kremmer E., Kretzschmar H.A., Haass C. 2000. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant α-synuclein in human and transgenic mouse brain. Journal of Neuroscience, 20, 17: 6365-6373
- Kamp F., Beyer, K. 2006. Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles. Journal of Biological Chemistry, 281, 14: 9251-9259
- Kang L., Moriarty G.M., Woods L.A., Ashcroft A.E., Radford S.E., Baum J. 2012. N-terminal acetylation of α-synuclein induces increased transient helical propensity and decreased aggregation rates in the intrinsically disordered monomer. Protein Science, 21: 911-917
- Kapoor M., O'Brien M.D. 1977. Investigation of the quaternary structure of *Neurospora pyruvate* kinase by cross-linking with bifunctional reagents: the effect of substrates and allosteric ligands. Canadian Science Publishing, 55, 1: 43-49
- Kay C.D., Mazza G.J., Holub B.J. 2005. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. Journal of Nutrition, 135, 11: 2582-2588
- Kayed R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science, 300, 5618: 486-489
- Kelton M.C., Kahn H.J., Conrath C.L., Newhouse P.A. 2000. The effects of nicotine on Parkinson's disease. Brain and Cognition, 43: 274-282
- Khurana R., Ionescu-Zanetti C., Pope M., Li J., Nielson L., Ramirez-Alvarado M., Regan L., Fink A.L., Carter S.A. 2003. A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. Biophysical Journal, 85: 1135-1144
- Kiely, A.P., Asi Y.T., Kara E., Limousin P., Ling H., Lewis P., Proukakis C., Quinn N., Lees A.J., Hardy J., Revesz T., Houlden H., Holton J.L. 2013. Alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? Acta Neuropathologica, 125, 5: 753-769
- Killian J.A., von Heijne G. 2000. How proteins adapt to a membrane-water interface. Trends in Biochemical Sciences, 9: 429-434
- Kim H.Y., Cho M.K., Kumar A., Maier E., Siebenhaar C., Becker S., Fernandez C.O., Lashuel H.A., Benz R., Lange A., Zweckstetter M. 2009. Structural properties of pore-forming oligomers of α-synuclein, Journal of American Chemical Society, 131: 17482-17489
- Kjaer L., Giehm L., Heimburg T., Otzen D. 2009. The influence of vesicle size and composition on α-synuclein structure and stability. Biophysical Journal, 96: 2857-2870
- Kruger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Epplen J.T., Schols L., Riess O. 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nature Genetics, 18, 2: 106-108
- Kubo S., Nemani V.M., Chalkley R.J., Anthony M.D., Hattori N., Mizuno Y., Edwards R.H., Fortin D.L. 2005. A combinatorial code for the interaction of α-synuclein with membranes. Journal of Biological Chemistry, 280, 36: 31664-31672

- Kuhry J. G., Fonteneau P., Duportail G., Maechling C., Laustriat G. 1983. TMA-DPH a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma-membrane fluidity studies in intact living cells. Cell Biophysics, 5, 2: 129-140
- Kuwahara T., Koyama A., Gengyo-Ando K., Masuda M., Kowa H., Tsunoda M., Mitani S., Iwatsubo T. 2006. Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*, Journal of Biological Chemistry, 281: 334-340
- Lagerholm B.C., Weinreb G.E., Jacobson K., Thompson N.L. 2005. Detecting microdomains in intact cell membranes. Annual Review of Physical Chemistry, 56: 309-336
- Lakowicz J.R. 1999. Principles off fluorescence spectroscopy. 2<sup>nd</sup> ed., NewYork, Kluwer Academic/Plenum: 698 str.
- Lambert J. D., Lee M.J., Diamond L., Ju J., Hong J., Bose M., Newmark H.L., Yang C.S. 2006. Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues. Drug Metaboliam and Disposition, 34, 1: 8-11
- Lamberto G.R., Binolfi A., Orcellet M.L., Bertoncini C.W., Zweckstetter M., Griesinger C., Fernandez C.O. 2009. Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on α-synuclein amyloid fibril formation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 21057-21062
- Larsen K.E., Schmitz Y., Troyer M.D., Mosharov E., Dietrich P., Quazi A.Z., Savalle M., Nemani V., Chaudry F.A., Edwards R.H., Stefanis L., Sulzer D. 2006. α-Synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. Journal of Neuroscience, 26, 46: 11915-11922
- Lashuel H.A., Petre B.M., Wall J., Simon M., Nowak R.J., Walz T., Lansbury P.T. 2002. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. Journal of Molecular Biology, 322: 1089-1102
- Lashuel H.A., Overk C.R., Oueslati A., Masliah E. 2013. The many faces of α-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. Nature Reviews Neuroscience, 14, 1: 38-48
- Lee H.J., Choi C., Lee S.J. 2002. Membrane-bound α-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. Journal of Biological Chemistry, 277, 1: 671-678
- Lee H.J., Patel S., Lee S.J. 2005. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. Journal of Neuroscience, 25: 6016-6024
- Lee J.C., Ali B.T., Kozak J.J., Gray H.B., Winkler J.R. 2007. Alpha-Synuclein tertiary contacts dynamics. Journal of Physical Chemistry, B 111: 2107-2112
- Lee S.J., Jeon H., Kandror K.V. 2008. α-Synuclein is localized in a subpopulation of rat brain synaptic vesicles. Acta Neurobiologie Experimentalis, 68, 4: 509-515
- Levitan K., Chereau D., Cohen S.I.A., Knowles T.P.J., Dobson C.M., Fink A.L., Anderson J.P., Goldstein J.M., Millhauser G.L. 2011. Conserved C-terminal charge exerts a profound influence on the aggregation rate of α-synuclein. Journal of Molecular Biology, 411: 329-333
- Linding R., Schymkowitz J., Rousseau F., Diella F., Serrano L. 2004. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. Journal of Molecular Biology, 342, 1: 345-353
- Lokappa S.B., Suk J.E., Balasubramanian A., Samanta S., Situ A.J., Ulmer T.S. 2014. Sequence and membrane determinants of the random coil-helix transition of α-synuclein. Journal of Molecular Biology, 426, 10: 2130-2144
- Lorenzen N., Lemminger L., Pedersen J.N., Nielsen S.B., Otzen D.E. 2014. The N-terminus of α-synuclein is essential for both monomeric and oligomeric interactions with membranes. FEBS Letters, 588, 3: 497-502
- Lotharius J., Brundin P. 2002. Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. Human Molecular Genetics, 11: 2395-2407
- Lundblad M., Decressac M., Mattsson B., Bjorklund A. 2012. Impaired neurotransmission caused by overexpression of α-synuclein in nigral dopamine neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109: 3213-3219
- Lundvig D., Lindersson E., Jensen, P.H. 2005. Pathogenic effects of alpha-synuclein aggregation. Molecular Brain Research, 134: 3-17
- Madine J., Doig A.J., Middleton D.A. 2006. A study of the regional effects of α-synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers. Biochemistry, 45, 18: 5783-5792
- Madine J., Hughes E., Doig A.J., Middleton D.A. 2008. The effects of α-synuclein on phospholipid vesicle integrity: a study using 31P NMR and electron microscopy. Molecular Membrane Biology, 25: 518-527

