

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Sabina RABZELJ

**AMINOIDNA FIBRILACIJA IN INTERAKCIJA Z
LIPIDNIMI MEMBRANAMI ČLOVEŠKEGA STEFINA B IN
IZBRANIH MUTANT *IN VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**AMYLOID FIBRILLATION AND INTERACTION WITH
LIPID MEMBRANES OF HUMAN STEFIN B AND CHOSEN
MUTANTS *IN VITRO***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2006

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega doktorskega študija na Biotehniški fakulteti, programa bioloških in biotehniških znanosti iz znanstvenega področja biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Odseku za biokemijo in molekularno biologijo Instituta Jožef Stefan v Ljubljani in na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je dne 14. 02. 2006 za mentorico doktorske disertacije imenoval doc. dr. Eva Žerovnik.

Mentorica: doc. dr. Eva Žerovnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Vito Turk
Ljubljana, Institut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo in molekularno biologijo

Članica: doc. dr. Eva Žerovnik
Ljubljana, Institut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo in molekularno biologijo

Član: prof. dr. Peter Dovč
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 12. 10. 2006

Disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sabina Rabzelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

DK UDK 547.96 : 577.3 :616.8 – 092 (043) = 863

KG proteini/stefin B/varianta in mutanti stefina B/progresivna mioklonska

epilepsija/amiloidne fibrile/prefibrilarni agregati/lipidne membrane/interakcije z membranami

AV RABZELJ, Sabina, univ.dipl.inž.živ.tehnol., mag. znanosti

SA ŽEROVNIK, Eva (mentorica)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

LI 2006

IN AMILOIDNA FIBRILACIJA IN INTERAKCIJA Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI ČLOVEŠKEGA STEFINA B IN IZBRANIH MUTANT /N VITRO

TD Doktorska disertacija - področje biotehnologija

OP XII, 75 str., 4 pregl., 32 sl., 106 vir.

IJ sl JI sl/en

AI Toksičnost amiloidov je danes v svetu že dobro poznan fenomen, za katerega velja, da so prefibrilarne konformacije tiste, ki imajo toksičen učinek na celice. Za večje razumevanje splošnih mehanizmov toksičnosti smo *in vitro* proučevali prefibrilarna stanja amiloidogenega proteina človeškega stefina B in nekaterih njegovih mutant. Opazovali smo interakcije z membranami in ugotovili, da se strukture, ki se akumulirajo v lag fazi rasti fibril pri pH 4,8 (in 3,3), močneje vežejo z modelnimi lipidnimi membranami in monosloji kot pa proteini v nativnem stanju (pri pH 7,3). Insercija prefibrilarnih agregatov/oligomer v lipidni monosloj zviša površinski pritisk v precej večji meri kot insercija proteinov v nativnem stanju. Z eksperimentoma prepuščanja kalceina iz liposomov in s površinsko plazmonske resonanco smo pokazali, da prefibrilarni agregati/oligomere precej močneje interagirajo s kislim fosfolipidom fosfatidilglicerolom kot pa z nevtralnim fosfatidilholinom. Za mutanto *Gly4Arg* se je izkazalo, da je najbolj invazivna od vseh testiranih variant stefina B. Ta mutanta je patološka oblika stefina B, opažena v progresivni mioklonski epilepsiji tipa 1, enako kot fragment *Arg68stop*, ki smo ga tudi vključili v del eksperimentov. Na osnovi CD spektrov smo opazili, da ta fragment ni zvit, za razliko od mutante *Gly4Arg*, ki se zvije kot "wild-type" protein. Razvit fragment *Arg68stop* je tudi močno nagnjen k agregaciji in fibrilaciji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

DC UDC 547.96 : 577.3 :616.8 – 092 (043) = 863

CX proteins/stefin B/variant and mutants of stefin B/progressive myoclonus epilepsy/amyloid fibrils/prefibrillar aggregates/lipid membrane/interactions with membranes

AU RABZELJ, Sabina

AA ŽEROVNIK, Eva (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty

PY 2006

TI AMYLOID FIBRILLATION AND INTERACTION WITH LIPID MEMBRANES OF HUMAN STEFIN B AND CHOSEN MUTANTS *IN VITRO*

DT Doctoral Dissertation

NO XII, 75 p., 4 tab., 32 fig., 106 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Amyloid-induced toxicity is a well known phenomenon and it is believed that prefibrillar species are responsible for the toxic effect on cells. To better understand the common mechanisms, the prefibrillar states of an amyloidogenic protein human stefin B and some of its mutants were examined *in vitro*. By observing interactions with membranes we were able to show that the lag phase species obtained at pH 4.8 (and pH 3.3) exhibit stronger binding to model lipid membranes and monolayers than the proteins in the native states (at pH 7.3). The insertion of prefibrillar aggregate/oligomers into the lipid monolayer generates much higher increase in surface pressure than the insertion of the native state proteins. They interact particularly strong with an acidic phospholipid phosphatidylglycerol as shown by calcein release experiments and surface plasmon resonance. The *Gly4Arg* mutant is the most reactive species from all the tested variants of stefin B. This mutant is a pathological form of stefin B protein, observed in progressive myoclonus epilepsy of type 1, the same like the *Arg68stop* fragment, which was also included in some of our experiments. CD spectra have shown that this fragment is not folded, in contrast to the *Gly4Arg* mutant, which folds like wild type. The unfolded fragment *Arg68stop* is also highly prone to aggregation and fibrillation.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
 1	 1
1.1 RAZISKOVALNI PROBLEM IN NAMEN RAZISKAVE	1
1.2 HIPOTEZI	2
 2	 3
2.1 AGREGACIJA PROTEINOV IN AMILOIDNE BOLEZNI	3
2.1.1 Potek in kontrola zvitja proteinov	4
2.1.2 Motnje pri zvijanju proteinov vodijo v agregacijo	6
2.1.2 Agregacija proteinov in formiranje fibrilarnih struktur	7
2.1.3 Značilnosti amiloidnih fibril	9
2.1.5 Stopnje agregacije in toksična funkcija agregatov	10
2.1.6 Celične membrane so primarne tarče citotoksičnosti prefibrilarnih agregatov	13
2.1.7 Preobremenitev zaščitnega sistema s strani agregiranih proteinov	14
2.2 ČLOVEŠKI STEFIN B - MODELNI PROTEIN ZA ŠTUDIJ AMILOIDNE FIBRILACIJE	15
2.2.1 Fiziološka vloga človeškega stefina B	15
2.2.2 Amiloidne fibrile stefina B	15

2.3	DOSLEJ POZNANA PATOLOGIJA NA ČLOVEŠKEM STEFINU B: MIOKLONSKA EPILEPSIJA TIPO UNVERRICHT-LUNDBORG	17
2.3.1	Študije na patogenih mutantah	18
3	MATERIAL IN METODE	19
3.1	MATERIAL	19
3.1.2	Najpogosteje uporabljene raztopine	20
3.1.3	Laboratorijska oprema	20
3.2	METODE	21
3.2.1	Priprava rekombinantnih proteinov	21
3.2.2	Merjenje UV CD spektrov	21
3.2.2.1	Denaturacija z organskim topilom TFE	22
3.2.3	ThT fluorescenca	23
3.2.4	Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)	23
3.2.5	Priprava prefibrilarnih agregatov in nativnih proteinov za membranske študije	24
3.2.6	Insercije proteinov v lipidni monosloj	24
3.2.6.1	Lipidi v bioloških membranah	24
3.2.6.2	Uporabnost lipidnih monoslojev	25
3.2.6.3	Merjenje pritiska na površino lipidnega monosloja	26
3.2.7	Permeabilnost liposomov	27
3.2.7.1	Orientacija lipidnih molekul v vodni fazi	27
3.2.7.2	Priprava liposomov	28
3.2.7.3	Sproščanje kalceina iz majhnih unilamelarnih lipidnih veziklov	29
3.2.8	Merjenje površinske plazmonske rezonance	30
3.2.8.1	Osnove tehnologije Biacore	30
3.2.8.2	Vezava stefina B in izbranih mutant na dvoslojne lipidne membrane	32
4	REZULTATI	33

4.1	DOLOČANJE STRUKTURE FRAGMENTA <i>Arg68stop</i> NA OSNOVI UV CD SPEKTROV	33
4.1.1	Bližnji UV CD spektri	34
4.1.2	Daljni UV CD spektri	34
4.2	SPREMEMBA V SEKUNDARNI STRUKTURI FRAGMENTA <i>Arg68stop</i> POD VPLIVOM TFE	35
4.3	KINETIKA AMILOIDNE FIBRILACIJE	37
4.4	MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA FIBRIL S TEM	39
4.5	INTERAKCIJE Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI	41
4.5.1	Priprava prefibrilarnih agregatov	41
4.5.2	Insercije v lipidne monosloje	42
4.5.3	Permeabilnost majnih unilamelarnih veziklov	47
4.5.4	Vezava na dvoslojne lipidne membrane	49
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1	RAZPRAVA	53
5.1.1	Fragment stefina B do mesta 68 vodi v razvito konformacijo proteina	53
5.1.2	Možni zapleti pri patologiji progresivne mioklonske epilepsije tipa 1	54
5.1.3	Lipidne membrane kot primarne tarče toksične aktivnosti prefibrilarnih agregatov	56
5.1.3.1	Permeabilnost lipidnih veziklov	57
5.1.3.2	Insercija v monoslojne in vezava na dvoslojne lipidne membrane	58
5.2	SKLEPI	59
6	POVZETEK	61
6.1	POVZETEK	61
6.2	SUMMARY	62
7	VIRI	65

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Molske mase, ekstinkcijski koeficienti in povprečne molske mase aminokislin.	33
Pregl. 2: Kritični pritiski pri inserciji proteinov v lipidne monosloje. Proteini pri pH 4,8 so prefibrilarni, pri pH 7,3 pa nativni.	45
Pregl. 3: Kritični pritiski pri inserciji posameznih oligomer WT stefina B pri pH 7,3 v monosloje POPG.	46
Pregl. 4: Kritični pritiski pri inserciji posameznih oligomer mutante G4R pri pH 7,3 v lipidne monosloje POPG.	46

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Osnovni model zvitja proteinov (Ptitsyn, 1995).	3
Sl. 2: Zvitje in usmerjanje proteinov v endoplazmatskem retikulumu (Dobson, 2003).	5
Sl. 3: (A) Molekularni model amiloidne fibrile (krioelektronska mikroskopija). (B) Prečni prerez fibrile (Jimenez in sod., 1999).	9
Sl. 4: Shematska predstavitev splošnega mehanizma agregacije do amiloidnih fibril (Dobson, 2003).	11
Sl. 5: TEM sliki prefibrilarnih oligomernih agregatov človeškega stefina B (Anderluh in sod., 2005).	16
Sl. 6: Struktura glicerofosfolipida DOPC.	25
Sl. 7: (A) Orientacija fosfolipidov na mejni površini zrak-voda. (B) MicroTrough-S sistem.	26
Sl. 8: Shematski prikaz injiciranja in penetracije molekul proteina v lipidni monosloj.	27
Sl. 9: Strukturna organizacija lipidnih molekul.	28
Sl. 10: Strukturna formula kalceina $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$.	29
Sl. 11: (A) Senzorski čip. (B) Lipidna membrana.	31
Sl. 12: (A) Tehnologija Biacore. (B) SPR eksperiment.	32
Sl. 13: CD spektri proteinov v bližnjem UV območju z $A_{280}=1,2$ v 10 mM natrijevem fosfatnem pufru, pH 7.	34
Sl. 14: CD spektri proteinov v dalnjem UV območju z $A_{280}=0,1$ v 10 mM natrijevem fosfatnem pufru, pH 7.	35
Sl. 15: Vpliv TFE na konformacijo fragmenta R68stop z $A_{280}=0,22$ v 15 mM natrijevem acetatnem pufru, pH 4,8.	36
Sl. 16: Vpliv TFE na sekundarno strukturo fragmenta R68stop. Denaturacijska krivulja pri 220 nm.	36
Sl. 17: Amiloidna fibrilacija WT stefina B, variante E31Y in mutante G4R pri pH 4,8 v prisotnosti 9 % TFE.	37

Sl. 18:	Amiloidna fibrilacija fragmenta R68stop pri pH 4,8 v prisotnosti 0 in 3 % TFE.	38
Sl. 19:	TEM slike struktur v lag in stacionarni fazi reakcije fibrilacije mutante G4R in WT stefina B.	39
Sl. 20:	TEM slike amiloidne formacije fragmenta R68stop pri pH 4,8.	40
Sl. 21:	Določanje prisotnih oligomer v raztopini proteinov z gelsko filtracijo na Superdex 75 HR koloni (FPLC).	41
Sl. 22:	Kinetike insercij v lipidne monosloje pri začetnem površinskem pritisku 10 mN/m.	42
Sl. 23:	Grafični prikaz kritičnih pritiskov pri inserciji proteinov v lipidne monosloje.	44
Sl. 24:	Kinetike insercij v lipidne monosloje za WT stefin B, pH 7,3.	45
Sl. 25:	Insercija posameznih oligomer WT stefina B v lipidne monosloje POPG, pH 7,3.	46
Sl. 26:	Insercija posameznih oligomer mutante G4R v lipidne monosloje POPG, pH 7,3.	46
Sl. 27:	Permeabilnost majhnih unilamelarnih veziklov iz DOPC oz. POPG lipidov po prekonočni inkubaciji.	48
Sl. 28:	Koncentacijsko odvisna vezava prefibrilarnih agregatov WT stefina B, pripravljenih pri pH 4,8, na liposome POPG.	50
Sl. 29:	Koncentacijsko odvisna vezava prefibrilarnih agregatov variante E31Y, pripravljenih pri pH 4,8, na liposome POPG.	50
Sl. 30:	Koncentacijsko odvisna vezava prefibrilarnih agregatov mutante G4R, pripravljenih pri pH 4,8, na liposome POPG.	51
Sl. 31:	Vezave WT stefina B, variante E31Y in mutante G4R v nativnem in prefibrilarnem stanju pri 70 µM koncentraciji na liposome POPG.	51
Sl. 32:	Vezave WT stefina B, variante E31Y in mutante G4R v nativnem in prefibrilarnem stanju pri 60 µM koncentraciji na liposome POPG in DOPC.	52

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_x	absorbanca pri valovni dolžini x
A-β	Alzheimerjev β protein
AFM	mikroskopija na atomsko silo
BSA	goveji serumski albumin
CD	circularni dihroizem
Da	dalton (enota za molekulska maso)
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoholin
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EPM 1	progresivna mioklonska epilepsija tipa Unverricht-Lundborg
EtOH	etanol
ε₂₈₀	molarni ekstinkcijski koeficient
E₂₈₀	ekstinkcijski koeficient
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov pod zvišanim tlakom
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
kalcein	fluorescein-metilen-iminodiacetatna kislina
MeOH	metanol
mRNA	sporočilna RNA
M_{MRW}	povprečna molska masa aminokisline
NaCl	natrijev klorid
NaDS	natrijev dodecilsulfat
Na₂HPO₄ x 2H₂O	dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat
NaH₂PO₄ x 2H₂O	natrijev dihidrogenfosfat dihidrat
NaOAc	natrijev acetat
NaOH	natrijev hidroksid
Na₂SO₄	natrijev sulfat
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]
ROS	reakтивni oksidacijski delci

TEM	transmisijski elektroski mikroskop
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
ThT	Tioflavin T
Tris	tris-hidroksimetil-aminometan
Triton X-100	oktilfenol-polietilenglikol eter
Θ	eliptičnost
[Θ]_{MRW}	molarna eliptičnost peptidne enote
3D struktura	tridimenzionalna struktura

AMINOKISLINSKA ABECEDA

A	Ala	alanin
C	Cys	cistein
D	Asp	aspartat ali asparaginska kislina
E	Glu	glutamat ali glutaminska kislina
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
K	Lys	lizin
L	Leu	levcin
M	Met	metionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
V	Val	valin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin

1 UVOD

1.1 RAZISKOVALNI PROBLEM IN NAMEN RAZISKAVE

Človeški stefin B je po svoji osnovni funkciji inhibitor cisteinskih proteinaz, a njegova fiziološka vloga še ni povsem pojasnjena. Prisoten je skoraj v vseh celicah in tkivih, vendar le v malih možganih pride pri zmanjšani ekspresiji tega gena do bolezenskega stanja. Nekatere mutacije v genu za stefin B, ki posledično vplivajo na zmanjšanje funkcije tega proteina, vodijo v pojav progresivne mioklonske epilepsije tipa Unverricht-Lundborg (EPM1), ki je do sedaj edina poznana patologija tega proteina. EPM1 je degenerativna bolezen centralnega živčnega sistema in dedna oblika epilepsije, ki se običajno izrazi med 6. in 15. letom starosti s klinični simptomi, kot so mioklonični in tonično-klonični krči, progresivna nevrološka disfunkcija in ataksija. Primarne spremembe na ravni celice in mehanizem toksičnosti te bolezni so še precej nepoznani. Vsem obolelim je skupno znižanje vsebnosti mRNA stefina B, posledično se sintetizira manj proteina, kar tudi zmanjša njegovo inhibitorno vlogo, na drugi strani pa se poveča aktivnost katepsinov.

Večina bolnikov z EPM1 ima v promotorski regiji gena za stefin B motnjo zaradi ponavljače se sekvence dodekamera, kar vpliva na zmanjšanje izražanja tega gena. V kodirajočem delu gena za stefin B so do sedaj poznane štiri mutacije, ki imajo za posledico spremenjeno aminokislinsko sestavo stefina B. Pri nekaterih bolnikih z EPM1 se pojavitva *Gly4Arg* in zamenjava kodona za *Arg68* v translacijski stop kodon, kar prekine sintezo proteina na tem mestu. Ti dve mutanti smo vključili v našo raziskavo z namenom, da bi prispevali svoj delež k večjemu razumevanju vzrokov za patologijo te bolezni.

Po drugi strani pa smo žeeli prispevati k raziskavam t.i. konformacijskih bolezni. Zavedamo se perečega svetovnega problema amiloidoz in nevrodgenerativnih bolezni, pri katerih pride do napačnega zvitja proteinov. Ti zaradi izpostavljenih hidrofobnih in aromatskih aminokislinskih ostankov, ki so običajno skriti v notranjosti strukture, agregirajo, polimerizirajo in mnogi od njih tvorijo netopne amiloidne fibrile. Fibrile običajno interagirajo s proteini in proteoglikani iz citoplazme ali ekstracelularnega matriksa in tvorijo celične inkluzije ali izvencelične amiloidne plake. Plaki se nalagajo v obolelih organih, zaradi česar se spremeni zgradba in funkcija tkiva. V zadnjem času pa vse več študij nakazuje, da so amiloidogeni proteini v

prefibrilarni oblici celo bolj toksični za celice kot pa fibrilarne strukture, kar pa ni omejeno samo na patološke proteine. Za amiloidne agregate je značilno, da imajo visoko nagnjenost k interakcijam s celičnimi membranami. Ker je bilo ugotovljeno, da se tudi *in vivo* neamiloidogeni proteini lahko pod določenimi pogoji obnašajo podobno, so tovrstne preliminarne *in vitro* študije zelo dobrodošle. To je bil tudi povod k naši raziskavam. Poudarek doktorskega dela je na študijah vezave stefina B in nekaterih njegovih mutant, v nativni in agregirani konformaciji, na lipidne membrane.

1.2 HIPOTEZI

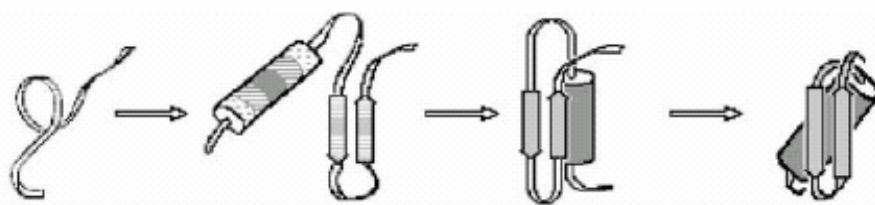
Do sedaj še ni poznano, kateri molekularni mehanizmi so vzrok za patološke spremembe na ravni celice pri Unverricht-Lundborgovi bolezni. Naša raziskovalna hipoteza bazira na tem, da gre morda pri nekaterih patogenih mutantah prav tako za nepravilno zvitje in agregacijo, kot je to značilno za druge nevrodegenerativne bolezni (Čeru in sod., 2005). Menimo, da bi do znižanja aktivnosti stefina B delno lahko prišlo tudi zaradi agregacije, kar bi vodilo do znakov EPM1 in celične degeneracije v cerebelumu. Nadejamo se, da bo proučevanje *in vitro* lastnosti dveh EPM1 mutant (*Gly4Arg* in *Arg68stop*) vsaj delno pomagalo osvetliti to bolezen na molekularnem nivoju.

Druga hipoteza je povezana s problematiko citotoksičnosti prefibrilarnih agregatov. V našem delu predpostavljamo, da je toksičnost amiloidnih proteinov najverjetneje povezana s povečano prepustnostjo membran ali vsaj s spremembjo potenciala ob membranah. Predvidevamo, da se agregati močneje vežejo na membrane kot nativni proteini in da se bolj vežejo tisti proteini, ki imajo daljšo lag fazo fibrilacije, v kateri se akumulirajo te prefibrilarne strukture. Preverjanje te hipoteze bo vodilo do bolj splošnih zaključkov o naravi toksičnosti amiloidnih proteinov.

3 PREGLED OBJAV

3.1 AGREGACIJA PROTEINOV IN AMILOIDNE BOLEZNI

Proteini so poleg vode najbolj pogosta molekula v biologiji. Naš organizem vsebuje več kot 100.000 različnih vrst proteinov, ki katalizirajo, opravljamajo ali nadzorujejo vse življensko pomembne kemične procese (Dobson, 2001). Po sintezi na ribosomih se mora vsaka molekula proteina zviti v specifično konformacijo (slika 1), da je sposobna opravljati svojo biološko funkcijo. Zvijanje proteinov je dolgo veljalo za eno največjih ugank v biologiji. Kodo za zvitje vsebuje aminokislinsko zaporedje samega proteina, tako so proteini v večini sposobni zavzeti svojo pravilno 3D strukturo brez prisotnosti drugih faktorjev (Anfinsen, 1973).



Slika 1: Osnovni model zvitja proteinov. Sekundarne strukture so prikazane kot valj (α -heliks) in puščici (β -trakovi). Razvita veriga → formiranje sekundarne strukture (intermediat z značilnostmi razrahljanega klobčiča) → intermediat s sekundarno strukturo podobno nativnemu stanju → nativna 3D konformacija (Ptitsyn, 1995).

Figure 1: Framework model of stepwise protein folding (Ptitsyn, 1995).

Včasih se proteini v živih sistemih ne uspejo pravilno zviti ali ostati v zvitem stanju, kar ima lahko za posledico širok spekter bolezni. Amiloidne bolezni (amiloidoze) so obsežna skupina bolezni, pri katerih gre za odlaganje agregiranih proteinov v različnih organih (Dobson, 2001). Obstajajo tako sistemske kot lokalne amilidoze, pri katerih pride do tvorbe amiloidnih fibril kot posledica kopiranja napačno zvitih proteinov na ravni celotnega organizma ali lokalno. Vzrok agregacije je lahko mutacija, sprememba pH ali temperature, oksidacija, proteoliza ali pa kadar v celici odpovejo posttranslacijski kontrolni mehanizmi (Stefani in Dobson, 2003). Proteini, ki so v običajnih razmerah topni, polimerizirajo in tvorijo netopne fibrile, ki skupaj s proteini in proteoglikani iz citoplazme ali ekstracelularnega matriksa tvorijo amiloidne skupke, kar spremeni zgradbo in funkcijo tkiva (Gustafson, 1992).

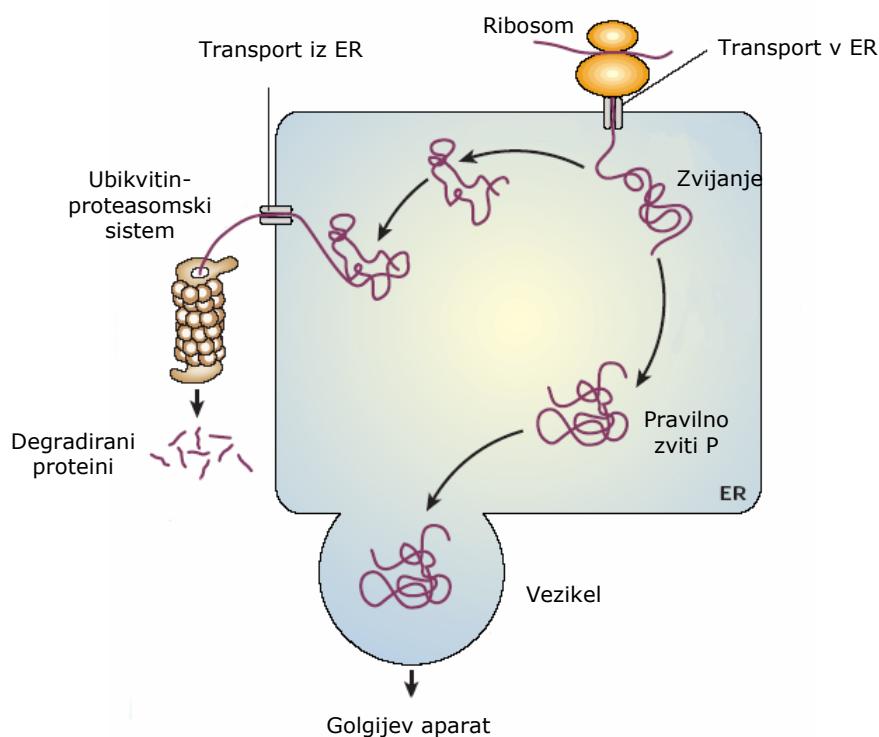
3.1.1 Potek in kontrola zvitja proteinov

Proteini se v celici sintetizirajo na osnovi genetske informacije, ki je zakodirana v jedrni DNA. DNA molekula v celici služi kot matrica, na osnovi katere se sintetizirajo sporočilne mRNA molekule, ki imajo vlogo posrednika med geni in proteini. Nukleotidno zaporedje mRNA je tako komplementarno zaporedju gena, od katerega se prepiše. mRNA potuje iz jedra v citoplazmo, kjer se na ribosomih sintetizirajo proteini. Ribosomi so nespecifična komponenta procesa translacije, ki prepozna in se vežejo na mRNA, nudijo struktурno oporo, hkrati pa katalizirajo kemijsko reakcijo, v kateri se aminokisline kovalentno povezujejo druga z drugo v zaporedju, ki ga določa nukleotidni zapis mRNA.

Zvijanje proteinov v nekaterih primerih sovpada s translacijo in se iniciira še pred dokončno sintezo, medtem ko je nastajajoča veriga še vedno pritrjena na ribosom (Hardesty in Kramer, 2001). Nekateri proteini se zvijejo v citoplazmi, drugi pa v specifičnih celičnih razdelkih (v mitohondriju ali endoplazmatskem retikulumu) po razmeščanju in translokaciji čez membrane (Bukau in Horwich, 1998; Hartl in Hayer-Hartl, 2002). Čeprav veljajo splošni principi za proces zvitja, je zvitje v veliki meri odvisno od specifičnega okolja, v katerem se protein zvije. Pri tem velja poudariti, da so nepopolno zviti proteini bolj izpostavljeni topilu, zlasti tisti deli strukture, ki so v nativnem stanju običajno skriti v notranjosti. Kot taki so nagnjeni k neugodnim interakcijam tudi z drugimi molekulami znotraj prenapolnjenega celičnega okolja (Ellis, 2001), kjer je koncentracija makromolekul tudi do 300-400 mg/ml (Ellis in Minton, 2003).

V ta namen so živi sistemi razvili vrsto strategij, da bi preprečili napačno ali nepopolno zvitje. Ena od teh so molekulski šaperoni, ki so prisotni v vseh tipih celic in celičnih razdelkih. Nekateri od njih interagirajo z nastalo polipeptidno verigo, ko se le-ta odcepi od ribosoma, medtem ko so drugi vključeni v nadziranje kasnejših stopenj pri procesu zvitja. Šaperoni pogosto delujejo eden za drugim, da bi zagotovili popolno učinkovitost vsakega od korakov zvijanja (Bukau in Horwich, 1998; Hartl in Hayer-Hartl, 2002). Sami ne pospešujejo hitrosti zvitja, povečujejo pa učinkovitost celotnega procesa, tako da zaščitijo nepopolno zvite polipeptidne verige in na ta način zmanjšujejo možnost konkurenčnih interakcij, zlasti tistih, ki imajo za posledico agregacijo. Obstajajo tudi t.i. katalizatorji, ki pa pospešujejo potencialno počasne korake zvitja. Najpomembnejši med njimi so *peptidil prolil cis-trans izomeraze*, ki

pospešujejo hitrost cis-trans izomerizacije peptidnih vezi, ki vsebujejo prolin in pa *disulfidne izomeraze*, ki povečujejo hitrost sestavljanja in reorganizacije disulfidnih mostičkov (Schiene in Fischer, 2000). Nekateri šaperoni imajo tudi sposobnost, da napačno zvite ali celo že agregirane proteine delno razvijejo in jim na ta način dajo še eno možnost, da se pravilno zvijejo (Bukau in Horwich, 1998; Hartl in Hayer-Hartl, 2002). Za tako aktivno vlogo v procesu zvitja je potrebna energija v obliki ATP-ja, prav tako tudi za molekulske šaperone da delujejo s polno učinkovitostjo.



Slika 2: Zvitje in usmerjanje proteinov v endoplazmatskem retikulumu (Dobson, 2003).

Figure 2: Regulation of protein folding in the ER (Dobson, 2003).

V evkariontskih sistemih se mnogi proteini, ki so bili sintetizirani v celici, izločijo v ekstracelularni prostor (t.i. sekretorni proteini). Novo sintetizirani proteini, ki jih označuje posebna N-terminalna sekretorna signalna sekvenca, se najprej translocirajo v endoplazmatski retikulum (slika 2), kjer se zvijejo v svojo nativno strukturo s pomočjo šaperonov in katalizatorjev zvitja, ki so v tem celičnem organelu prisotni v izobilju. Preden se proteini, ki se tu zvijejo, eksportirajo, so podvrženi mehanizmu kontrole kvalitete, ki vključuje reakcije glikozilacije in deglikozilacije, kar omogoči ločevanje med pravilno in napačno zvitimi proteinimi. Poleg tega so v ER tudi specializirani proteini, ki skrbijo za sortiranje in usmerjanje proteinov ali po sekretorni

poti ali pa za degradacijo - v primeru napačnega zvitja. Pravilno zviti proteini se transportirajo v Golgijev aparat, nato pa se izločijo v ekstracelularni prostor. Napačno zviti proteini, ki so označeni za degradacijo, pa se eksportirajo iz endoplazmatskega retikuluma v citoplazmo, kjer se najprej ubikvitinirajo, nato pa v proteasomu degradirajo (Hammond in Helenius, 1995; Kaufman in sod. 2002). Proteasom velja za največji celični kompleks za razgradnjo proteinov. Ima obliko sodčka, ki ga na obeh straneh pokrivata kapi. Razgradnja proteinov poteka v notranjosti sodčka, kjer so razmeščena aktivna mesta encimskih podenot. Nastajajo peptidi, ki so dolgi v povprečju od 7 do 9 aminokislinskih ostankov in se nato izločijo iz sodčka. Proteasom rragradi le tiste proteine, ki so označeni z večjim številom zaporedno kovalentno vezanih molekul ubikvitina na lizin in pridejo do sodčka proteasoma v razviti obliki. To sta varnostna mehanizma, ki preprečujejo, da bi proteasom razgrajeval kar vse proteine po vrsti (Baumeister in sod., 1998).

V živi celici obstaja poleg potrebe po sintezi, tudi stalna potreba po degradaciji proteinov. Degradacijski mehanizem je usmerjen na eni strani na napačno zvite proteine, na drugi strani pa na tiste proteine, ki so v presežku. Pri procesih, ki zahtevajo razvitje ali proteolizo polipeptidne verige, je večja verjetnost, da pride do agregacije. Da bi se temu izognili, so degradacijske poti, kot je ubikvitin-proteasomski sistem, močno regulirane (Sherman in Goldberg, 2001; Bence in sod., 2001). Tako kot nenavadno obnašanje encimov lahko povzroči metabolno bolezen, lahko tudi neobičajno vedenje šaperonov in ostalega sistema za regulacijo zvitja in degradacije pomembno prispeva k napačnemu zvitju in agregacijskim boleznim (Macario in de Macario, 2002).

3.1.2 Motnje pri zvijanju proteinov vodijo v agregacijo

In vivo se zvitje začne že hkrati z nastajajočo verigo, ki se sintetizira na ribosому, *in vitro* pa iz popolno nastale polipeptidne verige, ki je bila razvita, ponavadi s pomočjo kemičnega denaturanta, kot je urea. V obeh primerih je polipeptidna veriga v močno neurejenem stanju preden se zvitje začne (Shortle, 1996; Smith in sod., 1996). Da doseže nativno stanje, mora molekula proteina najti pot do svoje edinstvene konformacije kljub številnim alternativnim možnostim (Karplus, 1997). Pri iskanju in vzpostavljanju stabilnih, nativnemu stanju podobnih kontaktov med aminokislinskimi ostanki, lahko pride tudi do napačnega zvitja. Z velikostjo in kompleksnostjo proteinov se povečuje tudi kompleksnost zvitja (Ellis in Hartl, 1999).

Zvitje in razvitje proteinov sta tesno povezana z mnogimi ključnimi dogodki pri funkcioniranju biološkega sistema: tako pri translokaciji proteinov čez membrane in razmeščanju v celici, pri sekreciji ekstracelularnih proteinov, pa tudi pri kontroli in regulaciji celičnega cikla (Radford in Dobson, 1999). Če se proteini pri fizioloških pogojih ne uspejo zviti oz. razviti tam, kjer je to potrebno, je to zadosten razlog za motnjo v delovanju in posledično bolezen (Thomas in sod., 1995; Dobson, 1999).

Delno ali popolnoma razviti polipeptidi so tisti, ki so močno nagnjeni k agregaciji. Te strukture so naravno prisotne pri procesu zvitja, zato so takrat molekulski šaperoni v tistem celičnem razdelku prisotni v izobilju. V ekstracelularnem prostoru je poznan samo en glikoprotein *klusterin*, ki deluje na podoben način (Wilson in Easterbrook-Smith, 2000). Zato je pomembno, da so pred sekrecijo iz celice proteini pravilno zviti. Od tu tudi potreba po visoko učinkovitem sistemu kontrole kvalitete v endoplazmatskemu retikulumu. Večina bolezni, povezanih z amiloidno formacijo, temelji ravno na teh ekstracelularnih depozitih (Tan in Pepys, 1994, cit. po Dobson, 2004).