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, 79, 5: 727-747
- Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H. 1988. Synuclein a neuron-specific protein localized to the nucleous and presynaptic nerve-terminal. Journal of Neuroscience, 8, 8: 2804-2815
- Martinez Z., Zhu M., Han S., Fink A.L. 2007. GM1 specifically interacts with α-synuclein and inhibits fibrillation. Biochemistry, 46, 7: 1868-1877
- Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto M., Takeda A., Sagara Y., Sisk A., Mucke L. 2000. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. Science, 287: 1265-1269
- Masuda M., Suzuki N., Taniguchi S., Oikawa T., Nonaka T., Iwatsubo T., Hisanaga S., Goedert M., Hasegawa M. 2006. Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. Biochemistry, 45, 19: 6085-6094
- McClendon S., Rospigliosi C.C., Eliezer D. 2009. Charge neutralization and collapse of the C-terminal tail of alpha-synuclein at low pH. Protein Science, 18: 1531-1540
- McElhaney R.N. 1986. Differential scanning calorimetric studies of lipid protein interactions in model membrane systems. Biochimica et Biophysica Acta, 864, 3-4: 361-421
- McLaughlin S. 1989. The electrostatic properties of membranes. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 18: 113-136
- Meng X., Munishkina L.A., Fink A.L., Uversky V.N. 2009. Molecular mechanisms underlying the flavonoidinduced inhibition of alpha-synuclein fibrillation. Biochemistry, 48: 8206-8224
- Meng X., Munishkina L.A., Fink A.L., Uversky V.N. 2010. Effects of various flavonoids on the alphasynuclein fibrillation process. Parkinsons Disease, 2010: ID 650794, doi: 10.4061/2010/650794: 16 str.
- Mereles D., Hunstein W. 2011. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: More pitfalls than promises? International Journal of Molecular Sciences, 12, 12: 5592-5603
- Middleton E.R., Rhoades E. 2010. Effects of curvature and composition on α-synuclein binding to lipid vesicles. Biophysical Journal, 99, 7: 2279-2288
- Mihajlovic M., Lazaridis T. 2008. Membrane-bound structure and energetics of alpha-synuclein. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 70, 3: 761-778
- Miyazawa T., Nakagawa K., Kudo M., Muraishi K., Someya K. 1999. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3: 1083-1091
- Mizuno N., Varkey J., Kegulian N.C., Hegde B.G., Cheng N., Langen R., Steven A.C. 2012. Remodeling of lipid vesicles into cylindrical micelles by α-synuclein in an extended α-helical conformation. Journal of Biological Chemistry, 287: 29301-29311
- Moriarty G.M., Janowska M.K., Kang L., Baum J. 2013. Exploring the accessible conformations of N-terminal acetylated a-synuclein. FEBS Letters, 587: 1128-1138
- Murphy D.D., Rueter S.M., Trojanowski J.Q., Lee V.M. 2000. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. Journal of Neuroscience, 20: 3214-3220
- Murray I.V., Giasson B.I., Quinn S.M., Koppaka V., Axelsen P.H., Ischiropozlos H., Trojanowski J.Q., Lee V.M. 2003. Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation *in vitro*. Biochemistry, 42, 28: 8530-8540
- NarayananV., Scarlata S. 2001. Membrane binding and self-association of α-synucleins. Biochemistry, 40, 33: 9927-9993
- Narhi L., Wood S.J., Steavenson S., Jiang Y., Wu G.M., Anafi D., Kaufman S.A., Martin F., Sitney K., Denis P., Louis J.C., Wypych J., Biere A.L., Citron M. 1999. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. Journal of Biological Chemistry, 274: 9843-9846
- Nemani V. M., Lu W., Berge V., Nakamura K., Onoa B., Lee M.K., Chaudhry F.A., Nicoll R.A., Edwards R.H. 2010. Increased expression of α-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. Neuron, 65, 1: 66-79
- Newman M.B., Arendash G.W., Shytle R.D., Bickford P.C., Tighe T., Sanberg P.R. 2002. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. Life Sciences, 71: 2807-2820
- Nuscher B., Kamp F., Mehnert T., Odoy S., Haass C., Kahle P.J., Beyer K. 2004. α-Synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study. Journal of Biological Chemistry, 279, 21: 21966-21975
- Ohrfelt A., Zetterberg H., Andersson K., Persson R., Secic D., Brinkmalm G., Wallin A., Mulugeta E., Francis P.T., Vanmechelen E., Aarsland D., Ballard C., Blennow K., Westman-Brinkmalm A. 2011.

Identification of novel  $\alpha$ -synuclein isoforms in human brain tissue by using an online nanoLC-ESI-FTICR-MS method. Neurochemical Research, 36, 11: 2029-2042