V zadnjem času se število bolezni zaradi napačnega zvitja proteinov povečuje. Na eni strani so to bolezni, ki se pojavijo kot posledica tega, da se proteini niso uspeli pravilno zviti in kot taki niso sposobni opravljati svoje funkcije. Tak primer sta cistična fibroza (Thomas in sod., 1995) in nakatere oblike raka (Bullock in Fersht, 2001). V nekaterih drugih primerih pa proteini z veliko nagnjenostjo k napačnemu zvitju ubežijo vsem zaščitnim mehanizmom in tvorijo "reaktivne" aggregate znotraj celice ali, kar je še pogosteje, v ekstracelularnem prostoru. Vse večje število motenj, vključno z Alzheimerjevo in Parkinsonovo boleznjijo, spongiformnimi encefalopatijami in diabetesom tipa II, je direktno povezanih z odlaganjem aggregatov napačno zvitih proteinov (Dobson, 2001; Horwich, 2002; Kelly, 1996).

3.1.3 Agregacija proteinov in formiranje fibrilarnih struktur

Pri globularnih proteinih so glavna polipeptidna in stranske hidrofobne verige v večji meri skrite v notranjosti zvite strukture. Kadar pa so izpostavljene, t.j. ko je protein vsaj delno razvit ali fragmentiran, takrat je možen prehod v amiloidne fibrile. Fibrile, ki se nahajajo v *ex vivo* depozitih, se lahko reproducirajo tudi *in vitro*, če je določen protein izpostavljen ustreznim pogojem. To kaže na sposobnost samo-asociacije proteina, brez prisotnih drugih komponent. Vrsto let se je domnevalo, da ima

sposobnost formiranja amiloidnih fibril le relativno majhno število proteinov, predvsem tisti, ki so bili opaženi pri bolezenskih stanjih, in da imajo ti specifične sekvenčne motive, ki kodirajo jedro amiloidne strukture. Študije zadnjih nekaj let pa vse bolj nakazujejo v smeri, da je sposobnost formiranja amiloidnih struktur splošna lastnost polipeptidne verige (Chiti in sod., 1999; Dobson, 1999). Fibrile lahko tvorijo tudi proteini, ki niso povezani z bolezni, vključno z dobro poznanim mioglobinom (Fändrich in sod., 2001) in homopolimeri, kot sta politreonin in polilizin (Fändrich in Dobson, 2002). Tudi peptidi s samo nekaj aminokislinskimi lahko tvorijo fibrile, ki izgledajo podobno kot tiste, ki vključujejo velike proteine (Lopez in sod., 2002). Res pa je, da se v teh primerih fibrilacija zgodi le v ekstremnih okoliščinah.

In vivo amiloidno fibrilacijo največkrat inducira zmanjšana stabilnost proteina, ki je posledica bodisi mutacije, lokalne spremembe pH ob membranah ali pa oksidativnega oz. temperaturnega stresa. *In vitro* lahko proteine delno razvijemo z variacijo pogojev topila - s sprememboto pH ali z dodatkom organskega topila, razvite polipeptide pa delno zvijemo z znižanjem pH ali s segrevanjem (Žerovnik, 2002d). Tudi fragmentiranje proteinov (npr. s proteolizo) predstavlja pripraven mehanizem za stimulacijo amiloidne formacije. Tako pri mnogih amiloidnih motnjah prihaja do agregacije fragmentov večjih prekurzorskih proteinov, ki se sami zase, ob odsotnem ostalem delu molekule, niso sposobni zviti. Tako je npr. pri Alzheimerjevi bolezni, kjer pride do cepitve amiloidnega perkurzorskoga proteina z β in γ sekretazo. Pri tem nastaja amiloid- β peptid iz 40 oz. 42 aminokislinskih ostankov, ki je lahko v majhnih količinah celo nevrazaščiten, pri višjih koncentracijah pa agregira in se akumulira v amiloidnih plakih v krvnih žilah možganov (Walsh in Selkoe, 2004).

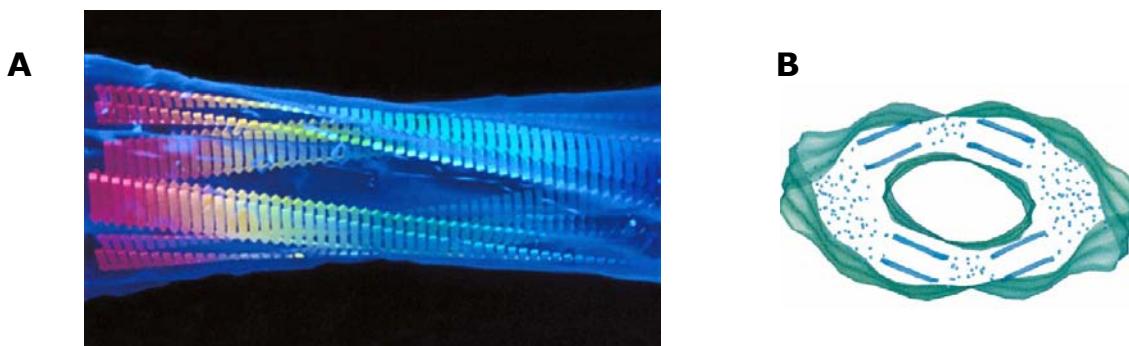
Podrobnosti posameznih korakov v procesu fibrilacije še niso v celoti poznane, so pa opažene mnoge skupne značilnosti. Za začetek rasti fibril je značilna počasna lag faza, ki ji sledi hitra eksponentna rast. Lag faza se lahko skrajša ob prisotnosti že formiranih fibril, ki delujejo kot seme. To lahko tudi pojasni zakaj nekatere konformacijske bolezni, kot je npr. Alzheimerjev sindrom, napredujejo zelo hitro, ko se enkrat začetni simptomi začnejo izražati (Harper in Lansbury, 1997).

Skupna lastnost bolezni, povezanih z agregacijo (uporabljam tudi termin konformacijske bolezni) je ta, da gre za odlaganje proteinov v obliki amiloidnih fibril in plakov. Ti depoziti se kopijo ali v vitalnih organih, kot so možgani, srce, jetra in vranica ali pa v skeletnem tkivu (odvisno od bolezni). Vsebnost agregatov je lahko v

primeru nevrodegenerativnih motenj pod mejo detekcije, medtem ko so pri sistemskih boleznih vključeni celo kilogrami proteina v takih depozitih. Vsaka amloidna bolezen temelji na agregaciji specifičnega proteina, poleg tega pa je v depozite vključena tudi cela vrsta drugih proteinov in proteoglikanov (Tan in Pepys, 1994, cit. po Dobson, 2003). Zanimivo je, da imajo agregirane oblike proteinov, ki se pojavljajo v amiloidozah, mnoge skupne značilnosti, medtem ko se osnovne značilnosti topnih oblik proteinov med seboj bistveno razlikujejo. To so lahko globularni proteini z dobro definirano 3D strukturo, zelo nestrukturirane peptidne molekule, pa tudi nativno razviti proteini (Dobson, 2003).

3.1.4 Značilnosti amloidnih fibril

Vse fibrilarne strukture imajo zelo podobno morfologijo. Gre za dolge, ravne, gladke, nerazvejane in pogosto prepletene strukture, premera nekaj nm, ki imajo značilen vzorec "navzkrižne-beta strukture", kot je bilo ugotovljeno z rentgensko difrakcijo (Sunde in Blake, 1997, cit. po Dobson, 2004). Struktura je sestavljena iz vzporednih β -plošč (slika 3), ki so pravokotne na os fibrile (Jimenez in sod., 1999). Vsi amloidni depoziti imajo tudi specifične optične lastnosti pri vezavi določenih molekul barvila, kot sta Kongo rdeče, ki se uporablja pri diagnosticiranju in pa Tioflavin T za *in vitro* študije, ter so odporni na proteolitsko razgradnjo (Johansson, 2003).



Slika 3: (A) Molekularni model amloidne fibrile (krioelektronska mikroskopija). Fibrila je sestavljena iz štirih protofilamentov, ki se prepletajo eden okoli drugega in formirajo votlo cev. Model ponazarja enega izmed načinov, kako se lahko deli polipeptidne verige, ki so vključeni v formiranje β -plošč, sestavlajo znotraj fibrile. (B) Prečni prerez fibrile (Jimenez in sod., 1999).

Figure 3: (A) A molecular model of an amyloid fibril. (B) Cross-section of the fibril (Jimenez in sod., 1999).

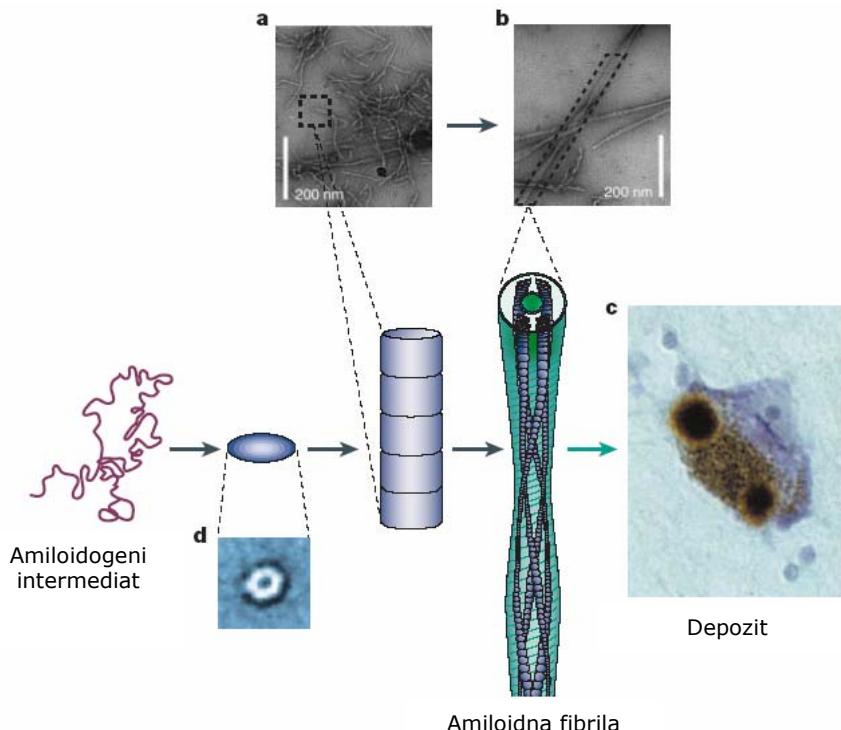
Jedro amloidne strukture primarno stabilizirajo vodikove vezi (med karbonilnim kisikom in amidnim vodikom), kar vključuje glavno polipeptidno verigo. Ker je le-ta

skupna vsem proteinom, to razloži dejstvo, zakaj so si fibrile, ki nastanejo iz polipeptidov z različnimi primarnimi strukturami, med seboj podobne. Stranske verige se znotraj amiloidne strukture vgradijo na način, ki je najbolj ugoden za določeno zaporedje, s tem pa vplivajo le na podrobnosti v sestavljanju fibril, ne pa na njihovo splošno strukturo (Chamberlain in sod., 2000). Delež polipeptidne verige, ki je vgrajena v jedro amiloidne strukture, lahko znatno variira, v nekaterih primerih gre tudi samo za nekaj aminokislin (Dobson, 1999) in so ostali deli še vedno zviti (Nelson in sod., 2005).

Čeprav sposobnost formiranja amiloidnih fibril velja za splošno lastnost polipeptidne verige, nagnjenost k temu zelo variira pri različnih aminokislinskih zaporedjih. Nekatere aminokisline so bolj topne kot druge, tako da je koncentracija proteina, ki je potrebna za začetek agregacije, pri enih polipeptidih lahko dosti večja kot pri drugih. Pri procesu agregacije se mora najprej tvoriti jedro, hitrost tega procesa pa je tudi odvisna od mnogih dejavnikov. Celo zamenjava ene same aminokisline v proteinu lahko močno pospeši hitrost agregacije. To je možno, ker ima lahko taka sprememba pomemben vpliv na naboj, na nagnjenost k tvorbi sekundarne strukture ali na hidrofobnost. V splošnem velja, da manjši skupni naboj, večja hidrofobnost polipeptidne verige in večja nagnjenost k pretvorbi α -heliksa v β -strukturo povečujejo nagnjenost k fibrilaciji (Chiti in sod., 2003).

3.1.5 Stopnje agregacije in toksična funkcija agregatov

Prva faza agregacije vključuje formiranje oligomernih struktur in se običajno pojavi kot posledica relativno nespecifičnih interakcij. V nekaterih primerih gre lahko tudi za specifične strukturne prehode, kot so npr. prepletene domene (Schlunegger in sod., 1997), kar pospešuje hitrost agregacije. Ti prvi agregati so relativno neorganizirane strukture z izpostavljenimi različnimi segmenti proteina, ki so v globularni konformaciji običajno skriti (Caughey in Lansbury, 2003). Prve strukture v procesu nastajanja fibril, ki so vidne z elektronsko mikroskopijo (EM) ali z mikroskopijo na atomsko silo (AFM), so lahko t.i. amorfni ali granularni agregati, nekateri spominjajo na micle. Ti se nato transformirajo v strukture z bolj razločno morfologijo, kot so protofibrile ali protofilamenti (Jimenez in sod., 2002; Caughey in Lansbury, 2003; Bitan in sod., 2003). To so kratke, tanke, včasih vijugaste fibrilarne strukture, ki se v nadaljevanju medsebojno združujejo z lateralno asociacijo ob določeni stopnji strukturne preureditve, pri čemer nastajajo fibrile (Bouchard in sod., 2000).



Slika 4: Shematska predstavitev splošnega mehanizma agregacije do amiloidnih fibril. Delno razviti proteini asocirajo drug z drugim, pri čemer tvorijo majhne topne aggregate, ki se v nadaljevanju sestavljajo v prototribile oz. prototribilante (a, EM) in kasneje v dozorele fibrile (b, EM). Fibrile se pogosto akumulirajo v plakah in njim podobnih strukturah (c, EM). Nekateri od prvih aggregatov so v obliki "prstana" s premerom okoli 10 nm (d, EM) (Dobson, 2003).

Figure 4: A schematic representation of the general mechanism of aggregation to form amyloid fibrils (Dobson, 2003).

Na kakšen način agregacija proteinov vodi v patološko stanje, še ni povsem poznano. Pri sistemskih boleznih močno povečana masa netopnih proteinov fizično poškoduje funkciranje določenega organa (Pepys, 1995, cit. po Dobson, 2004). V drugih primerih nefunkcionalnost določenega proteina vodi v neuspešnost katerega od ključnih celičnih procesov (Thomas in sod., 1995). Pri nevrodegenerativnih boleznih pa primarni simptomi najverjetneje izhajajo iz poškodb in propada nevronov, zaradi toksično pridobljene funkcije vključenih proteinov, ki so bili izpostavljeni agregaciji (Koo in sod., 1999; Caughey in Lansbury, 2003). Začetni prefibrilarni agregati proteinov so opaženi kot glavni povzročitelji poškodb celic, dozorele fibrile so relativno benigne (Caughey in Lansbury, 2003; Walsh in sod., 2002).

Najverjetneje obstajajo specifični mehanizmi za citotoksičnost. Namreč, agregati, ki imajo obliko "prstana" so podobni bakterijskim toksinom, ki delajo pore v membrane in

s tem rušijo ravnotežje ionov v celici (Lashuel in sod., 2002). Neorganizirani prvi agregati imajo lahko toksičen vpliv tudi preko manj specifičnega mehanizma, npr. izpostavljenost nenativnih hidrofobnih površin, kar stimulira interakcije z membranami ali drugimi celičnimi komponentami (Stefani in Dobson, 2003; Polverino in sod., 2003).

Toksična narava proteinskih agregatov ni omejena samo na proteine in peptide, ki so povezani s patološkimi stanji. Tudi prefibrilarni agregati nekaterih drugih proteinov, ki niso povezani z nobeno do sedaj poznano boleznijo, so lahko prav tako citotoksični kot agregati amiloida- β (Bucciantini in sod., 2002). Koncept splošne narave agregatov in njihov vpliv na celice je bil podprt z eksperimenti s protitelesi, ki so reagirali s temi prvimi agregati različnih peptidov in proteinov ter tako inhibirali njihov toksičen vpliv na celice. Različne prefibrilarne aggregate je prepoznašo specifično protitelo, narejeno v osnovi proti Alzheimerjevemu peptidu A β . Protitelo je prepoznašo konformacijo agregatov, ne pa njihovih različnih proteinskih sekvenc in dozorelih fibril (Kayed in sod., 2003).

S kopičenjem agregiranih proteinov, pride v celici do opaznega povečanja oksidativnega stresa, obremenitev s strani težkih kovin, zmanjšanja vsebnosti antioksidantov, sprememb v permeabilnosti membran (priliv Ca-ionov), do nefunkcionalnosti mitohondrijskega sistema in programirane celične smrti. Vrstni red dogodkov je precej sporen. Možno je, da je odnos med vzrokom in posledico krožen: oksidativni stres lahko posledično vpliva na večjo amiloidogenost proteinov, po drugi strani pa proteini, ki agregirajo, povečujejo oksidativni stres. Posledica tega so aktivacija glia celic in vnetni odziv ter nefunkcionalnost mitohondrijskega sistema, kar vodi v programirano celično smrt (Jenko Kokalj in sod., 2005).

3.1.6 Celične membrane so primarne tarče citotoksičnosti prefibrilarnih agregatov

Ena od vodilnih teorij, ki pojasnjuje molekulsko osnovo patologije pri amiloidnih boleznih, pravi, da toksični amiloidni skupki vplivajo na viabilnost celice s tem, da interagirajo s celičnimi membranami in jih destabilizirajo. To vpliva na biokemijsko funkcijo membran in posledično povzroča motnje v homeostazi ionov. Topni prefibrilarni agregati imajo namreč skupno strukturno lastnost, da stremijo k interakcijam s celičnimi membranami. Celice, ki so izpostavljene takim agregatom, so

zato podvržene povečanju priliva kalcijevih ionov in reaktivnih oksidacijskih delcev (ROS). Oksidativno poškodovani in preveč fosforilirani proteini so posledično bolj nagnjeni k agregaciji, povečan nivo kalcijevih ionov vpliva na depolarizacijo celičnih membran, agregati pa so celo sposobni preiti plazmino membrano (Bucciantini in sod., 2004, Arispe in sod., 1994).