- Ono K., Hirohata M., Yamada M. 2007. Anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing activity of nicotine *in vitro*: Implications for the prevention and therapeutics of Lewy body diseases. Experimental Neurology, 205: 414-424
- Oueslati A., Fournier M., Lashuel H.A. 2010. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of  $\alpha$ -synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. Progress in Brain Research, 183: 115-145
- Paleologou K.E., Schmid A.W., Rospigliosi C.C., Kim H.Y., Lamberto G.R., Fredenburg R.A., Lansbury P.T., Fernandez C.O., Eliezer D., Zweckstetter M., Lashuel H.A. 2008. Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. Journal of Biological Chemistry, 283:16895-16905
- Pan T.H., Jankovic J., Le W.D. 2003. Potential therapeutic properties of green tea polyphenols in Parkinson's disease. Drugs & Aging, 20: 711-721
- Pandey A.P., F. Haque, Rochet R.C., Hovis J.S. 2009. Clustering of a-synuclein on supported lipid bilayers: role of anionic lipid, protein, and divalent ion concentration. Biophysical Journal, 96: 540-551
- Pandey A.P., Haque F., Rochet J.-C., Hovis J.S. 2011. α-Synuclein-induced tubule formation in lipid bilayers. Journal of Physical Chemistry, 115: 5886-5893
- Parihar M.S., Parihar A., Fujita M., Hashimoto M., Ghafourifar P. 2008. Mitochondrial association of alphasynuclein causes oxidative stress. Cellular and Molecular Life Sciences, 65: 1272-1284
- Park J.Y., Lansbury P.T. 2003. Beta-synuclein inhibits formation of alpha-synuclein protofibrils: A possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. Biochemistry, 42, 13: 3696-3700
- Park J.W., Kim K.S., Lee S.B., Ryu J.S., Chung K.C., Choo Y.K., Jou I., Park S.M. 2009. On the mechanism of internalization of α-synuclein into microglia: roles of ganglioside GM1 and lipid raft. Journal of Neurochemistry, 110: 400-411
- Parton R.G. 1994. Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 42: 155-166
- Payton J.E., Perrin R.J., Woods W.S., George J.M. 2004. Structural determinants of PLD2 inhibition by αsynuclein. Journal of Molecular Biology, 337: 1001-1009
- Perez R.G., Waymire J.C., Lin E., Liu J.J., Guo F., Zigmond M.J. 2002. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. Journal of Neuroscience, 22, 8: 3090-3099
- Periquet M., Fulga T., Myllykangas L., Schlossmacher M.G., Feany M.B. 2007. Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity *in vivo*. Journal of Neuroscience, 27: 3338-3346
- Perlmutter J.D., Braun A.R., Sachs J.N. 2009. Curvature dynamics of alpha-synuclein familial Parkinson disease mutants: molecular simulations of the micelle- and bilayer-bound forms. Journal of Biological Chemistry, 284, 11: 7177-7189
- Perrin R.J., Woods W.S., Clayton D.F., George, J.M. 2000. Interaction of human alpha-synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids - Structural analysis using site-directed mutagenesis. Journal of Biological Chemistry, 275, 44: 34393-34398
- Perrin R.J., Woods W.S., Clayton D.F., George J.M. 2001. Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins. Journal of Biological Chemistry, 276: 41958–41962
- Pfefferkorn C.M., Lee J.C. 2010. Tryptophan probes at the α-synuclein and membrane interface. Journal of Physical Chemistry, 114: 4615-4622
- Pfefferkorn C.M., Jiang Z., Lee J.C. 2012. Biophysics of α-synuclein membrane interactions. Biochimica et Biophysica Acta, 1818: 162-171
- Pirc K., Ulrih N.P. 2011. Alpha-synuclein interactions with membranes. V: Etiology and physiology of Parkinson's disease. Qayyum Rana A. (ed.). Rijeka, Intech: 87-110
- Poklar Ulrih N., Fritz J., Maček P., Vesnaver G., Chalikian T.V. 1999. Interaction of the pore-forming protein equinatoxin II with model lipid membranes: a calorimetric and spectroscopic study. Biochemistry, 38, 45: 14999-15008
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., DiIorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. 1997. Mutation in the α-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science, 276, 5321: 2045-2047
- Pontier S.M., Schweisguth F. 2012. Glycosphingolipids in signaling and development: from liposomes to model organisms. Developmental Dynamics, 241, 1: 92-106

- Pottel H., Vandermeer W., Herreman W. 1983. Correlation between the order parameter and the steady-state fluorescence anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and an evaluation of membrane fluidity. Biochimica et Biophysica Acta, 730, 2: 181-186
- Pranke I.M., Morello V., Bigay J., Gibson K., Verbavatz J.M., Antonny B., Jackson C.L. 2011. α-Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. Journal of Cell Biology, 194: 89-103
- Provencher S.W., Gloeckner J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. Biochemistry, 20, 1: 33-37
- Qin Z., Hu D., Han S., Hong D.-P., Fink A.L. 2007. Role of different regions of α-synuclein in the assembly of fibrils. Biochemistry, 46: 13322-13330
- Quik M. 2004. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. Trends in Neurosciences, 27: 561-568
- Quilty M.C., King A.E., Gai W.P., Pountney D.L., West A.K., Vickers J.C., Dickson T.C. 2006. Alphasynuclein is upregulated in neurons in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. Experimental Neurology, 199, 2: 249-256
- Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B., Kagan B., Ghiso J., Lal R. 2005. Amyloid ion channels: a common structural link for protein misfolding disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 10427-10432
- Ramakrishnan M., Jensen P.H., Marsh D. 2003. a-Synuclein association with phosphatidylglycerol probed by lipid spin labels. Biochemistry, 42: 12919-12926
- Ramassamy C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. European Journal of Pharmacology, 545: 51-64
- Rao J.N., Kim Y.E., Park L.S., Ulmer T.S. 2009. Effect of pseudorepeat rearrangement on alpha-synuclein misfolding, vesicle binding, and micelle binding. Journal of Molecular Biology, 390, 3: 516-529
- Rappley I., Gitler A.D., Selvy P.E., LaVoie M.J., Levy B.D., Brown H.A., Lindquist S., Selkoe D.J. 2009. Evidence that alpha-synuclein does not inhibit phospholipase D. Biochemistry, 48: 1077-1083
- Rhoades E., Ramlall T.F., Webb W.W., Eliezer D. 2006. Quantification of α-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. Biophysical Journal, 90, 12: 4692-4700
- Riah O., Courriere P., Dousset J.C., Todeschi N., Labat C. 1998. Nicotine is more efficient than cotinine at passing the blood–brain barrier in rats. Cellular and Molecular Neurobiology, 18: 311-318
- Robotta M., Hintze C., Schildknecht S., Zijlstra N., Jungst C., Karreman C., Huber M., Leist M., Subramaniam V., Drescher M. 2012. Locally resolved membrane binding affinity of the N-terminus of alpha-synuclein. Biochemistry, 51: 3960-3962
- Rojko J. 2009. Vpliv točkovnih mutacij na interakcije alfa-sinukleina z membranami. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 62 str.
- Rospigliosi C.C., McClendon S., Schmid A.W., Ramlall T.F., Barre P., Lashuel H.A., Eliezer D. 2009. E46K Parkinson's-linked mutation enhances C-terminal-to-N-terminal contacts in α-synuclein. Journal of Molecular Biology, 388: 1022-1032
- Rousseau F., Schymkowitz J., Serrano L. 2006. Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds? Current Opinion in Structural Biology, 16, 1: 118-126
- Saha A.R., Ninkina N.N., Hanger D.P., Anderton B.H., Davies A.M., Buchman V.L. 2000. Induction of neuronal death by alpha-synuclein. European Journal of Neuroscience, 12: 3073-3077
- Sawaya M.R., Sambashivan S., Nelson R., Ivanova M.I., Sievers S.A., Apostol M.I., Thompson M.J., Balbirnie M., Wiltzius J.J., McFarlane H.T., Madsen A.Ø., Riekel C., Eisenberg D. 2007. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. Nature, 447, 7143: 453-457
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 45: 287-306
- Scherzer C.R., Jensen R.V., Gullans S.R., Feany M.B. 2003. Gene expression changes presage neurodegeneration in a Drosophila model of Parkinson's disease. Human Molecular Genetics, 12, 19: 2457-2466
- Schildknecht S., Gerding H.R., Karreman C., Drescher M., Lashuel H.A., Outeiro T.F., Di Monte D.A., Leist M. 2013. Oxidative and nitrative alpha-synuclein modifications and proteostatic stress: implications for disease mechanisms and interventions in synucleinopathies. Journal of Neurochemistry, 125, 4: 491-511
- Schroeder E.K., Kelsey N.A., Doyle J., Breed E., Bouchard R.J., Loucks F.A., Harbison R.A., Linseman D.A. 2009. Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. Antioxidants & Redox Signaling, 11, 3: 469-480