Prefibrilarni agregati amiloidogenih proteinov, kot so amiloid- β , α -sinuklein in transtiretin (Koo in sod., 1999; Nilsberth in sod., 2001; Mendes Sousa, 2001) so tisti, ki izražajo citotoksičnost, medtem ko so dozorele fibrile relativno neškodljive (Bucciantini in sod., 2002). Tudi agregati nepatoloških proteinov imajo podoben citotoksičen učinek, kar kaže na to, da amiloidna citotoksičnost izhaja prej iz skupne molekulske strukture kot pa iz specifične polipeptidne sekvence (Stefani in Dobson, 2003; Kayed in sod., 2003). Adhezija na sintetične oz. naravne membrane je večja v primeru anionskih fosfolipidov, ki se običajno nahajajo na notranji strani bioloških membran. Različne celice so različno prizadete s strani enakih aggregatov. Odpornost celice na toksičen vpliv aggregatov sovpada tudi z večjo vsebnostjo holesterola v plazemski membrani, ker le-ta oslabi interakcije aggregatov z membrano (Stefani, še neobjavljen).

3.1.7 Preobremenitev zaščitnega sistema s strani agregiranih proteinov

Pojavlja se vprašanje, kako lahko celični sistemi tolerirajo težnjo nepopolno zvitih proteinov k agregaciji. V normalnih okoliščinah so molekulski šaperoni in ostali mehanizem izredno učinkoviti v zagotavljanju, da se ti potencialno toksični delci nevtralizirajo (Hartl in Hayer-Hartl, 2002; Stefani in Dobson, 2003). Šaperoni so sposobni ščititi izpostavljene hidrofobne regije, razviti nekatere oblike aggregatov ali spremeniti razmerje med različnimi tipi aggregatov. Tako se toksične predstopnje amiloidnih fibril lahko transformirajo v manj reaktivne vrste, pri čemer se razvijejo in izpostavijo degradacijskemu sistemu. Taka situacija se pojavi npr. pri poliglutaminski sekvenci, ki je povezana z motnjami pri Huntington-ovi bolezni (Muchowski in sod., 2000). V tem primeru izgleda, da se prekurzorji amiloidnih fibril ob pomoči šaperonov pretvorijo v amorfno obliko. Če ta zaščitni proces spodelti, pa je možno tudi, da se ti potencialno škodljivi aggregati odlagajo v relativno neškodljivih oblikah, kot so inkluzijska telesca v bakterijah in agresomi v evkariontskih sistemih (Wileman, 2006). Formiranje dozorelih amiloidnih fibril, katerih toksičnost izgleda da je mnogo nižja od

njhovih prekurzorjev, prav tako lahko v nekaterih primerih predstavlja zaščitni mehanizem (Koo in sod. 1999; Caughey in Lansbury, 2003).

Večina agregacijskih bolezni ni povezana z genetskimi mutacijami ali infekcijami, pač pa se pojavlja sporadično v posameznih primerih, zlasti s starostjo, pri čemer igra veliko vlogo večja neučinkovitost mehanizmov za kontrolo kvalitete (Dobson, 2004; Macario in de Macario, 2002; Csermely, 2001). Ta neučinkovitost sistemov za kontrolo kvalitete je lahko delno posledica večje množine agregiranih proteinov, ki pa so lahko tudi posledica manjše zmožnosti celice za regulacijo v starejših letih. Povečana akumulacija napačno zvitih in poškodovanih proteinov najverjetneje vodi v preobremenjenost zaščitnega sistema. S staranjem je po drugi strani tudi bolj verjetno, da aktivnost šaperonskega odziva in degredacijskih mehanizmov (ubikvitin-proteasomski sistem) upada sama po sebi in zaradi tega hitreje pride do preobremenjenosti teh zaščitnih mehanizmov, kar sproži kaskado toksičnosti (Csermely, 2001).

3.2 ČLOVEŠKI STEFIN B - MODELNI PROTEIN ZA ŠTUDIJ AMILOIDNE FIBRILACIJE

3.2.1 Fiziološka vloga človeškega stefina B

Človeški stefin B je globularni protein z molsko maso 11 kDa, katerega primarna struktura vsebuje 98 aminokislin. Spada v IH klan inhibitorjev po Meropsovi shemi in v družino I25A skupaj s svojim homologom stefinom A. Po svoji osnovni funkciji je inhibitor cisteinskih proteinaz, vendar pa njegova fiziološka vloga še ni v celoti poznana. V celici je stefin B lociran tako v v citoplazmi, kot tudi v lizosomih in v jedru. Ima splošno zaščitno vlogo v organizmih sesalcev, kar potrjuje njegova stalna prisotnost v celicah in tkivih. Sodeluje pri zaščiti organizma pred nezaželeno proteolizo, kot posledico prekomerne aktivnosti endogenih lizosomskih cisteinskih proteinaz, katepsinov B, H, L in S, proteinaz metastaznih rakastih celic ali proteinaz mikroorganizmov (Riccio in sod., 2001; Pol in Björk, 2001; Estrada in sod., 1998). V malih možganih se pojavlja tudi kot del multiproteinskega kompleksa, ki je specifičen le za ta del možganov. V njem so proteini, ki po svoji funkciji niso proteinaze, med drugim tudi nekateri citoplazemski proteini, ki so vključeni v regulacijo citoskeletalnih funkcij (Di Giamo in sod., 2002).

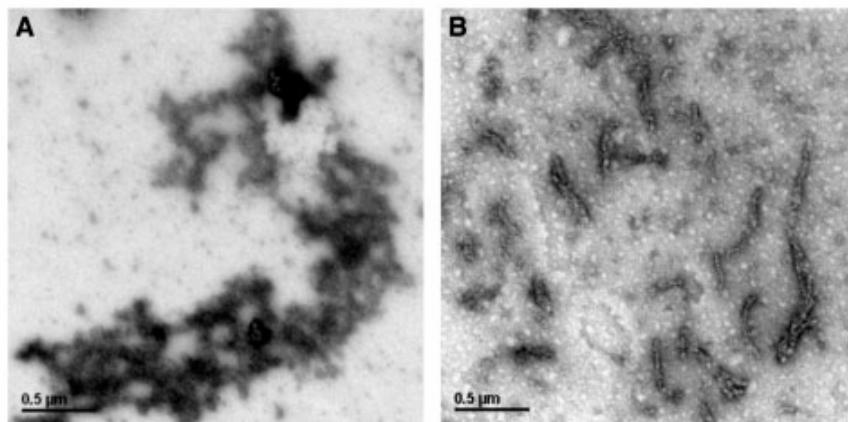
3.2.2 Amiloidne fibrile stefina B

Človeški stefin B je uveljavljen kot dober modelni sistem za merjenje stabilnosti in proučevanje mehanizmov zvijanja proteinov (Žerovnik in sod., 1997, 1998, 1999), prav tako pa v zadnjem času tudi za spremljanje proteinske agregacije in razumevanje procesa amiloidne fibrilacije (Žerovnik in sod., 2002a,b,c). Fibrile stefina B izražajo značilnosti, ki so skupne vsem amiloidnim fibrilam: oblika, kinetika rasti ter specifična vezava barvil Kongo rdeče in Tioflavin T, katerima se pri vezavi na fibrile karakteristično spremeni fluorescenčni spekter (Žerovnik, 2002d). Človeški stefin B, v nasprotju z njegovim homologom stefinom A, zlahka tvori amiloidne fibrile (že pri pH malo pod 5), kot je bilo pokazano v *in vitro* študijah (Žerovnik in sod., 2002a,b). Različna nagnjenost k tvorbi fibril obeh homologov je lahko posledica solnih mostičkov pri stefinu A, kar otežuje ločevanje elementov sekundarnih struktur (α -heliksa od β -trakov), medtem ko pri stefinu B solni mostički niso prisotni.

Dimere stefina B nastajajo pri sobni temperaturi, proces fibrilacije pa se začne iz delno razvitih intermediatov: ali iz intermediata, podobnega nativnemu stanju pri pH 4,8 ali pa iz konformacije razrahlanega klobčiča pri pH 3,3 z dodanim sulfatom (slika 5). Fibrilacija je hitrejša in ima krajšo lag fazo, če se začne iz stanja pri pH 3,3, pri pH 4,8 pa fibrile rastejo pri sobni temperaturi nekaj mesecev. Dodatek pred-denaturacijskih koncentracij organskega topila trifluoroetanola, pri katerih pride do delnega razvitja proteina, pospeši kinetiko fibrilacije, prav tako dodatek predhodno nastalih fibril in prisotnost močnega magnetnega polja (Jenko in sod., 2004).

Proces fibrilacije stefina B ima mnoge skupne značilnosti drugih amiloidogenih proteinov in peptidov, kot sta amiloid- β in prionski protein. S transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) so opazovali posamezne stopnje fibrilacije in ugotovili so, da imajo gladke fibrile stefina B svoj izvor v prefibrilarnih agregatih, ki se s časom zmanjšujejo, povečuje pa se količina amiloidnih fibril, ki na koncu prevladajo (Žerovnik in sod., 2002a). Te prefibrilarne oblike, ki so prisotne med lag fazo fibrilacije, so citotoksične, povzročajo koncentracijsko-odvisno prepuščanje membran ter prvenstveno interagirajo s kislimi fosfolipidi, ki se *in vivo* nahajajo predvsem na citosolni strani plazmaleme in na notranji mitohondrijski membrani (Anderluh in sod., 2005). Z opazovanjem teh prvih agregatov z mikroskopom na atomsko silo (AFM) so ugotovili, da je njihova velikost v rangu od 5 do 20 nm (Čeru in sod., še

neobjavljeno), kar sovpada s toksičnimi agregati amiloida- β (1-40) (Hoshi in sod., 2003).



Slika 5: TEM slike prefibrilarnih oligomernih agregatov človeškega stefina B. Amorfni granularni agregati pri pH 4,8 (A) in globularni agregati ter verižici podobne strukture iz teh globul pri pH 3,3 (B) v lag fazi fibrilacije stefina B (Anderluh in sod., 2005).

Figure 5: TEM pictures of prefibrillar oligomeric aggregates of human stefin B (Anderluh in sod., 2005).

3.3 DOSLEJ POZNANA PATOLOGIJA NA ČLOVEŠKEM STEFINU B: MIOKLONSKA EPILEPSIJA TIPO UNVERRICHT-LUNDBORG

Mutacije v genu stefina B, ki posledično vplivajo na zmanjšanje funkcije proteina, vodijo v pojav progresivne mioklonske epilepsije tipa Unverricht-Lundborg. To je degenerativna bolezen centralnega živčnega sistema, autosomno recesivna dedna oblika epilepsije, ki je vezana na 21. človeški kromosom. Značilni klinični simptomi te bolezni so: mioklonični in tonično-klonični krči, progresivna nevrološka disfunkcija in ataksija (Pennacchio in sod., 1996).

Na modelu miši z izbitim genom za stefin B so ugotovili, da pride do apoptoze cerebralnih granuloznih celic v malih možganih, kar vodi v hitrejše napredovanje ataksije in miokloničnih krčev. V drugih tkivih odsotnost tega inhibitorja ne vodi v patološki fenotip, kar kaže na to, da gre za tkivno specifično funkcijo stefina B (Pennacchio in sod., 1998). Pri miših z izbitima genoma tako za stefin B, kot tudi za katepsin B, je bil obseg apoptoze močno zmanjšan, medtem ko so mioklonični krči in ataksija ostali (Houseweart in sod., 2003). Torej mora imeti stefin B gotovo še kakšno pomembno funkcijo poleg inhibicije proteinaz, kar potrjuje tudi detekcija interakcij

stefina B z nekaterimi proteini, ki po svoji funkciji niso proteinaze. V malih možganih je stefin B vključen v multiproteinski kompleks, katerega funkcija še ni poznana. Lahko da kot inhibitor zgolj ščiti kompleks pred cisteinskimi proteinazami ali pa s tem, ko se veže na kompleks, spremeni njegovo strukturo in tako vpliva na pravilno formiranje kompleksa. Mutacija ali odsotnost stefina B bi lahko celo onemogočila nastanek multiproteinskega kompleksa. S tem bi kompleks zelo verjetno izgubil svojo specifično cerebralno funkcijo, kar bi lahko vodilo tudi do mioklonske epilepsije (Di Giacomo in sod., 2002).

Primarni celični dogodki in mehanizem toksičnosti Unverricht-Lundborgove bolezni so še precej nepoznani. Vsem obolenim je skupno znižanje vsebnosti mRNA za stefin B, kar posledično zmanjša njegovo inhibitorno vlogo, to pa korelira z opaznim povečanjem aktivnosti katepsinov B, L in S (Rinne in sod., 2002). Pri večini pacientov gre za ponavljajočo sekvenco dodekamera v promotorski regiji. Normalni aleli vsebujejo 2 ali 3 kopije teh ponovitev, medtem ko jih mutirani aleli vsebujejo več kot 60, kar vpliva na zmanjšanje ekspresije tega gena (Laliović in sod., 1997a). V kodirajočem delu gena za stefin B pa so do sedaj poznane štiri mutacije: zamenjava gvanina v citozin v prvem eksonu ima za posledico mutacijo *Gly4Arg*; delecija dinukleotida TC v kodonu 72 premakne bralni okvir in posledično povzroči predčasno terminacijo sinteze proteina (Laliović in sod., 1997b); v tretjem eksonu zamenjava adenina v citozin vodi v mutacijo *Glut71Pro* (Alakurtti in sod., 2004); zamenjava kodona za *Arg68* v translacijski stop kodon (Pennacchio in sod., 1996) pa prekine translacijo na tem mestu.

2.3.1 Študije na patogenih mutantah

Narejene so bile celične študije z mutantami v kodirajočem delu gena za stefin B, ki se pojavljajo pri bolnikih s progresivno mioklonsko epilepsijo tipa 1. Nobena od mutant ni asocirala z lizosomi, kot je to značilno za "wild-type" protein, temveč so bile razprtjeno porazdeljene po citoplazmi in jedru. Asociacija z lizosomi sovpada z zaščitno vlogo stefina B kot citoplazemskega inhibitorja cisteinskih proteinaz, ki se sprostijo iz lizosoma. V primeru mutante *Arg68stop* je bilo celo opažena hitra degradacija novo sintetiziranega proteina, razprtjeno celično porazdelitev pa je bilo možno opaziti le v primeru prisotnega proteasomskega inhibitorja laktacistina (Alakurtti in sod., 2004).

In vitro študije z mutanto *Gly4Arg* pa so pokazale, da ima ta mutanta v primerjavi z "wild-type" stefinom B skoraj 4-krat daljšo lag fazo fibrilacije s prisotnimi prefibrilarnimi agregati, čeprav sta oba proteina pravilno zvita in enako stabilna. Podaljšana lag faza ima lahko posledice za morebitno patologijo (Rabzelj in sod., 2005).

Pri progresivni mioklonski epilepsiji Unverricht-Lundborgovega tipa sicer ni dokazane amiloidne patologije *in vivo*, je pa stefinu B analogni protein človeški cistatin C dobro poznan amiloidogen protein: mutacija L68Q je amiloidogena varianta tega proteina, ki vodi v dedno obliko amiloidne angiopatije (Jensson in sod., 1990). Cistatin C tudi soagregira z amiloidom- β v senilnih plakih (Maruyama in sod., 1992). Ravno tako pa je bil tudi človeški stefin B opažen skupaj z nekaterimi katepsini in stefinom A kot komponenta jedra amiloidnih plakov različnega izvora (Ii in sod., 1993), vendar njegova glavna patologija za zdaj ostaja EPM1 sindrom.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije in osnovni material

BSA	Merck, Nemčija
centrikoni z membrano Y-3	Millipore, ZDA
DOPC	Avanti Polar Lipids, ZDA
EtOH	Carlo Erba, Italija
filtri (0,2 µm)	Sartorius, Nemčija
filtri (Y3 in Y5)	Millipore, ZDA
glicin	Sigma, ZDA
Hepes	Merck, Nemčija
kalcein	Sigma, ZDA
kloroform	Merck, Nemčija
MeOH	Merck, Nemčija
NaCl	Carlo Erba, Italija
NaDS	Sigma, ZDA
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Serva, Nemčija
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Serva, Nemčija
Na ₂ SO ₄	Merck, Nemčija
NaOAc	Carlo Erba, Italija
NaOH	Carlo Erba, Italija
polikarbonatne membrane 100nm	Millipore, ZDA
POPG	Avanti Polar Lipids, ZDA
steklene kroglice	Sigma, ZDA
TFE	Fluka, Švica
ThT	Aldrich Chemical, ZDA
Triton X-100	Sigma, ZDA

3.1.2 Najpogosteje uporabljene raztopine:

- Fosfatni pufer: 0,01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄
 0,15 M NaCl
 pH 6,5
- Glicinski pufer: 0,015 M glicin
 0,26 M Na₂SO₄
 pH 3,3
- Na-acetatni pufer: 0,015 M NaOAc
 0,15 M NaCl
 pH 4,8
- PBS pufer: 0,39 g/l NaH₂PO₄ x 2H₂O
 1,34 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O
 8,5 g/l NaCl
 pH 7,3
- Hepes pufer za vezikle: 10 mM HEPES
 200 mM NaCl
 pH 7,5
- Pufer s kalceinom: 20 mM Tris/HCl
 140 mM NaCl
 1 mM EDTA
 60 mM kalcein
 pH 8,5

3.1.3 Laboratorijska oprema

- Biacore X (Biacore, Švedska)
- CD spektrometer 62A DS (AVIV, ZDA)
- Centrifuge: mikrocentrifuga 5402 (Eppendorf, Nemčija)
 RC5C Plus (Sorvall, ZDA)
- Čitalec mikrotitrnih plošč MRX (Dynex Technologies, Nemčija)
- Digestorij R25 (Iskra, Slovenija)
- Ekstrudor (Avestin lipid extruder, Kanada)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava rekombinantnih proteinov

Rekombinantne proteine: "wild-type" (WT) stefin B, varianto E31Y, mutanto G4R in fragment R68stop smo ekspremirali v bakterijskih celicah *Escherichia coli* - sev BL21(DE3)pLysS in izolirani po postopkih, ki so opisani v magistrskem delu (Rabzelj, 2004). Vsi proučevani proteini so imeli cistein na 3. mestu aminokislinskega zaporedja zamenjan s serinom, da bi se izognili težavam, ki bi nastale z oksidacijo prostega cisteina.