- Schwieger C., Blume A. 2007. Interaction of poly(L-lysines) with negatively charged membranes: an FT-IR and DSC study. European Biophysical Journal, 36: 437-450
- Scott D.A., Tabarean I., Tang Y., Cartier A., Masliah E., Roy S. 2010. A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in α-synuclein-induced neurodegeneration. Journal of Neuroscience, 30, 24: 8083-8095
- Scott D., Roy S. 2012. α-Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. Journal of Neuroscience, 32: 10129-10135
- Seelig J. 1997. Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. Biochimica et Biophysica Acta, 1331: 103-116
- Seelig J. 2004. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, 1666: 40-50
- Segrest J.P., Jones M.K., Deloof H., Brouillette C.G., Venkatachalapathi Y.V., Anantharamaiah G.M. 1992. The amphiphathic helix in the exchangeable apolipoproteins – a review of secondary structure and function. Journal of Lipid Research, 33, 2: 141-166
- Serpell L.C., Berriman J., Jakes R., Goedert M., Crowther R.A. 2000. Fiber diffraction of synthetic α-synuclein filaments shows amyloid-like cross-β conformation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 4897-4902
- Sevcsik E., Trexler A.J., Dunn J.M., Rhoades E. 2011. Allostery in a disordered protein: Oxidative modifications to α-synuclein act distally to regulate membrane binding. Journal of American Chemical Society, 133, 18: 7152-7158
- Sharon R., Goldberg M.S., Bar-Joseph I., Betensky R.A., Shen J., Selkoe D.J. 2001. Alpha-synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acidbinding proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 16: 9110-9115
- Shoemaker S.D., Vanderlick T.K. 2002. Intramembrane electrostatic interactions destabilize lipid vesicles. Biophysical Journal, 83: 2007-2014
- Shvadchak V.V., Falomir-Lockhart L.J., Yushchenko D.A., Jovin T. 2011a. Interactions of α-synuclein with lipids and artificial membranes monitored by ESIPT probes. V: Lipids and cellular membranes in amyloid diseases. Jelinek R. (ed.). Chichester, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 1-31
- Shvadchak V.V., Falomir-Lockhart L.J., Yushchenko D.A., Jovin T.M. 2011b. Specificity and kinetics of αsynuclein binding to model membranes determined with fluorescent excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) probe. Journal of Biological Chemistry, 286: 13023-13032
- Shvadchak V.V., Yushchenko D.A., Pievo R., Jovin T.M. 2011c. The mode of α-synuclein binding to membranes depends on lipid composition and lipid to protein ratio. FEBS Letters, 585, 22: 3513-3519
- Silva B.A., Breydo L., Uversky V.N. 2012. Targeting the chameleon: a focused look at α-synuclein and its roles in neurodegeneration. Molecular Neurobiology, 47: 446-59
- Silva R.F., Rodrigues C.M., Brites D. 2001. Bilirubin-induced apoptosis in cultured rat neural cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid. Journal of Hepatology, 34, 3: 402-408
- Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes, Nature, 387: 569-572
- Simon-Sanchez J., Schulte C., Bras J.M., Sharma M., Gibbs J.R., Berg D., Paisan-Ruiz C., Lichtner P., Scholz S.W., Hernandez D.G., Krüger R., Federoff M., Klein C., Goate A., Perlmutter J., Bonin M., Nalls M.A., Illig T., Gieger C., Houlden H., Steffens M., Okun M.S., Racette B.A., Cookson M.R., Foote K.D., Fernandez H.H., Traynor B.J.,Schreiber S., Arepalli S., Zonozi R., Gwinn K., van der Brug M., Lopez G., Chanock S.J., Schatzkin A., Park Y., Hollenbeck A., Gao J., Huang X., Wood N.W., Lorenz D., Deuschl G., Chen H., Riess O., Hardy J.A., Singleton A.B., Gasser T. 2009. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. Nature Genetics, 41: 1308-1312
- Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M.R., Muenter M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J., Gwinn-Hardy K. 2003. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science, 302, 5646: 841-841
- Skoog D.A., Holler F.J., Crounch. S.R. 2007. Principles of instrumental analysis. 6<sup>th</sup> ed. Belmont, Thomson Brooks/Cole: 1039 str.
- Skrt M., Benedik E., Podlipnik Č., Poklar Ulrih N. 2012. Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. Food Chemistry, 135: 2418-2424
- Souza J.M., Giasson B.I., Lee V.M., Ischiropoulos H. 2000. Chaperone-like activity of synucleins. FEBS Letters, 474: 116-119

- Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. 1997. α-Synuclein in Lewy bodies. Nature, 388: 839-840
- Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Cairns N.J., Lantos P.L., Goedert M. 1998a. Filamentous alphasynuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Neuroscience Letters, 251: 205-208
- Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. 1998b. Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 6469-6473
- Srivastava K., Lee M., Morrell C. 2007. Mechanism of alpha-synuclein inhibition of platelet granule exocytosis. Circulation, 116, 16: 76-76
- Stevenson D.E., Hurst R.D. 2007. Polyphenolic phytochemicals just antioxidants or much more? Cellular and Molecular Life Sciences, 64: 2900-2916
- Stins M.F., Badger J., Sik K.K. 2001. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. Microbial Pathogenesis, 30, 1: 19-28
- Stöckl M., Fischer P., Wanker E., Herrmann A. 2008. Alpha-synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains. Journal of Molecular Biology, 375, 5: 1394-1404
- Stöckl M.T., Zijlstra N., Subramaniam V. 2013. Alpha-synuclein oligomers: an amyloid pore? Insights into mechanisms of alpha-synuclein oligomer–lipid interactions. Molecular Neurobiology, 47: 613-621
- Sudhof T.C. 2004. The synaptic vesicle cycle. Annual Review of Neuroscience, 27: 509-547
- Sung Y.-h., Eliezer D. 2007. Residual structure, backbone dynamics, and interactions within the synuclein family. Journal of Molecular Biology, 372: 689-707
- Suzuki K., Iseki E., Katsuse O., Yamaguchi A., Katsuyama K., Aoki I., Yamanaka S., Kosaka K. 2003. Neuronal accumulation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -synucleins in the brain of a GM2 gangliosidosis mouse model. Neuroreport, 14: 551-554
- Svennerholm L., Boström K., Jungbjer B., Olsson L. 1994. Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. Journal of Neurochemistry, 63: 1802-1811
- Takamori S., Holt M., Stenius K., Lemke E.A., Grønborg M., Riedel D., Urlaub H., Schenck S., Brügger B., Ringler P., Müller S.A., Rammner B., Graüter F., Hub J.S., De Groot B.L., Mieskes G., Moriyama Y., Klingauf J., Grubmüller H., Heuser J., Wieland F., Jahn R. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. Cell, 127: 831-846
- Takeda A., Hashimoto M., Mallory M., Sundsumo M., Hansen L., Sisk A., Masliah E. 1998. Abnormal distribution of the non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid precursor/alpha-synuclein in Lewy body disease as revealed by proteinase K and formic acid pretreatment. Laboratory Investigation, 78, 9: 1169-1177
- Tamai J., Matsukawa S., Satake M. 1971. Gangliosides in neuron. Journal of Biochemistry, 69, 1: 235-238
- Tapiero H., Tew K.D., Ba G.N., Mathe G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomedicine & Pharmacotherapy, 56: 200-207
- Taschenberger G., Garrido M., Tereshchenko Y., Bähr M., Zweckstetter M., Kügler S. 2011. Aggregation of α-synuclein promotes progressive *in vivo* neurotoxicity in adult rat dopaminergic neurons. Acta Neuropathologica, 123, 5: 671-683
- Tehranian R., Montova S.E., Van Laar A.D., Hastings T.G., Perez R.G. 2006. Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells. Journal of Neurochemistry, 99: 1188-1196
- Tessari I., Bisaglia M., Valle F., Samori B., Bergantino E., Mammi S., Bubacco L.J. 2008. The reaction of αsynuclein with tyrosinase: Possible implications for Parkinson disease. Biological Chemistry, 283: 16808–16817
- Trexler A.J., Rhoades E. 2009. Alpha-synuclein binds large unilamellar vesicles as an extended helix. Biochemistry, 48, 11: 2304-2306
- Ueda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D.A.C., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T. 1993. Molecular-cloning of cDNA-encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimerdisease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 11282-11286
- Ullman O., Fisher C.K., Stultz C.M. 2011. Explaining the structural plasticity of α-synuclein. Journal of American Chemical Society, 133: 19536-19546
- Ulmer T.S., Bax A. 2005. Comparison of structure and dynamics of micelle-bound human α-synuclein and Parkinson disease variants. Journal of Biological Chemistry, 280: 43179-43187

- Ulmer T.S., Bax A., Cole N.B., Nussbaum R.L. 2005. Structure and dynamics of micelle-bound human αsynuclein. Journal of Biological Chemistry, 280, 10: 9595-9603
- Ulrih N.P., Barry C.H., Fink A.L. 2008. Impact of Tyr to Ala mutations on alpha-synuclein fibrillation and structural properties. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 1782, 10: 581-585
- Uversky V.N. 2003. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 21, 2: 211-234
- Uversky V.N. 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. Journal of Neurochemistry, 103: 17-37
- Uversky V.N. 2011. Intrinsically disordered proteins from A to Z. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 43: 1090-1103
- Uversky V.N. 2013. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 1834: 932-951
- Uversky V.N., Eliezer D. 2009. Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of alphasynuclein. Current Protein and Peptide Science, 10, 5: 483-99
- Uversky V.N., Fink A.L. 2002. Biophysical properties of human alpha-synuclein and its role in Parkinson's disease. V: Recent research developments in proteins. Pandalai S.G. (ed). Kerala, Transworld Research Network: 153-186
- Uversky V.N., Li J., Fink A.L. 2001. Evidence for a partially folded intermediate in α-synuclein fibril formation. Journal of Biological Chemistry, 276: 10737-10744
- Uversky V.N., Li J., Souillac P., Millett I.S., Doniach S., Jakes R., Goedert M., Fink A.L. 2002. Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins. Journal of Biological Chemistry, 277, 14: 11970-11978
- Valenzuela S.M. 2007. Liposome techniques for synthesis of biomimetic lipid membranes. V: Nanobiotechnology of biomimetic membranes. Martin D.K. (ed.). Sydney, Springer US: 75-87
- Vamvaca K., Volles M.J., Lansbury P.T. 2009. The first N-terminal amino acids of alpha-synuclein are essential for alpha-helical structure formation *in vitro* and membrane binding in yeast. Journal of Molecular Biology, 389: 413-424
- van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9, 2: 112-124
- van Rooijen B.D., Claessens M., Subramaniam V. 2008. Membrane binding of oligomeric α-synuclein depends on bilayer charge and packing. FEBS Letters, 582: 3788-3792
- van Rooijen B.D., Claessens M., Subramaniam V. 2009. Lipid bilayer disruption by oligomeric α-synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 1788: 1271-1278
- van Rooijen B.D., Claessens M., Subramaniam V. 2010. Membrane permeabilization by oligomeric αsynuclein: In search of the mechanism. PLOS One, 5: e14292, doi: 10.1371/journal.pone.0014292: 9 str.
- Varkey J., Isas J.M., Mizuno N., Jensen M.B., Bhatia V.K., Jao C.C., Petrlova J., Voss J.C., Stamou D.G., Steven A.C., Langen R. 2010. Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. Journal of Biological Chemistry, 285: 32486-32493
- Veszelka S., Pasztoi M., Farkas A.E., Krizbai I., Ngo T.K., Niwa M., Abraham C.S., Deli M.A. 2007. Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. Neurochemistry International, 50, 1: 219-228
- Vilar M., Chou H.-T., Luehrs T., Maji S.K., Riek-Loher D., Verel R., Manning G., Stahlberg H., Riek R. 2008. The fold of α-synuclein fibrils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105: 8637-8642
- Volles M.J., Lansbury P.T. 2002. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. Biochemistry, 41: 4595-4602
- Volles M.J., Lee S.J., Rochet J.C., Shtilerman M.D., Ding T.T., Kessler J.C., Lansbury P.T. 2001. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. Biochemistry, 40: 7812-7819
- Wang G.-F., Li C., Pielak G.J. 2010. <sup>19</sup>F NMR studies of α-synuclein-membrane interactions. Protein Science, 19, 9: 1686-1691
- Wang S., Xu B., Liou L.C., Ren Q., Huang S., Luo Y., Zhang Z., Witt S.N. 2012. α-Synuclein disrupts stress signaling by inhibiting polo-like kinase Cdc5/Plk2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 40: 16119-16124
- Wang W., Perovic I., Chittuluru J., Kaganovich A., Nguyen L.T.T, Liao J, Auclair J.R., Johnson D., Landeru A, Simorellis A.K., Shulin J., Cookson M.R., Asturias F.J., Agar J.N., Webb B.N., Kang C., Ringe D.,
Petsko G.A., Pochapsky T.C., Hoang Q.Q. 2011. A soluble  $\alpha$ -synuclein construct forms a dynamic tetramer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 43: 17797-17802