Posamezne oligomerne oblike WT stefina B in mutante G4R smo v nadaljevanju ločevali na sistemu FPLC z gelsko kromatografijo in nosilcem Superdex 75 HR (Amersham Pharmacia Biotech, Švedska), ki se uporablja za ločevanje proteinov v območju 3 – 70 kDa. Po nanosu vzorca (500 µl) smo kolono spirali z 0,01 M fosfatnim buferom, 0,15 M NaCl, pH 7, s katerim je bila kolona tudi predhodno uravnotežena. Pretok je bil 0,5 ml/min.

3.2.2 Merjenje UV CD spektrov

Spektroskopske metode temeljijo na uporabi različnih optičnih lastnosti molekul v različnih območjih elektromagnetskoga spektra. Cirkularni dihroizem (CD) se uporablja

za merjenje optično aktivnih molekul v raztopini. Meri razlike v absorpciji levo- in desnosučne krožno polarizirane svetlobe, kar predstavlja osnovo za analizo konformacijskih stanj. V dalnjem UV območju (190-250nm) prevladujejo prispevki peptidnih vezi, tako dobimo podatek o sekundarni strukturi proteinov, medtem ko v bližnjem UV območju (250-320nm) svetlobo absorbirajo predvsem aromatske aminokisline in v manjšem obsegu tudi disulfidne vezi, kar nam nekaj pove o terciarni strukturi. CD se v bližnjem UV območju pojavi samo, če so aromati vpeti v stacionarno okolje, kar je merilo za nativno strukturo, zato se lahko uporablja tudi za analizo pravilnega zvitja rekombinantnih proteinov.

Za primerjavo spektrov različnih proteinov smo eksperimentalne vrednosti o eliptičnosti Θ (mdeg) pretvorili v povprečno molarno eliptičnost aminokislinskega ostanka ($\text{deg cm}^2/\text{dmol}$):

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \times M_{MRW}}{10 \times c \times l} \quad \dots (1)$$

kjer je M_{MRW} povprečna molska masa aminokislinskega ostanka (g/mol), c je koncentracija proteina (mg/ml), l pa dolžina poti žarka skozi kiveto (cm).

CD spektre smo merili na CD spektrometu, opremljenim s termoelektrično enoto za temperaturno regulacijo. Za spektre v dalnjem UV območju je bil interval merjenja 1 nm, širina reže 1 nm in čas integriranja 5 sekund. Uporabili smo 1- milimetrsko celico in absorbanco proteinov $A_{280} = 0,1$. Za spektre v bližnjem UV območju pa smo izbrali interval merjenja 0,5 nm, širino reže 0,5 nm in čas integriranja 3 sekunde. Pri tem smo uporabili 1- centimetrsko mikrocelico in absorbanco proteinov $A_{280} = 1,2$. Temperatura je bila 25 °C.

3.2.2.1 Denaturacija z organskim topilom TFE

Za denaturacijo s trifluoretanolom (TFE) smo raztopine proteinov pripravili 2 uri pred merjenjem pri različnih koncentracijah TFE (0 - 60 %) v 0,015 M acetatnem pufru z 0,15 M NaCl, pH 4,8. CD spektre smo posneli v dalnjem UV območju, uporabili smo 1- milimetrsko celico. Absorbanca proteinov je bila $A_{280} = 0,22$, ostali parametri pa so bili enaki kot pri merjenju CD spektrov nativnih proteinov.

3.2.3 ThT fluorescenca

Barvilo Thioflavin T (ThT) smo uporabili za detektiranje prisotnosti amiloidnih fibril v raztopini in za spremljanje kinetike fibrilacije proteinov. Pri vezavi na fibrile, se barvilo ThT karakteristično spremeni fluorescenčni spekter: maksimum emisije se premakne iz 435 na 482 nm. Za meritev smo uporabili 5- milimetrsko celico, valovno dolžino ekscitacije 440 nm, ThT emisijo pa smo merili v območju 455 - 600 nm z intervalom merjenja 0,5 nm, pri sobni temperaturi. Širini reže za ekscitacijo in emisijo sta bili 5 in 7 nm. Spektri so imeli maksimum pri 482 nm, zato smo spremljali kinetiko sprememb pri tej valovni dolžini.

Raztopine proteinov smo pripravili pri 34 µM koncentraciji v 0,015 M acetatnem pufru, 0,15 M NaCl, pH 4,8. Z dodatkom nizkih koncentracij organskega topila TFE smo pospešili hitrost fibrilacije. Proces rasti fibril smo spremljali do stacionarne faze. ThT smo raztopili pri 15 µM koncentraciji ($A_{416}=0,6$) v 25mM fosfatnem pufru z 0,1 M NaCl, pH 7,5. Vzorce proteinov (80 µl) smo neposredno pred merjenjem razredčili v ThT pufru (575 µl), nato pa izmerili intenziteto emitirane svetlobe. pH pufra nad 7 na eni strani optimizira ThT signal, na drugi pa vpliva na depolimerizacijo fibril, zato je potrebno izmeriti ThT fluorescenco v čim krajšem času po razredčenju (< 1 min).

3.2.4 Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)

Transmisijski elektronski mikroskop je inštrument, analogen presevnemu optičnemu mikroskopu. Sliko rišejo elektroni, ki prodrejo skozi vzorec. Na vrhu mikroskopa je nameščen elektronski top – pospeševalne napetosti so lahko od 20 do 125 kV (odvisno od opazovanega vzorca). Pod elektronskim topom so nameščene kondenzorske leče, ki elektronski snop usmerijo na preparat. Preparat se nahaja na nosilcu znotraj objektivne leče. Za zaznavo slike je potrebna interakcija snopa elektronov s preparatom, pri čemer se del elektronov sipa, del pa nadaljuje svojo pot sorazmerno neovirano.

TEM smo uporabili kot tehniko za opazovanje morfoloških sprememb ter strukture prefibrilarnih agregatov in dozorelih fibril posameznih proteinov. Na bakreno mrežico (premera cca 3 mm) smo nanesli 15 µl kapljico vzorca proteina 34 µM koncentracije, pustili 5 minut, nato pa jo položili na kontrastno sredstvo (1% uranilacetat) za 1 minuto. Vzorce smo pregledovali s presevnim elektronskim mikroskopom Philips CM

100 in fotografirali z digitalno kamero Bioscan CCD Gatan, fotografije pa obdelali z računalniškim programom Digital Micrograph. Pospeševalna napetost je bila 80 kV.

3.2.5 Priprava prefibrilarnih agregatov in nativnih proteinov za membranske študije

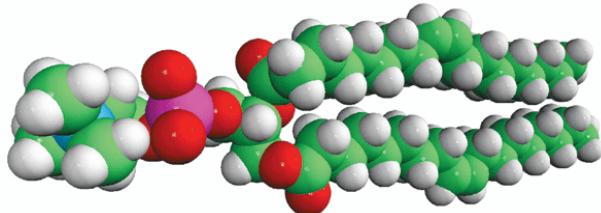
Prefibrilarne aggregate smo pripravili z inkubacijo proteinov v dveh različnih pufrih. Pogoje (pufer in čas inkubacije) smo izbrali tako, da so se v raztopini proteinov formirale oligomere/agregati v času lag faze fibrilacije. V enem primeru smo proteine pri sobni temperaturi in 100 µM koncentraciji inkubirali 1-2 tedna v 0,015 M natrijevem acetatu, 0,15 M NaCl, pH 4,8, v drugem primeru pa 1-2 dni v 0,015 M glicinskem pufru, 0,26 M Na₂SO₄, pH 3,3 (Žerovnik in sod., 2002a,b). Nativne oblike proteina smo pripravili v PBS pufru, pH 7,3.

3.2.6 Insercije proteinov v lipidni monosloj

3.2.6.1 Lipidi v bioloških membranah

Lipidi so amfipatične molekule, ki imajo polarni (hidrofilni) in nepolarni (hidrofobni) del. Biološke membrane pretežno sestavljajo fosfolipidi in nevtralni lipid holesterol, z vključenimi nekaterimi proteini in ogljikovimi hidrati. Med fosfolipide spadajo glicerofosfolipidi (zwitterionska fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin ter anionska fosfatidilserin in fosfatidilglicerol) in pa sfingolipidi (zwitterionski sfingomielin). Za fosfolipide je značilno, da imajo polarno glavo, nanjo pa je pritrjen dolg nepolarni rep, ki ga sestavlja ena ali dve ogljikovodikovi verigi. Delež posameznih vrst lipidov se od ene biološke membrane do druge razlikuje. Lipidna (tudi proteinska) sestava večine bioloških membran je asimetrična, kar pomeni, da sta sestavi notranjega in zunanjega sloja različni, pa tudi, da v lateralni smeri sestava ni homogena. Molekule se združujejo v domene, tako pride do lokalnega nastajanja t.i. lipidnih raftov. To so majhna specializirana področja membran, kjer so skoncentrirani določeni lipidi (predvsem holesterol in sfingolipidi) ter proteini. V novejšem času močno raziskujejo pomen teh otočkov v celični membrani. Menijo celo, da ti predeli preferenčno vežejo amiloidne proteine, kjer se ti akumulirajo, agregirajo in imajo toksičen učinek (Kawarabayashi in sod., 2004).

V naše eksperimente smo vključili dva glicerofosfolipida: fosfatidilholin DOPC in fosfatidilglicerol POPG. Za glicerofosfolipide je značilno, da imajo glicerol zaestren s fosfatno skupino na C-3 atomu, nanjo pa je vezan alkohol. **DOPC** (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoholin) ima fosfatno skupino zaestreno s holinom, rep pa sestavlja dve nenasičeni oleinski (18:1) maščobni kislini (slika 6). Pri nevtralnem pH ima fosforjeva kislina negativni naboj, alkohol holin pa pozitivnega, kar daje molekuli zwitterionski značaj. **POPG** (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]) pa ima na fosfatno skupino vezan alkohol glicerol in rep iz nasičene palmitinske (16:0) in nenasičene oleinske (18:1) maščobne kisline. Pri nevtralnem pH ima molekula negativni naboj.



Slika 6: Struktura glicerofosfolipida DOPC.

Figure 6: The structure of glycerophospholipid DOPC.

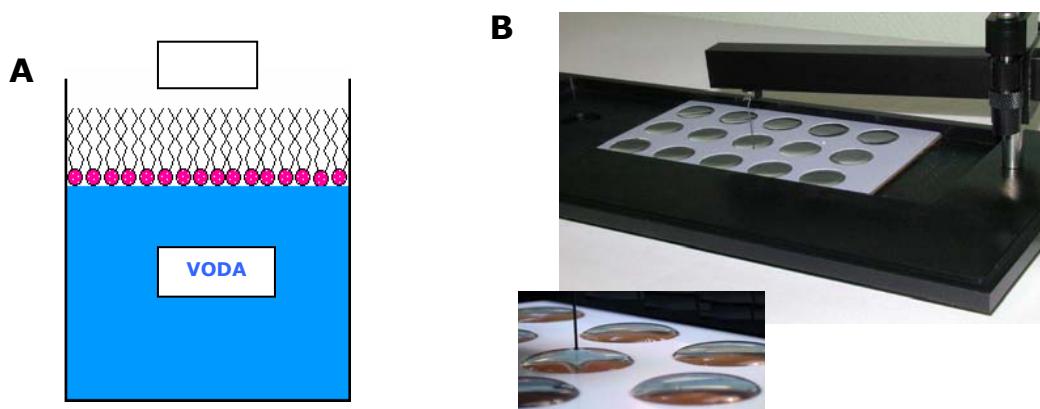
3.2.6.2 Uporabnost lipidnih monoslojev

Lipidni monosloji predstavljajo uporabno orodje za proučevanje interakcij med lipidi in proteini. Interakcije z lipidnimi membranami so lahko reverzibilne (adsorpcija) ali ireverzibilne (insercija). Še do nedavnega se je insercija enačila z lizo membrane. Poškodba v permeabilnosti membrane se je v preteklosti uporabljala kot dokaz, da je prišlo do insercije določenega toksina v membrano. Danes je možno opazovati vsak korak posebej. S tehniko monoslojnega filma lipidov, ki se tvori na vmesni površini med zrakom in vodo (slika 7a), lahko neposredno opazujemo insercijo, ločeno od nadaljnjih sprememb v strukturi membrane. S to tehniko je bilo ugotovljeno, da do visokega nivoja insercije lahko pride tudi pri mutantah toksina, ki sicer ne povzročajo lize membrane tako kot sam toksin, kar potrjuje ugotovitev, da je insercija neodvisna od lize (Sanchez-Magraner in sod., 2006).

Proučevani protein se pri tem eksperimentu vbrizga pod monosloj. Če se del proteina vpne med lipidne glave ali pa na kakršenkoli drug način zmoti urejenost lipidov, površinski pritisk naraste. Ta sprememba v pritisku je neposreden dokaz, da protein interagira z lipidnim monoslojem. Velikost v spremembi površinskega pritiska pri

monoslojih enake gostote pakiranja lipidov, se lahko uporabi za primerjavo jakosti interakcij med različnimi proteini.

Druga preprosta aplikacija te tehnike je določitev kritičnega pritiska monosloja. V tem primeru se testni protein pri enaki koncentraciji injicira pod monosloje različnih začetnih pritiskov, t.j. pri različnih gostotah pakiranja lipidov. To se doseže z nanosom različnih koncentracij lipidov na vmesno površino med vodno fazo in zrakom. Iz grafa, ki ima na x-osi vrednosti začetnega površinskega pritiska, na y-osi pa vrednosti, ki predstavljajo zvišanje pritiska za posamezen primer, dobimo z ekstrapolacijo na vrednost 0 podatek o kritičnem pritisku. To je tisti začetni površinski pritisk, pri katerem se posamezen protein ne more več insertirati v monosloj. Gostota pakiranja lipidov v bioloških membranah ustreza površinskemu pritisku od 30-35 mN/m, s čimer lahko primerjamo dobljene rezultate. Določanje kritičnega pritiska predstavlja preprosto metodo za karakterizacijo insercije proteinov in specifičnosti lipidne sestave, z uporabo enostavnega aparata, brez potrebne predhodne modifikacije proteina, kot je npr. radioaktivno označevanje (Brockman, 1999).



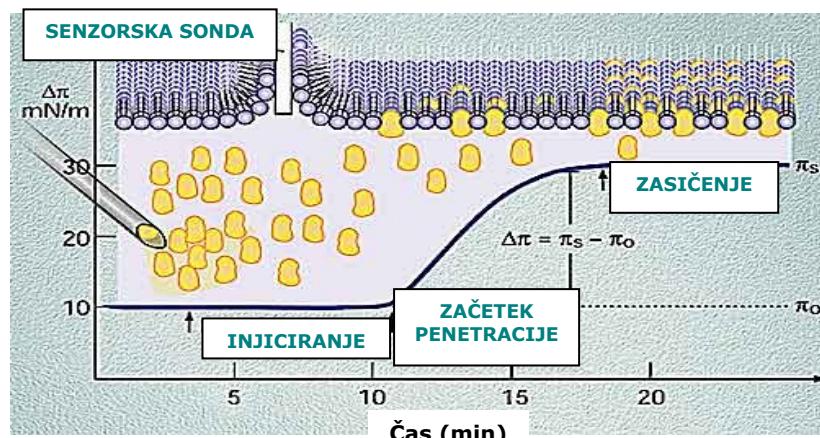
Slika 7: (A) Orientacija fosfolipidov na mejni površini zrak-voda, kjer se polarne glave usmerijo proti vodni raztopini, nepolarni repi proti zraku. (B) MicroTrough-S sistem (Kibron, Finska) za študij insercije proteinskih molekul v lipidne monosloje.

Figure 7: (A) Orientation of phospholipids at the air-water interface. (B) MicroTrough-S system for the insertion studies of protein molecules into the lipid monolayers.