- Watanabe C.M.H., Ader W.P., Rimbach G., Packer L., Maguire J.J., Schultz P.G., Gohil K. 2001. The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 6577-6580
- Weinreb P.H., Zhen W.G., Poon A.W., Conway K.A., Lansbury P.T. 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. Biochemistry, 35: 13709-13715
- White S.H., Wimley W.C. 1998. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Biomembranes, 1376: 339-352
- White S.H., Wimley W.C. 1999. Membrane protein folding and stability: Physical principles. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 28: 319-365
- Wietek J., Haralampiev I., Amoussouvi A., Herrmann A., Stöckl M. 2013. Membrane bound α-synuclein is fully embedded in the lipid bilayer while segments with higher flexibility remain. FEBS Letters, 19, 587: 2572-2577
- Wood S.J., Wypych J., Steavenson S., Louis J.C., Citron M., Biere A.L. 1999. Alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent - Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. Journal of Biological Chemistry, 274, 28: 19509-19512
- Wright P.E., Dyson H.J. 1999. Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. Journal of Molecular Biology, 293, 2: 321-331
- Wu K.-P., Baum J. 2010. Detection of transient interchain interactions in the intrinsically disordered protein α-synuclein by NMR paramagnetic relaxation enhancement. Journal of the American Chemical Society, 132: 5546-5547
- Xu J., Kao S.J., Lee F.J., Song W., Jin L.W., Yankner B.A. 2002. Dopamine-dependent neurotoxicity of alphasynuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. Nature Medicine, 8: 600-606
- Xu X. L., London E. 2000. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. Biochemistry, 39: 843-849
- Yamin G., Uversky V.N., Fink A.L. 2003. Nitration inhibits fibrillation of human α-synuclein *in vitro* by formation of soluble oligomers. FEBS Letters, 542: 147-152
- Yavich L., Tanila H., Vepsalainen S., Jakala P. 2004. Role of α-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. Journal of Neuroscience, 24: 11165-11170
- Youdim K.A., Dobbie M.S., Kuhnle G., Proteggente A.R., Abbott N.J., Rice-Evans C., 2003. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies, Journal of Neurochemistry, 85: 180-192
- Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J., Rice-Evans C.A., Abbott N.J. 2004a. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. Free Radical Biology & Medicine, 36, 5: 592-604
- Youdim K.A., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. 2004b. Flavonoids and the brain: Interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. Free Radical Biology & Medicine, 37, 11: 1683-1693
- Zakharov S.D., Hulleman J.D., Dutseva E.A., Antonenko Y.N., Rochet J.C., Cramer W.A. 2007. Helical alphasynuclein forms highly conductive ion channels. Biochemistry, 46: 14369-14379
- Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atares B., Llorens V., Tortosa E.G., del Ser T., Munoz D.G., de Yebenes J.G. 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Annals of Neurology, 55, 2: 164-173
- Zhou Q., Chiang H., Portocarrero C., Zhu Y., Hill S., Heppert K., Jayaratna H., Davies M., Janle E., Kissinger P. 2003. Investigating the stability of EGCg in aqueous media. Current Separations, 20, 3: 83-86
- Zhu M., Fink A.L. 2003. Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. Journal of Biological Chemistry, 278, 19: 16873-16877
- Zhu M., Han S., Fink A.L. 2013. Oxidized quercetin inhibits alpha-synuclein fibrillization. Biochimica et Biophysica Acta, 1830, 4: 2872-2881
- Zhu M., Li J., Fink A.L. 2003. The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation. Journal of Biological Chemistry, 278, 41: 40186-40197
- Zhu M., Qin Z.J., Hu D., Munishkina L.A., Fink A.L. 2006. Alpha-synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. Biochemistry, 45: 8135-8142

## ZAHVALA

In na koncu vse izgine, vse se pozabi in ostane le velika hvaležnost...

Hvala vsem, ki ste moj svet in moje sonce.

## PRILOGE

**Priloga A:** Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji DPPC veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C , 40 °C in 50 °C do doseženega R = 500, 100 in 10. Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

**Appendix A:** The fluorescense anisotropy values (r) of DPH and TMA-DPH (TMA) after titration of DPPC vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R = 500, 100 and 10. For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).