3.2.6.3 Merjenje pritiska na površino lipidnega monosloja

Insercije naše serije proteinov smo spremljali z merjenjem sprememb površinskega pritiska, pri sobni temperaturi, na MicroTrough-S sistemu (slika 7b), ki je neke vrste tenziometer. Lipide DOPC in POPG smo najprej raztopili pri 1 mM koncentraciji v

mešanici organskega topila iz kloroform in metanola (2:1), nato pa jih previdno, v μ l odmerkih nanesli na površino vodne faze (10 mM Hepes, 200 mM NaCl, pH 7,5). Ob nanosu različnih koncentracij lipidov, je senzorska sonda zaznala različne začetne površinske pritiske. Po nekaj minutah, ko je organsko topilo izhlapelo, smo z mikropipeto injecirali protein pod površino pufra preko stranske povezave (slika 8). Končna koncentracija injeciranega proteina je bila vselej 10 μ M. Ko so molekule proteina začele penetrirati v lipidni monosloj, je v sorazmerju s tem naraščal površinski pritisk, ki smo spremljali vse dokler ni dosegel stabilnega signala. Podatke smo vnesli v graf, ki prikazuje zvišanje pritiska v odvisnosti od začetnega površinskega pritiska in z ekstrapolacijo na vrednost 0 dobili podatek o kritičnem pritisku (slika 23).



Slika 8: Shematski prikaz injiciranja in penetracije molekul proteina v lipidni monosloj.

Figure 8: Schematic presentation of injection and penetration of protein molecules into the lipid monolayer.

3.2.7 Permeabilnost liposomov

3.2.7.1 Orientacija lipidnih molekul v vodni fazi

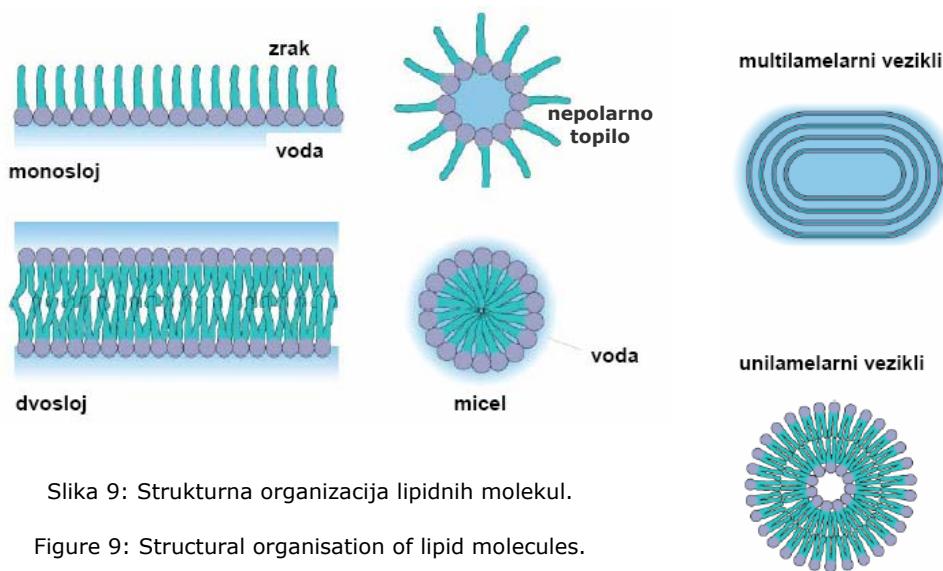
V vodnih raztopinah je zelo malo lipidov v monomerni obliki. Monosloj nastane, ko se polarne lipidne glave usmerijo proti vodni površini, nepolarni repki pa v zrak. Če lipide pomešamo z vodno fazo, se molekule združujejo tako, da se hidrofobni repki orientirajo stran od vode. Tako lahko tvorijo micerle (slika 9). To so strukture, kjer so nepolarni repki usmerjeni v notranjost, polarne glave pa interagirajo z vodo (v nepolarnih topilih je ravno obratno). Vendar ta formacija ni najstabilnejša, ker pride do steričnega oviranja med nepolarnimi repi. Stabilnejša struktura, ki v takem primeru

nastane, je lipidni dvosloj, debeline 6-10 nm. Če je plast dovolj velika, je energija, ki je potrebna za njen upogib, manjša od neugodnega prispevka na robu dvojne plasti, zato se le-ta v vodni raztopini spontano upogne in zaključi sama vase. Tako nastane fosfolipidni mehurček ali vezikel, imenovan tudi liposom. To so sferične strukture, nepropustne za ione in večino polarnih molekul, razen vode (slika 9).

Liposomi so urejeni v eno ali več značilnih dvojnih plasti (slika 9-desno). Glede na število dvoslojev in velikost liposomov ločimo:

- MLV (multilamellar vesicles): liposomi z več dvosloji v velikosti 100 – 4000 nm
- ULV (unilamellar vesicles): enoslojni liposomi, ki se glede na velikost delijo na SUV (small unilamellar vesicles) – majhni enoslojni liposomi v rangu velikosti od 20 do 100 nm in pa na LUV (large unilamellar vesicles) – veliki enoslojni liposomi od 100 do 800 nm.

Liposomi lahko služijo za transport različnih molekul, ki jih imajo v svoji notranjosti ali pa so pripete na površino lipidnega dvosloja.



Slika 9: Struktura organizacija lipidnih molekul.

Figure 9: Structural organisation of lipid molecules.

3.2.7.2 Priprava liposomov

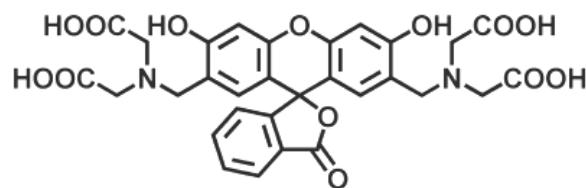
Liposome smo pripravili iz komercialnih fosfolipidov DOPC in POPG. Po raztapljanju posameznega fosfolipida (4 mg) v kloroformu smo topilo odstranili z rotacijskim evaporatorjem, kjer smo lipide v vakuumu sušili 3 ure. Lipidni film smo nato resuspendirali v 750 µl Hepes pufra za vezikle. Na vibracijskem mešalniku smo s pomočjo steklenih kroglic lipidni film z vodno fazo mešali toliko časa, da je le-ta

odstopil od stene steklene bučke. Na ta način so nastali multilamelarni vezikli, ki smo jih prenesli v ampulo za zamrzovanje in jih izpostavili 6 ciklom zamrzovanja in odmrzovanja v tekočem dušiku. Pri tem so se lipidne plasti odlepljale ena od druge. Da smo dobili suspenzijo unilamelarnih veziklov določene velikosti, smo jih vsaj 31x potiskali preko ekstrudorja z dvema polikarbonatnima filtroma z velikostjo por 100 nm. S tem postopkom smo dobili vezikle s približno enako velikostjo \leq 100 nm.

Pri eksperimentih, ko smo v vezikle želeli ujeti še fluorescenčno barvilo kalcein, smo lipidni film resuspendirali v 600 μ l 60 mM kalceina v pufru (140 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 11 mM EDTA, pH 8.5). Prosti kalcein smo po ekstruziji odstranili z gelsko filtracijo na Sephadex G-50 gelu (Pharmacia, Švedska) na kolonci višine 10 cm in premera 1 cm. Vezikle smo takoj po pripravi shranili pri temperaturi 4 °C in jih uporabili v treh dneh.

Koncentracijo fosfatidilholinov smo določali z encimskim testom Phospholipids B Kit po navodilih proizvajalca (Wako Chemicals, Nemčija), koncentracijo fosfatidilglicerolov pa smo ocenili z merjenjem intenzitete fluorescence posameznih frakcij, dobljenih po ločbi z gelsko filtracijo. V tem primeru smo najprej izmerili emisijo samega pufra, nato dodanih veziklov, nazadnje pa smo dodali še detergent Triton X-100, za katerega je značilno, da razaplja membrane in tako povzroči maksimalno sproščanje kalceina. Iz teh treh podatkov smo določili razmerje med ujetim in prostim kalceinom ter ocenili delež fosfatidilglicerola v posameznih frakcijah. Za eksperimente smo v nadaljevanju uporabili frakcije z visokim razmerjem med ujetim in prostim kalceinom.

3.2.7.3 Sproščanje kalceina iz majhnih unilamelarnih lipidnih veziklov



Slika 10: Strukturna formula kalceina $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$.

Figure 10: Structure formula of calcein $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$.

Kalcein je molekula premera 1,1 nm (slika 10), ki se je pri našem eksperimentu sproščala iz veziklov v primeru, ko je prišlo do poškodb membrane s strani toksičnih proteinov. Sproščanje kalceina smo opazovali po prekonočni inkubaciji veziklov s

posameznimi proteini, vsi pri 30 µM končni koncentraciji v 0,5 ml Hepes pufra za vezikle. Pred merjenjem na spektrofluorimetru smo v 1- centimetersko kvarčno kivetno, dodali še 0,5 ml pufra. Fluorescenco kalceina smo vzbujali pri 485 nm, emisijo pa merili pri 520 nm. Širini reže za ekskcitacijo in emisijo sta bili 5 nm, temperatura 25 °C. Sproščanje kalceina, inducirano s strani proteinov, smo izrazili kot procent maksimalne permeabilnosti, dosežene z dodatkom detergenta Triton X-100 v 2 mM končni koncentraciji.

Permeabilnost (P) liposomov smo izračunali po enačbi:

$$P (\%) = (F_{prot} - F_{min}) / (F_{prot-max} - F_{min}) * 100 \quad \dots (2)$$

Kjer F_{min} predstavlja najnižjo izmerjeno fluorescenco za vezikle v samem pufru (slepa proba); F_{prot} predstavlja intenziteto fluorescence kalceina po prekonočni inkubaciji veziklov s proteini, $F_{prot-max}$ pa predstavlja intenziteto fluorescence po dodatku detergenta.

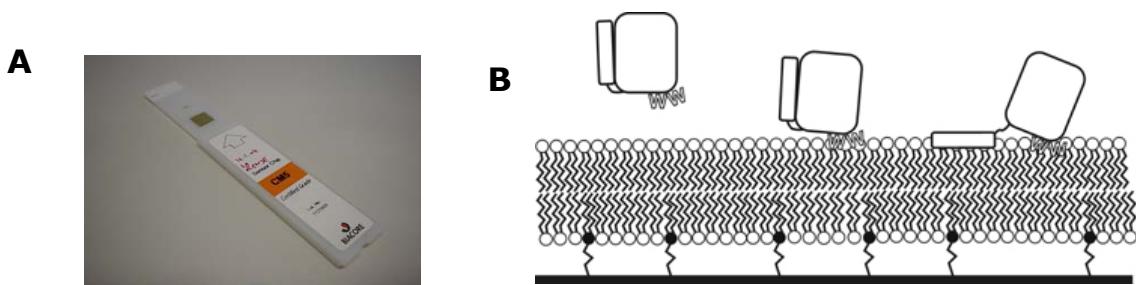
3.2.8 Merjenje površinske plazmonske resonance

3.2.8.1 Osnove tehnologije Biacore

Afiniteto interakcij med proteini in dvoslojnimi lipidnimi membranami smo določali z refraktometrom Biacore X na osnovi površinske plazmonske resonance (SPR). SPR je relativno mlad eksperimentalni pristop, ki se uporablja za študij interakcij bioloških makromolekul: protein-protein, protein-nukleinske kisline, encim-substrat, receptor-zdravilo, protein-membrana itd. SPR ima mnogo prednosti pred drugimi tehnikami in sicer: 1. vezava proteinov na dvosloje se spremlja neposredno, brez specifičnega označevanja proteinov ali lipidov, v realnem času; 2. hitra in takojšnja določitev hitrosti asociacije in disociacije vezavnega procesa; 3. zaradi visoke občutljivosti metode so potrebne zelo majhne količine vzorca (v nM količinah).

Pri običajnem SPR eksperimentu se lipidna membrana formira na površini senzorskega čipa, raztopina proteina pa gre preko njene površine. Obstajata dva glavna pristopa imobilizacije membrane na površino čipa. Pri prvem pristopu membrane vsebujejo manjše količine liganda, ki se na osnovi afinitete veže s protitelesom, imobiliziranim na površini čipa. V drugem pristopu pa se lipidni dvosloji oz. monosloji spontano

formirajo na površini kemično modificiranih čipov (slika 11b). Različno zasnovani senzorski čipi (slika 11a) omogočajo vezavo skoraj katerekoli biološko pomembne makromolekule na svojo površino.



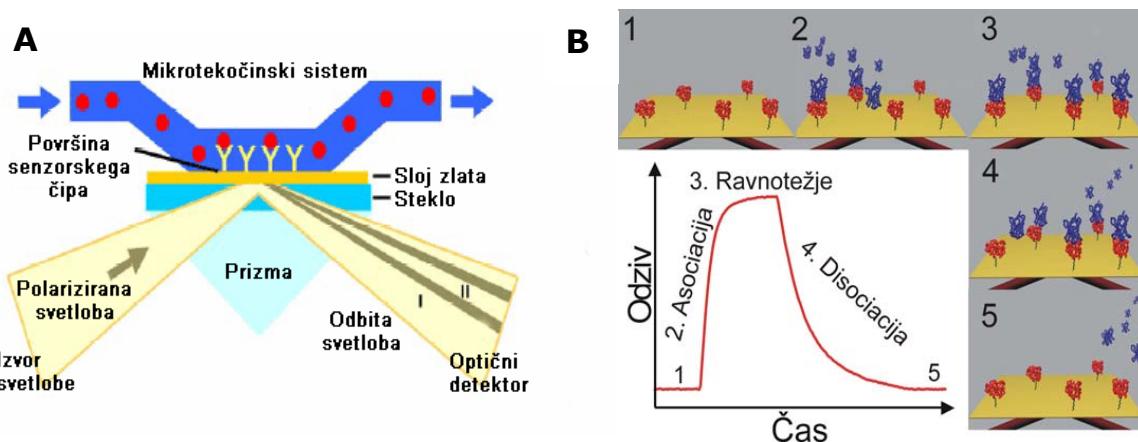
Slika 11: (A) Senzorski čip je sestavljen iz steklene ploščice, na kateri je tanka plast zlata in dodatnih kemijskih skupin, ki omogočajo vezavo enega od vezavnih partnerjev. (B) Lipidno membrano (dvosloj belih glav s črnimi repki) na senzorski čip (črna črta) zasidrajo posebnimi lipidi (črne glave in repek), ki se z enim delom vežejo na površino čipa. Prikazan je dvostopenjski primer vezave ekvinatoksinja (Hong Q. in sod., 2002).

Figure 11: (A) Sensor chip. (B) Lipid membrane bound to the sensor chip.

Tehnologijo Biacore sestavljajo senzorski čip, detektor in mikrotekočinski sistem. Detektorski sistem uporablja optični senzor, ki izmeri intenziteto odbite svetlobe na meji med dvema medijema z različnima lomnima količnikoma. Laser usmeri svetlobo skozi prizmo, prvi medij, na senzorski čip, ki predstavlja drugi medij z nižjim lomnim količnikom (slika 12a). Laserski snop je usmerjen pod takšnim kotom, da pride do popolnega odboja svetlobe. Na meji med obema medijema je tanek sloj zlata, ki lahko pod določenimi pogoji privzame del energije vpadne svetlobe. To zaznamo kot močan upad intenzitete odbite svetlobe pri točno določenem vpadnem kotu in ta pojav se imenuje površinska plazmonska resonanca. Odvisen je od več faktorjev, v največji meri pa od lomnega količnika drugega medija.

Na senzorski čip vezana molekula se imenuje ligand. Vezavni partner, ki ga s pomočjo mikrotekočinskega sistema spuščamo preko površine, pa analit. Molekule, ki se vežejo na površino čipa, spremenijo lomni količnik tik ob površini steklene ploščice, kar ima za posledico spremembo kota resonance, pri katerem del energije laserskega žarka privzame tanek sloj zlata. Spremembo kota izmeri optični detektor in ga prevede v spremembo odziva. Sprememba se meri v enotah resonance in je proporcionalna količini vezanega proteina. Krivulja vezave, ki prikazuje spremembo odziva v času, se imenuje senzogram (slika 12b). Iz senzograma lahko določimo ali se molekuli sploh

vežeta, koliko analita se je vezalo, kako hitro potekata asociacija in disociacija in kakšna je afiniteta vezave med obema partnerjema.



Slika 12: (A) Tehnologija Biacore. (B) SPR eksperiment. Analit (modro) se v fazi asocijacije (2) veže na ligand (rdeče), kar se pokaže kot povečanja signala na senzogramu. V trenutku, ko so vsa vezavna mesta zasedena, se odziv ustali (3). Ko prenehamo injecirati vzorec se analit počasi odplavlja z liganda (4). Iz faze asocijacije in disocijacije lahko določimo, kako hitra je vezava, iz faze ravnotežja pa lahko sklepamo na to, koliko analita je vezanega na senzorski čip. Pri tem si pomagamo z 1:1 Langmuir modelom in programom BIA evaluation software, proizvajalca Biacore.

Figure 12: (A) Biacore technology. (B) SPR experiment.

3.2.8.2 Vezava stefina B in izbranih mutant na dvoslojne lipidne membrane

V našem primeru smo za študij interakcij protein-membrana uporabili senzorski čip L1, ki omogoča formiranje lipidnih dvoslojev. Površina tega čipa vsebuje z lipofilnimi snovmi modificiran matriks dekstrana, kar omogoča vezavo veziklov, ki se nato zligejo in oblikujejo dvosloj. L1 čip smo najprej nekajkrat sprali z 0,5% NaDS in ga ekvilibrirali v 10 mM Hepes pufru, pH 7,5. Liposome smo pripravili z ekstruzijo v pufru za vezikle, po že opisanem postopku. Preko mikrotekočinskega sistema smo jih v 2 mM koncentraciji nanašali na senzorski čip v času 10 minut, pri pretoku 1 µl/min. Šibko vezane vezikle smo sprali s čipa s 3x injeciranjem 100 mM NaOH. Nespecifična vezavna mesta smo blokirali z 0,1 mg/ml govejega serumskega albumina. Proteine smo injecirali 60 s pri pretoku 20 µl/min, koncentracije so bile od 5 do 80 µM. Pri obdelavi rezultatov smo od senzograma za posamezen protein odštelili signal za njegovo slepo probo, da smo s tem odstranili vpliv pufra. Vezane lipide smo s čipa spiralili z 0,5% raztopino NaDS.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE STRUKTURE FRAGMENTA *Arg68stop* NA OSNOVI UV CD SPEKTROV

Sekundarno in terciarno strukturo fragmenta do mesta 68 smo določali na osnovi CD spektrov. Ta peptid stefina B se po ekspresiji v *E. coli* nahaja v inkluzijskih telescih, z razliko od ostalih proučevanih proteinov, ki so bili v topni obliki. Iz bakterijskega lizata smo ga izolirali s pomočjo hidrofobne kromatografije na HPLC koloni (Rabzelj, 2004).

Cirkularni dihroizem (CD) omogoča prepoznavanje konformacij optično aktivnih snovi v raztopini. Skoraj vse aminokisline, razen glicina, so asimetrične - torej optično aktivne. Sekundarna struktura proteinov je organizirana v α -vijačnice in β -plošče. Stranske verige aminokislín se nahajajo v asimetričnem okolju. Zaradi vsega tega imajo proteini kompleksne in izrazite CD spektre. Daljni UV CD odraža okolje peptidnih vezi, bližnji UV CD pa asimetrično okolje aromatskih aminokislinskih ostankov. CD spektri so karakteristični za posamezne proteine, tako je opazna vsaka spremembra v strukturi, ki nastane kot posledica mutacije oz. pri spremembi temperature, pH, topila ipd.

Za medsebojno primerjavo CD spektrov posameznih proteinov smo vrednosti o eliptičnosti pretvorili v povprečno molarno eliptičnost peptidne enote (enačba 1). Molekularni parametri, ki smo jih pri tem uporabili, so zbrani v preglednici 1.

Preglednica 1: Molske mase, ekstinkcijski koeficienti in povprečne molske mase aminokislín.

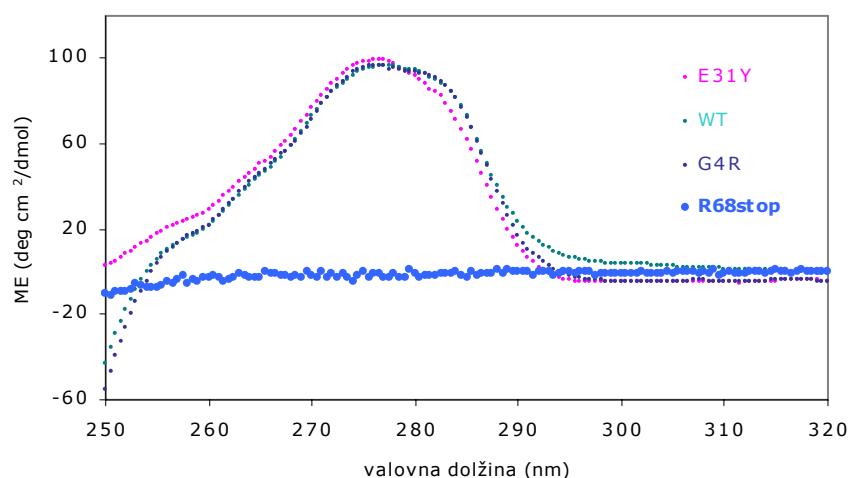
Table 1: Molecular masses, extinction coefficients and mean residue molecular masses.

	M (Da)	E_{280} (ml/mgcm)	M_{MRW} (Da)
R68stop	7.437,4	0,17	111
WT	11.123,5	0,35	113,5
E31Y	11.157,5	0,46	113,9
G4R	11.222,6	0,34	114,5

Molske mase (M) in ekstinkcijske koeficiente (E_{280}) smo izračunali s programom ProtParam. Ekstinkcijske koeficiente smo potrebovali za izračun masnih koncentracij proteinov. Povprečne molske mase aminokislin (M_{MRW}) smo izračunali tako, da smo molsko maso (M) za posamezen protein delili s številom aminokislin v molekuli.

4.1.1 Bližnji UV CD spektri

Tertiarno strukturo smo opazovali v bližnjem UV območju, ki odraža asimetrično okolje aromatskih aminokislin in disulfidnih vezi. Fragment R68stop smo primerjali z ostalimi proteini (WT stefin B, varianta E31Y in mutanta G4R), ki smo jih analizirali že v magistrskem delu (Rabzelj, 2004). Če na kratko povzamemo: enako t.j. pravilno zvito konformacijo kot za WT stefin B je bilo opaziti za mutanto G4R; varianta E31Y je za malenkost odstopala na račun dodatnega Tyr v molekuli. CD se v bližnjem UV območju pojavi, če so aromati vpeti v rigidno okolje, do česar pri fragmentu R68stop ni prišlo, kar kaže na to, da se ta peptid ni zvil v konformacijo značilno za stefin B, ampak je ostal v razvitem stanju (slika 13).



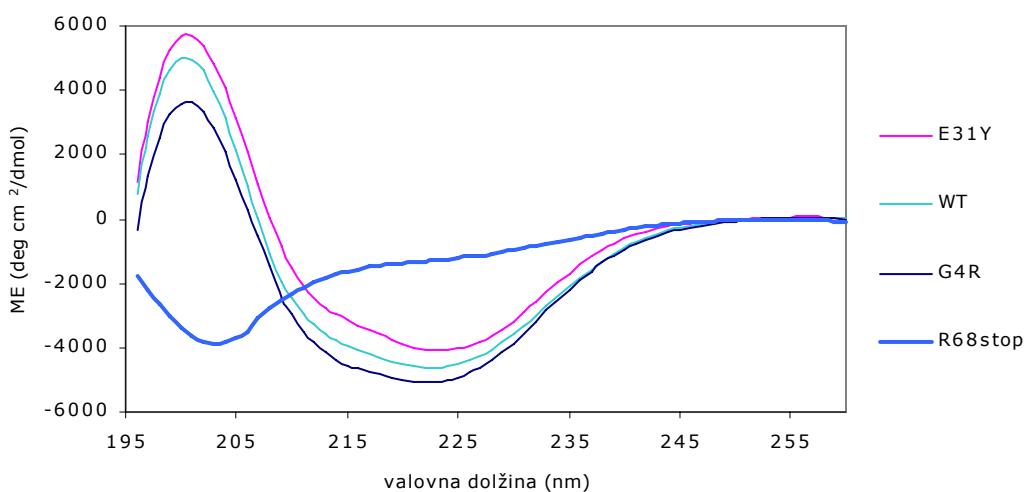
Slika 13: CD spektri proteinov v bližnjem UV območju z $A_{280}=1,2$ v 10 mM natrijevem fosfatnem pufru, pH 7.

Figure 13: CD spectra of proteins in near UV region at $A_{280}=1.2$ in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.

4.1.2 Daljni UV CD spektri

V dalnjem UV območju k CD spektrom v največji meri prispeva optična aktivnost različnih konformacij polipeptidne verige, kar nam posreduje informacijo o sekundarni strukturi proteinov. Vsi trije že predhodno analizirani proteini imajo tipično obliko α/β

sekundarne strukture z minimumom okoli 225 nm. CD spekter za fragment R68stop se od ostalih bistveno razlikuje (slika 14). Značilen je za razvite proteine, čemur ustreza minimum pri 200 nm in nizka eliptičnost v območju od 210 do 230 nm. Ta fragmentiran protein ostane razvit pri pH 7, prav tako pa tudi pri pH 5 in 3 (zadnja dva spektra nista prikazana).



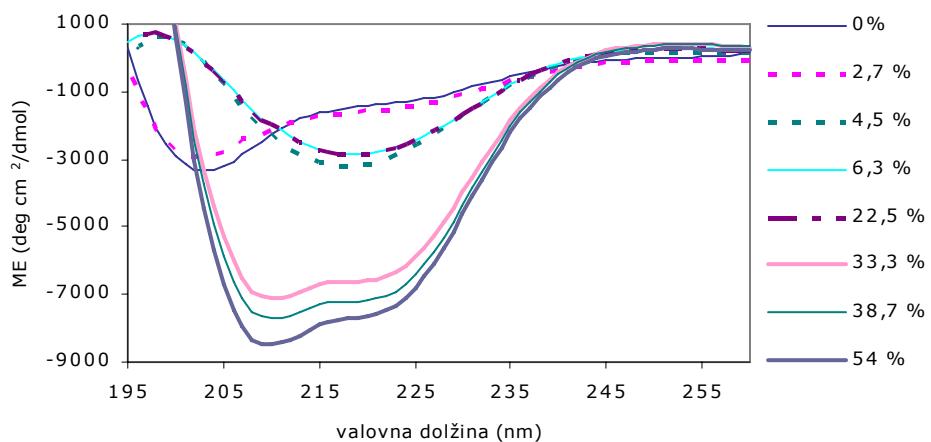
Slika 14: CD spektri proteinov v dalnjem UV območju z $A_{280}=0,1$ v 10 mM natrijevem fosfatnem pufru, pH 7.

Figure 14: CD spectra of proteins in far UV region at $A_{280}=0.1$ in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.

4.2 SPREMENBA V SEKUNDARNI STRUKTURI FRAGMENTA Arg68stop POD VPLIVOM TFE

Vpliv organskega topila trifluoroetanola (TFE) na konformacijo fragmenta R68stop smo spremljali s snemanjem spektrov v dalnjem UV območju. Spektri so bili zelo podobni pri pH 4,8 in pH 7. Kot je znano TFE stabilizira lokalne vodikove vezi, posredno vpliva na elektrostaticne interakcije in zmanjšuje dielektrično konstanto. Nižje koncentracije TFE pospešijo zvitje, višje koncentracije pa imajo denaturacijski učinek (Žerovnik in sod., 1999). V odsotnosti TFE je spekter za fragment R68stop značilen za razvito polipeptidno verigo (slika 8). S povečevanjem koncentracije TFE pride najprej do formiranja delno zvitih intermediatov, nato se pojavi vrste bogate z β -strukturo, kar se vidi po minimumu blizu 218 nm, ki je tipičen za β -strukturo. Pri še višjih koncentracijah TFE pride do prehoda v vse-a-helično obliko. To je bilo opaziti tudi za ostale tri proteine (Rabzelj, 2004; Rabzelj in sod., 2005), pri katerih se je a/ β

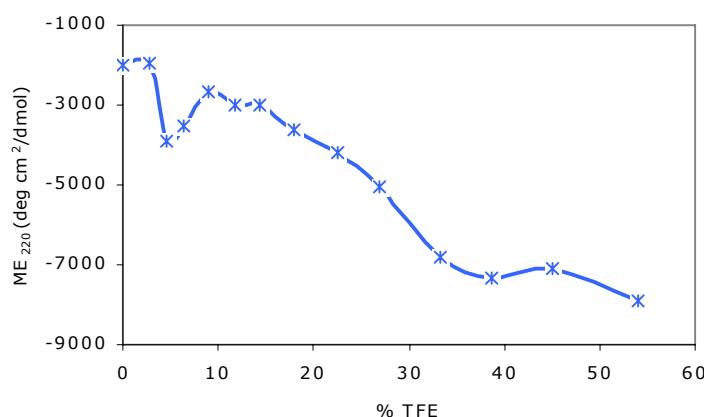
sekundarna struktura pod vplivom TFE najprej transformira v delno razvito obliko, nato pa enako kot pri fragmentu preko konformacije, bogate z β -strukturo, do konformacijo, ki jo sestavljajo predvsem α -vijačnice.



Slika 15: Vpliv TFE na konformacijo fragmenta R68stop z $A_{280}=0,22$ v 15 mM natrijevem acetatnem pufru, pH 4,8. Daljni UV CD spektri so predstavljeni kot funkcija koncentracije TFE (vol/vol).

Figure 15: Effect of TFE on the conformation of R68stop fragment at $A_{280}=0,22$ in 15 mM sodium acetate buffer, pH 4.8. Far UV CD spectra are presented as a function of TFE concentration.

Denaturacija fragmenta R68stop s TFE vodi v vse- α -helično konformacijo, za katero sta značilna dva minimuma, pri 208 in 220 nm. Iz odčitanih vrednosti molarne eliptičnosti pri spektralnih minimumih se lahko vidi potek denaturacije. V našem primeru pride v bližini spektralnega minimuma (pri 210 nm) do križišča med spektimi razvite in β -strukture, zato smo spremembe v sekundarni strukturi opazovali le pri 220 nm. Molarna eliptičnost za fragment R68stop pri spektralnem minimumu 220 nm je na sliki 16 predstavljena v odvisnosti od koncentracije TFE in kaže na potek denaturacijske krivulje.

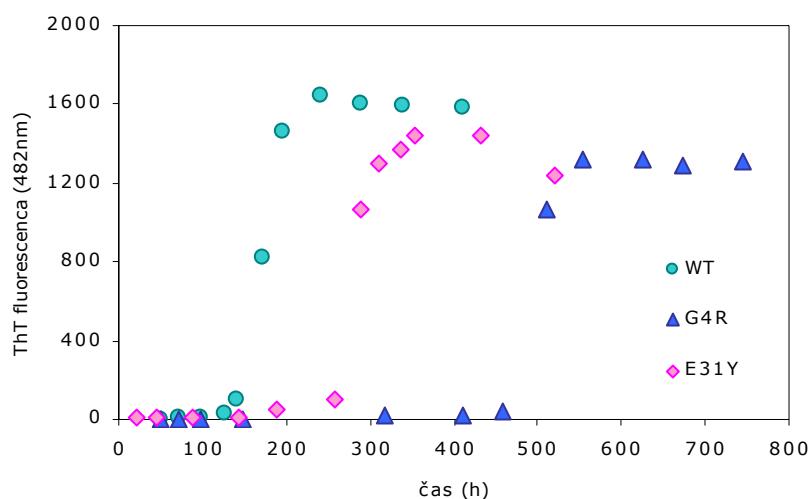


Slika 16: Vpliv TFE na sekundarno strukturo fragmenta R68stop. Denaturacijska krivulja pri 220 nm.

Figure 16: Effect of TFE on secondary structure of R68stop fragment. Denaturation curve at 220 nm.
Do bistvene spremembe v konformaciji tega peptida pride že pri 4,5 % TFE, do popolne denaturacije pa malo nad 30 % TFE. Za nadaljne eksperimente, t.j. spremeljanje nagnjenosti do fibrilacije, smo izhajali iz preddenaturacijskih koncentracij TFE, pri katerih se še ne kažejo večje spremembe v konformaciji.

4.3 KINETIKA AMILOIDNE FIBRILACIJE

Nagnjenost proteinov do formiranja amiloidnih fibril smo študirali z merjenjem ThT fluorescence. Za barvilo ThT je značilno, da se na specifičen način veže na fibrile, pri čemer se mu spremeni fluorescenčni spekter, ki doseže svoj maksimum pri 482 nm. Nagnjenost k fibrilaciji smo tako določali z merjenjem intenzitete fluorescence pri tej valovni dolžini v odvisnosti od časa. Ob prisotnosti 9% TFE v raztopini proteinov je lepo razvidna razlika v lag fazi med WT proteinom, varianto E31Y in mutanto G4R (slika 17). Pri višjih koncentracijah TFE lag faze niso bile vedno opažene.

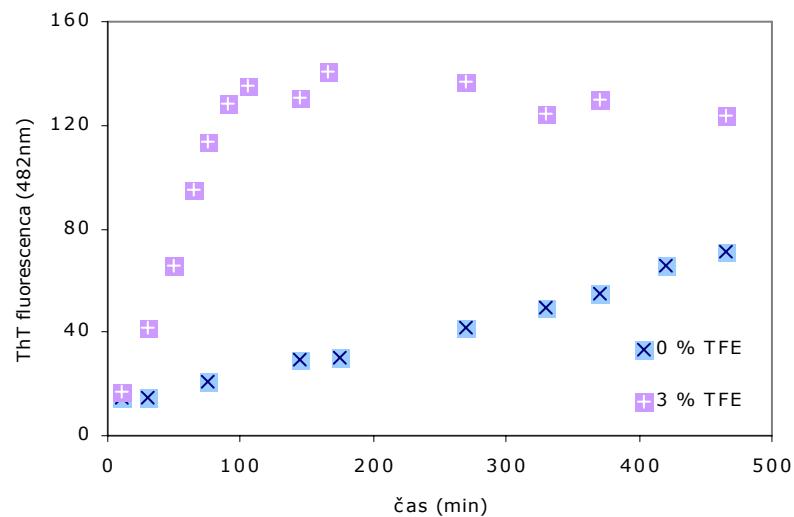


Slika 17: Amiloidna fibrilacija WT stefina B, variante E31Y in mutante G4R pri pH 4,8 v prisotnosti 9 % TFE. Intenziteta emisije fluorescence ThT pri 482 nm je prikazana kot funkcija časa.

Figure 17: Amyloid fibrillation of WT stefin B, variant E31Y and G4R mutant at pH 4.8 in presence of 9% of TFE. ThT fluorescence emission intensity at 482 nm is plotted as a function of time.

Za fragment R68stop pa smo ugotovili, da izredno hitro fibrilira v vseh primerih, tako v odsotnosti, kot tudi ob prisotnosti TFE, in že v nekaj urah doseže stacionarno fazo fibrilacije (slika 18). Tudi ni opaziti izrazite lag faze. Za primerjavo z ostalimi proteini smo naredili tudi poskus pri 9 % TFE in kot smo pričakovali, je bila tudi v tem primeru

fibrilacija takojšnja in s precej nižjim donosom končnih fibril v primerjavi z ostalimi proteini (rezultati niso prikazani).