			SUV		$\mathbf{R} = 500$		<b>R</b> = 100		<b>R</b> = 10	
		T (°C)	r	SD	r	SD	r	SD	r	SD
		25	0,3467	0,0023	0,3450	0,0006	0,3427	0,0026	0,3409	0,0066
	WT	40	0,2769	0,0046	0,2791	0,0070	0,2784	0,0015	0,2787	0,0089
H		50	0,0826	0,0097	0,0822	0,0030	0,0861	0,0005	0,0906	0,0073
D	Cnt	25	0,3452	0,0019	0,3434	0,0004	0,3424	0,0039	0,3446	0,0008
		40	0,2741	0,0059	0,2762	0,0023	0,2818	0,0008	0,2758	0,0069
		50	0,0835	0,0023	0,0832	0,0014	0,0875	0,0066	0,0870	0,0037
		25	0,3538	0,0056	0,3598	0,0027	0,3571	0,0004	0,3633	0,0142
	WT	40	0,2991	0,0030	0,2986	0,0044	0,3017	0,0045	0,2985	0,0011
TMA		50	0,2103	0,0048	0,2056	0,0078	0,2096	0,0008	0,2083	0,0023
		25	0,3594	0,0025	0,3546	0,0019	0,3570	0,0007	0,3590	0,0008
	Cnt	40	0,3058	0,0142	0,2964	0,0040	0,2940	0,0021	0,2968	0,0018
		50	0,2030	0,0027	0,2052	0,0036	0,2072	0,0012	0,2027	0,0008

**Priloga B:** Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji POPC veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C , 40 °C in 50 °C do doseženega R = 500, 100 in 10. Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

**Appendix B:** The fluorescense anisotropy values (r) of DPH and TMA-DPH (TMA) after titration of POPC vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R = 500, 100 and 10. For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).

			SUV		$\mathbf{R} = 500$		<b>R</b> = 100		<b>R</b> = 10	
		T (°C)	r	SD	r	SD	r	SD	r	SD
IA DPH	WT	25	0,3460	0,0079	0,3645	0,0030	0,3504	0,0030	0,3420	0,0143
	Cnt	25	0,3620	0,0063	0,3478	0,0054	0,3649	0,0179	0,3565	0,0052
	WT	25	0,2286	0,0028	0,2311	0,0028	0,2265	0,0018	0,2239	0,0014
<b>VI</b>	Cnt	25	0,2263	0,0015	0,2317	0,0019	0,2219	0,0021	0,2300	0,0053

**Priloga C:** Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji DPPG veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C , 40 °C in 50 °C do doseženega R = 500, 100 in 10. Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

**Appendix C:** The fluorescense anisotropy values (r) of DPH and TMA-DPH (TMA) after titration of DPPG vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R = 500, 100 and 10. For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).

			SUV		$\mathbf{R} = 500$		<b>R</b> = 100		<b>R</b> = 10	
		T (°C)	r	SD	r	SD	r	SD	r	SD
		25	0,3300	0,0020	0,3312	0,0090	0,3336	0,0045	0,3350	0,0065
	WT	40	0,2347	0,0065	0,3252	0,0089	0,3296	0,0012	0,2822	0,0080
H		50	0,0745	0,0089	0,0765	0,0023	0,0964	0,0009	0,1417	0,0021
D	Cnt	25	0,3279	0,0024	0,3302	0,0008	0,3341	0,0012	0,3303	0,0051
		40	0,2355	0,0093	0,2355	0,0024	0,2342	0,0045	0,2392	0,0036
		50	0,0692	0,0065	0,0758	0,0021	0,0738	0,0022	0,0745	0,0061
		25	0,3238	0,0022	0,3232	0,0030	0,3200	0,0008	0,3197	0,0050
	WT	40	0,2515	0,0010	0,3050	0,0050	0,3226	0,0061	0,2950	0,0046
Į		50	0,1848	0,0030	0,1861	0,0021	0,1890	0,0050	0,2223	0,0030
Ĩ		25	0,3191	0,0012	0,3244	0,0032	0,3246	0,0030	0,3243	0,0020
	Cnt	40	0,2460	0,0060	0,2452	0,0020	0,2472	0,0012	0,2502	0,0051
		50	0,1839	0,0012	0,1861	0,0024	0,1855	0,0028	0,1910	0,0041

**Priloga D:** Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji POPG veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C , 40 °C in 50 °C do doseženega R = 500, 100 in 10. Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

**Appendix D:** The fluorescense anisotropy values (r) of DPH and TMA-DPH (TMA) after titration of POPG vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R = 500, 100 and 10. For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).

			SUV		$\mathbf{R} = 500$		<b>R</b> = 100		<b>R</b> = 10	
		T (°C)	r	SD	r	SD	r	SD	r	SD
IA DPH	WT	25	0,1037	0,0021	0,1040	0,0010	0,1114	0,0056	0,1465	0,0023
	Cnt	25	0,1010	0,0050	0,1053	0,0029	0,1049	0,0028	0,1059	0,0018
	WT	25	0,2294	0,0016	0,2274	0,0007	0,2324	0,0014	0,2387	0,0060
<b>NT</b>	Cnt	25	0,2245	0,0018	0,2267	0,0012	0,2282	0,0030	0,2351	0,0050

**Priloga E:** Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji DPPC:DPPG 1:1 veziklov z divjim tipom  $\alpha$ -sinukleina. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C , 40 °C in 50 °C do doseženega R = 500, 100 in 10. Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

**Appendix E:** The fluorescense anisotropy values (r) of DPH and TMA-DPH (TMA) after titration of DPPC:DPPG 1:1 vesicles with wild-type  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R = 500, 100 and 10. For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).

		SUV		<b>R</b> = 500		<b>R</b> = 100		<b>R</b> = 10		
		T (°C)	r	SD	r	SD	r	SD	r	SD
		25	0,3380	0,0023	0,3430	0,0046	0,3437	0,0031	0,3449	0,0018
	WT	40	0,2747	0,0062	0,3077	0,0100	0,3239	0,0085	0,3476	0,0093
Н		50	0,0842	0,0010	0,0841	0,0020	0,0800	0,0032	0,0950	0,0045
DI	Cnt	25	0,3363	0,0050	0,3400	0,0021	0,3400	0,0030	0,3437	0,0032
		40	0,2713	0,0030	0,2785	0,0020	0,2797	0,0017	0,2807	0,0019
		50	0,0842	0,0008	0,0797	0,0068	0,0781	0,0023	0,0804	0,0030
		25	0,3288	0,0031	0,3314	0,0020	0,3302	0,0050	0,3304	0,0092
	WT	40	0,2750	0,0024	0,2933	0,0030	0,3051	0,0050	0,3122	0,0098
TMA		50	0,1856	0,0055	0,1817	0,0073	0,1896	0,0030	0,1878	0,0073
		25	0,3300	0,0060	0,3290	0,0020	0,3300	0,0049	0,3300	0,0030
	Cnt	40	0,2734	0,0065	0,2794	0,0020	0,2785	0,0020	0,2821	0,0063
		50	0,1848	0,0047	0,1831	0,0033	0,1855	0,0077	0,1837	0,0088

**Priloga F:** Vrednosti fluorescenčne anizotropije (r) DPH in TMA-DPH (TMA) po titraciji DPPC:DPPG 1:1 veziklov z  $\alpha$ -sinukleinom Y39A. Vezikle smo s proteinom titrirali pri temperaturi 25 °C , 40 °C in 50 °C do doseženega R = 500, 100 in 10. Za kontrolo smo suspenzijo titrirali s 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pufrom, pH = 7,0 (Cnt). Vrednosti predstavljajo povprečje in standardno napako za vsaj dva neodvisna eksperimenta (za podrobnosti glej 3.8.4).

**Appendix F:** The fluorescense anisotropy values (r) of DPH and TMA-DPH (TMA) after titration of DPPC:DPPG 1:1 vesicles with Y39A  $\alpha$ -synuclein. Aliquots of  $\alpha$ -synuclein were titrated into suspensions of SUV at different temperatures (25 °C, 40 °C and 50 °C) to obtain R = 500, 100 and 10. For control, vesicles were titrated with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES buffer, pH = 7.0 (Cnt). Error bars represent the standard error from at least two independent experiments (see 3.8.4 for details).

			SUV		<b>R</b> = 500		<b>R</b> = 100		<b>R</b> = 10	
		T (°C)	r	SD	r	SD	r	SD	r	SD
		25	0,3364	0,0028	0,3430	0,0000	0,3437	0,0036	0,3423	0,0038
	WT	40	0,2737	0,0034	0,3084	0,0075	0,3226	0,0088	0,3449	0,0095
Н		50	0,0843	0,0046	0,0837	0,0028	0,0808	0,0048	0,0945	0,0037
DI	Cnt	25	0,3352	0,0056	0,3378	0,0039	0,3384	0,0040	0,3442	0,0040
		40	0,2688	0,0040	0,2757	0,0028	0,2798	0,0035	0,2791	0,0031
		50	0,0848	0,0027	0,0792	0,0048	0,0785	0,0032	0,0811	0,0035
		25	0,3292	0,0040	0,3324	0,0031	0,3292	0,0056	0,3292	0,0074
	WT	40	0,2766	0,0024	0,2921	0,0018	0,3052	0,0041	0,3117	0,0089
TMA		50	0,1882	0,0030	0,1818	0,0055	0,1889	0,0045	0,1874	0,0077
		25	0,3285	0,0030	0,3297	0,0024	0,3285	0,0052	0,3291	0,0040
	Cnt	40	0,2732	0,0039	0,2788	0,0028	0,2782	0,0039	0,2811	0,0078
		50	0,1836	0,0055	0,1827	0,0044	0,1852	0,0067	0,1820	0,0095



**Priloga G:** Vrednosti trans-endotelijske električne upornosti monosloja HBMEC po inkubaciji z izbranimi spojinami v različnih časovnih periodah. Celice, ki so rasle na poroznih insertih, smo za določen čas tretirali s 100  $\mu$ M (Q100), 50  $\mu$ M (Q50), 25  $\mu$ M (Q25) in 10  $\mu$ M (Q10) kvercetinom, 100  $\mu$ M epigalokatehin galatom (EGCG) in cianidin-3-glukozidom (C3G) ter 100  $\mu$ M (N100) in 50  $\mu$ M (N50) nikotinom. Transendotelijsko električno upornost (TEER) smo določili kot opisano v 3.11.3.1.1. Rezultate smo izrazili kot % vrednosti kontrole (Cnt), ki ima vrednost 100 %. \*\*P < 0,01, \*P < 0,05 v primerjavi s Cnt.

**Appendix G:** Transendothelial electrical resistance values for HBMEC monolayer after treatment with selected compounds for variable time periods. Cells grown in transwell inserts were treated for the indicated time periods with 100  $\mu$ M (Q100), 50  $\mu$ M (Q50), 25  $\mu$ M (Q25) and 10  $\mu$ M (Q10) quercetin, as well as with 100  $\mu$ M epigallocatechin gallate (EGCG) or cyanidin-3-glucoside (C3G) and nicotine at 100  $\mu$ M (N100) and 50  $\mu$ M (N50). Transendothelial electrical resistance (TEER) was evaluated as described in 3.11.3.1.2. Results are expressed as % of control (Cnt), considered as 100 %. \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 vs. control.



**Priloga H:** Vrednosti trans-endotelijske permeabilnosti monosloja HBMEC po inkubaciji z izbranimi spojinami v različnih časovnih periodah. Celice, ki so rasle na poroznih insertih, smo za določen čas tretirali s 100  $\mu$ M (Q100), 50  $\mu$ M (Q50), 25  $\mu$ M (Q25) in 10  $\mu$ M (Q10) kvercetinom, 100  $\mu$ M epigalokatehin galatom (EGCG) in cianidin-3-glukozidom (C3G) ter 100  $\mu$ M (N100) in 50  $\mu$ M (N50) nikotinom. Transendotelijsko permeabilnost (*Pe*) natrijevega fluoresceina smo določili kot opisano v 3.11.3.1.2. Rezultate smo izrazili kot % vrednosti kontrole (Cnt), ki ima vrednost 100 %. \*\*P < 0,01, \*P < 0,05 v primerjavi s Cnt.

**Appendix H:** Transendothelial permeability values for HBMEC monolayer after treatment with selected compounds for variable time periods. Cells grown in transwell inserts were treated for the indicated time periods with 100  $\mu$ M (Q100), 50  $\mu$ M (Q50), 25  $\mu$ M (Q25) and 10  $\mu$ M (Q10) quercetin, as well as with 100  $\mu$ M epigallocatechin gallate (EGCG) or cyanidin-3-glucoside (C3G) and nicotine at 100  $\mu$ M (N100) and 50  $\mu$ M (N50). Transendothelial permeability (*P*e) to sodium fluorescein was evaluated as described in 3.11.3.1.2. Results are expressed as % of control (Cnt), considered as 100 %. \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 vs. control.