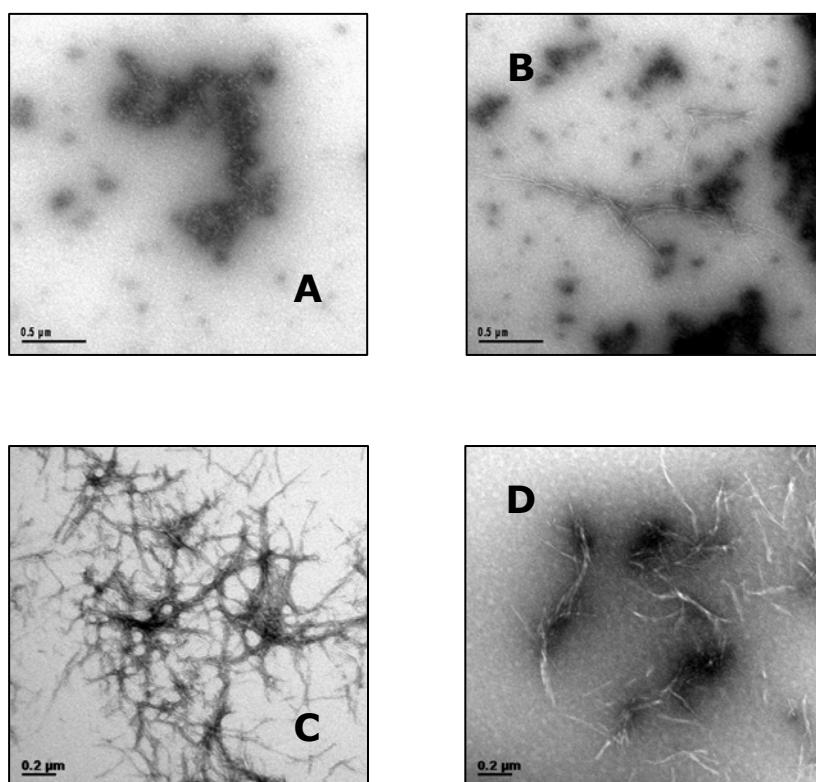


Slika 18: Amiloidna fibrilacija fragmenta R68stop pri pH 4,8 v prisotnosti 0 in 3 % TFE. Intenziteta emisije fluorescence ThT pri 482 nm je prikazana kot funkcija časa.

Figure 18: Amloid fibrillation of fragment R68stop at pH 4.8 in presence of 0 and 3 % of TFE. ThT fluorescence emission intensity at 482 nm is plotted as a function of time.

4.4 MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA FIBRIL S TEM

Formiranje fibril smo vzporedno z merjenjem ThT fluorescence spremljali tudi s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM). V analizo so bili vključeni trije proteini: WT stefin B, mutanta G4R in fragment do mesta 68. Vzorce za WT stefin B in mutanto G4R smo iz reakcijske raztopine odvzeli na tretji dan fibrilacije, ko sta bila oba proteina v lag fazi in pa na 14 dan za WT stefin B ter na 28 dan za mutanto G4R, ko je bila rast fibril v stacionarni fazi.

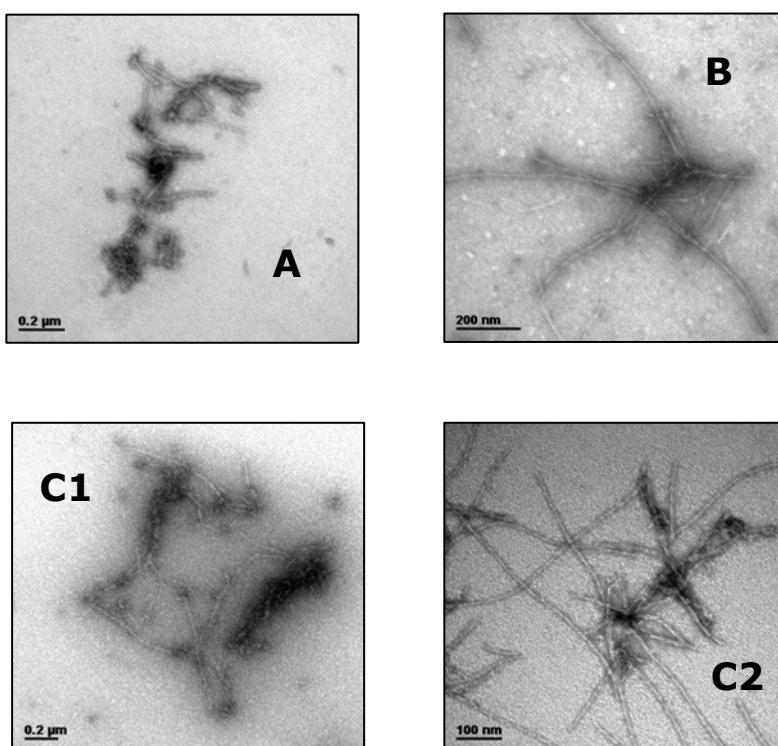


Slika 19: TEM slike struktur v lag in stacionarni fazi reakcije fibrilacije. Mutanta G4R (A) in WT stefin B (B) na tretji dan rasti fibril, WT stefin B na 14 dan (C) in G4R mutanta na 28 dan fibrilacije (D); vsi vzorci so bili pri pH 4,8 v prisotnosti 9 % TFE (Rabzelj in sod., 2005).

Figure 19: TEM images of species in lag and plateau phase of fibrillation reaction. G4R mutant (A) and WT stefin B (B) on third day of fibrils growth, WT stefin B on 14th day (C) and G4R mutant on 28th day of fibrillation (D); all samples were at pH 4.8 in presence of 9 % of TFE (Rabzelj in sod., 2005).

Pri proučevanju odvzetih vzorcev s TEM smo opazili to razliko, da so po 3 dneh fibrilacije pri G4R mutanti v raztopini prisotni samo prefibrilarni agregati (slika 19A), medtem ko pri WT stefinu B že začenjajo rasti posamezne fibrile (slika 19B). Razlike

pri teh dveh proteinih so opažene tudi v stacionarni fazi, kjer so pri WT stefinu B prisotne le dozorele fibrile (slika 19C), medtem ko pri mutanti G4R ostane v raztopini še nekaj agregatov poleg nekoliko krajsih fibril (slika 19D), ki tudi niso tako gosto prepletene kot v primeru WT stefina B. Vzorce za TEM smo odvzeli tudi za fragment R68stop, ki ima zelo veliko nagnjenost do fibrilacije (slika 18). Fibrile fragmenta so zrastle že po 1 uri fibrilacije pri pH 4,8 brez dodanega TFE in so prikazane na sliki 20A. Te fibrile so opazno krajše od tistih, ki so se formirale ob prisotnosti TFE (slike 20B,C1,C2).



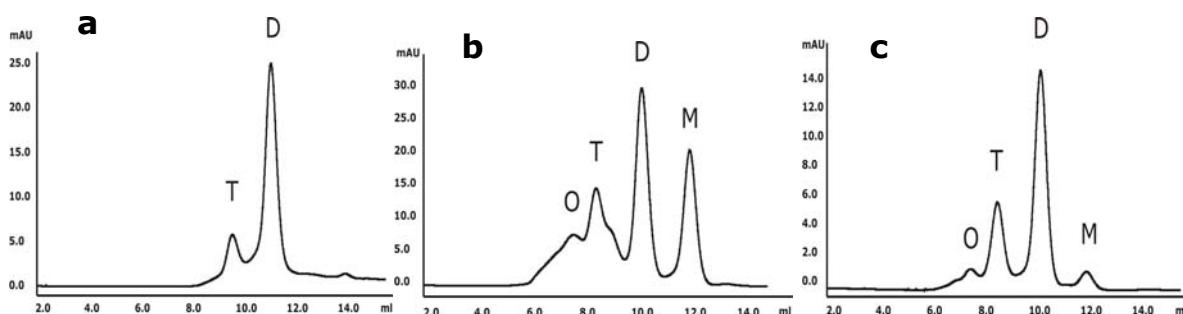
Slika 20: TEM slike amiloidne formacije fragmenta R68stop pri pH 4,8. Po 1 uri brez TFE (A), po 1 uri s 3% TFE (C1,C2) in po 8 dneh fibrilacije z 1% TFE dodanim v raztopino (B) (Rabzelj in sod., 2005).

Figure 20: TEM images of amyloid formation of R68stop fragment at pH 4.8. After 1 h without TFE (A1), after 1 h with 3% of TFE (C1,C2) and after 8 days of fibrillation with 1% TFE added into solution (B) (Rabzelj in sod., 2005).

4.5 INTERAKCIJE Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI

4.5.1 Priprava prefibrilarnih agregatov

V študij interakcij z lipidnimi membranami smo vključili naslednje proteine: WT stefin B, varianto E31Y in mutanto G4R, ki smo jih pripravili v nativnem (pH 7,3) in prefibrilarnem stanju. Amiloidne prefibrilarne aggregate stefina B smo inducirali z znižanjem pH na 4,8 ali 3,3 (Žerovnik in sod. 2002a). Tako pride do delnega razvijanja proteininskih molekul, pri čemer se pojavita dva različna, s kislim pH inducirana intermediata (Žerovnik in sod., 1997). Lag fazi fibrilacije, kjer pride do akumulacije prefibrilarnih agregatov, sta časovno opredeljeni in sicer od 1 do 2 tedna pri pH 4,8 in od 1 do 2 dni pri pH 3,3, pri sobni temperaturi. Pri pH 4,8 se v tej fazi pojavijo granularni agregati (slika 5A), ki jih sestavlja rahlo povezani osnovni oligomerni deli. Pri pH 3,3 pa se v lag fazi pojavijo verižici podobne strukture (izgledajo kot prototifibri), sestavljene iz osnovnih eliptoidnih delov (slika 5B). Tudi pri pH 7,3 so prisotne nekatere oligomere stefina B: pri varianti E31Y predvsem dimere (slika 21a), pri WT stefinu B (slika 21b) in mutanti G4R (slika 21c) pa poleg monomer in dimer tudi tetramere in višje oligomere. V eksperimentu smo vključili tudi te posamezne oligomere z namenom, da bi ugotovili, katera je tista najmanjša struktura, ki že ima pomemben vpliv na interakcije z membranami.

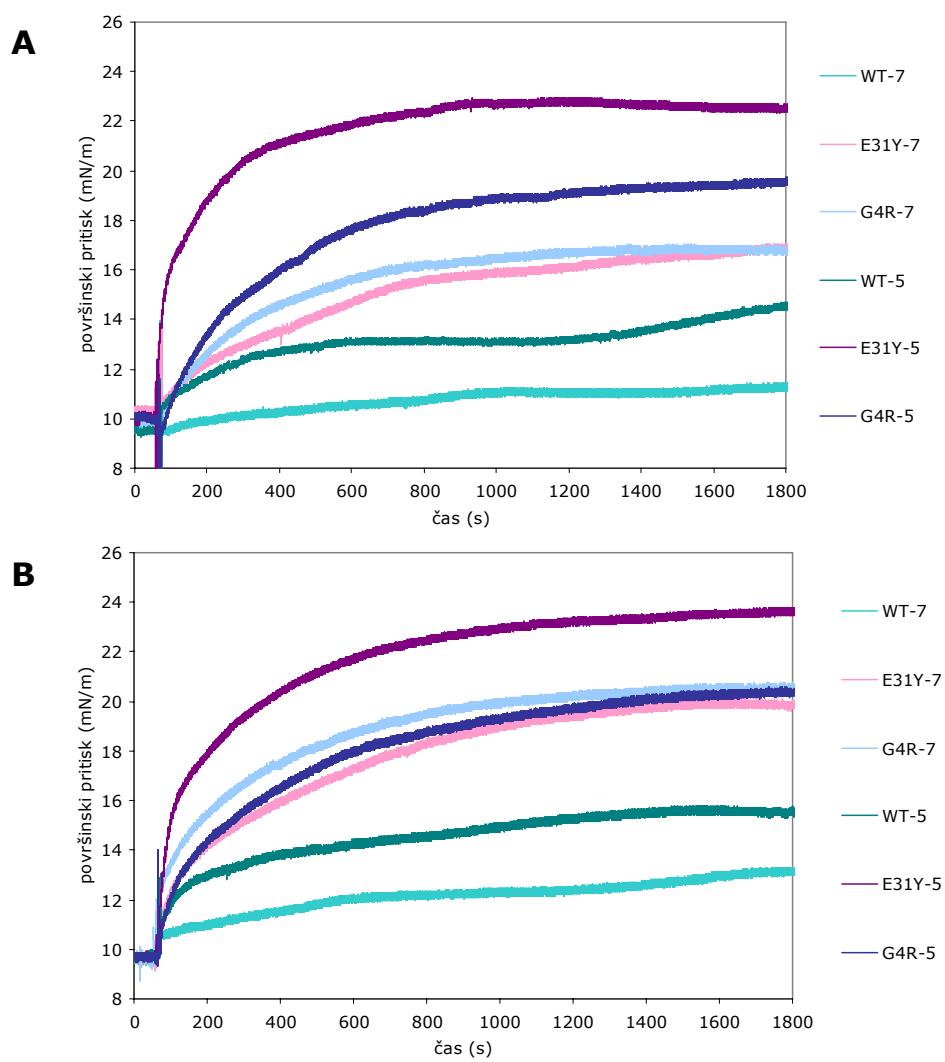


Slika 21: Določanje prisotnih oligomerov v raztopini proteinov z gelsko filtracijo na Superdex 75 HR koloni (FPLC). Varianta E31Y (a), WT stefin B (b) in mutanta G4R (c); označene so monomere (M), dimere (D), tetramere (T) in višje oligomere (O).

Figure 21: Analysis of present oligomers in protein solutions by gel filtration using a Superdex 75 HR column (FPLC). E31Y variant (a), WT stefin B (b) and G4R mutant (c); monomers (M), dimers (D), tetramers (T) and higher oligomers (O) are indicated.

4.5.2 Insercije v lipidne monosloje

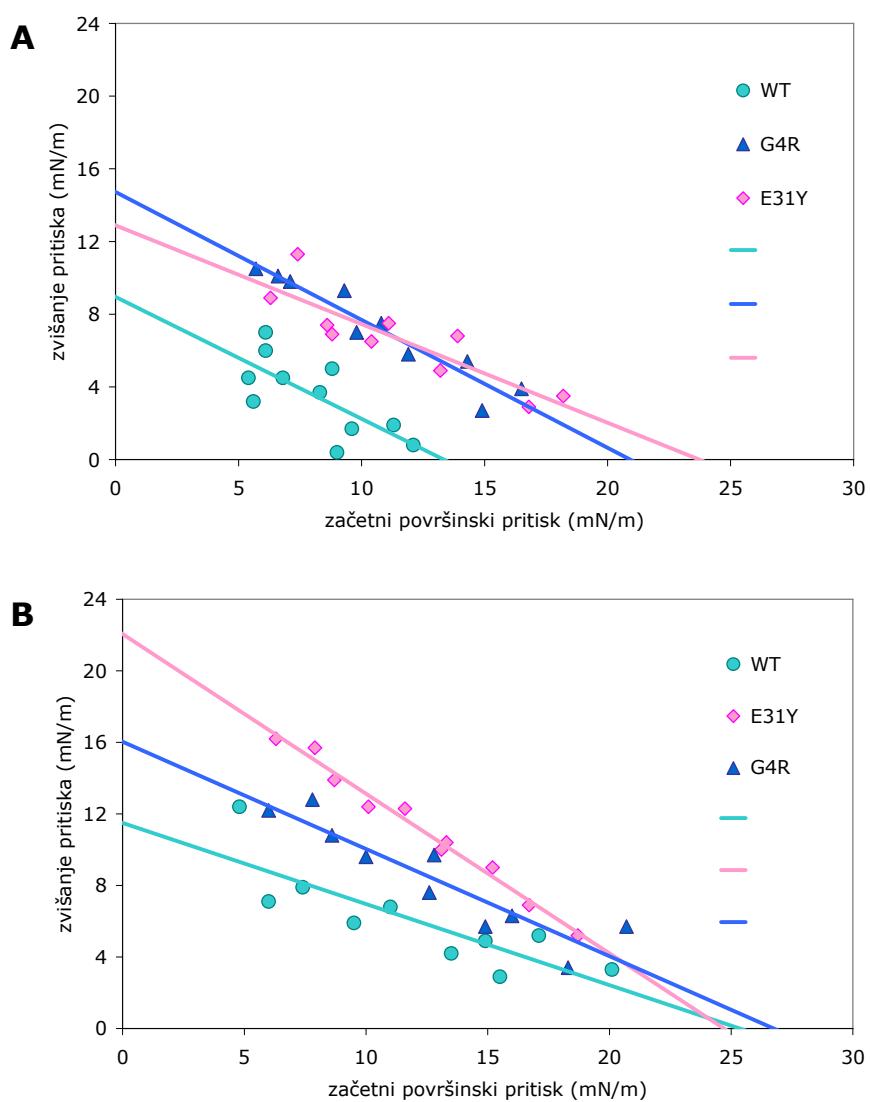
Za merjenje insercij v lipidne monosloje smo uporabili 2 različna fosfolipida: fosfatidilholin DOPC, ki je sicer najpogosteje zastopan med fosfolipidi kot gradnik celičnih membran, in pa fosfatidilglicerol POPG, ki se predominantno nahaja na notranji mitohondrijski membrani. Proteine smo medsebojno primerjali v dveh stanjih: v nativni konformaciji pri pH 7,3 in pa v lag fazi fibrilacije pri pH 4,8 s prisotnimi prefibrilarnimi agregati. Insercije proteinov v monosloje so povzročile zvišanje površinskega pritiska, ki smo ga merili na MicroTrough-S sistemom (slika 7b).

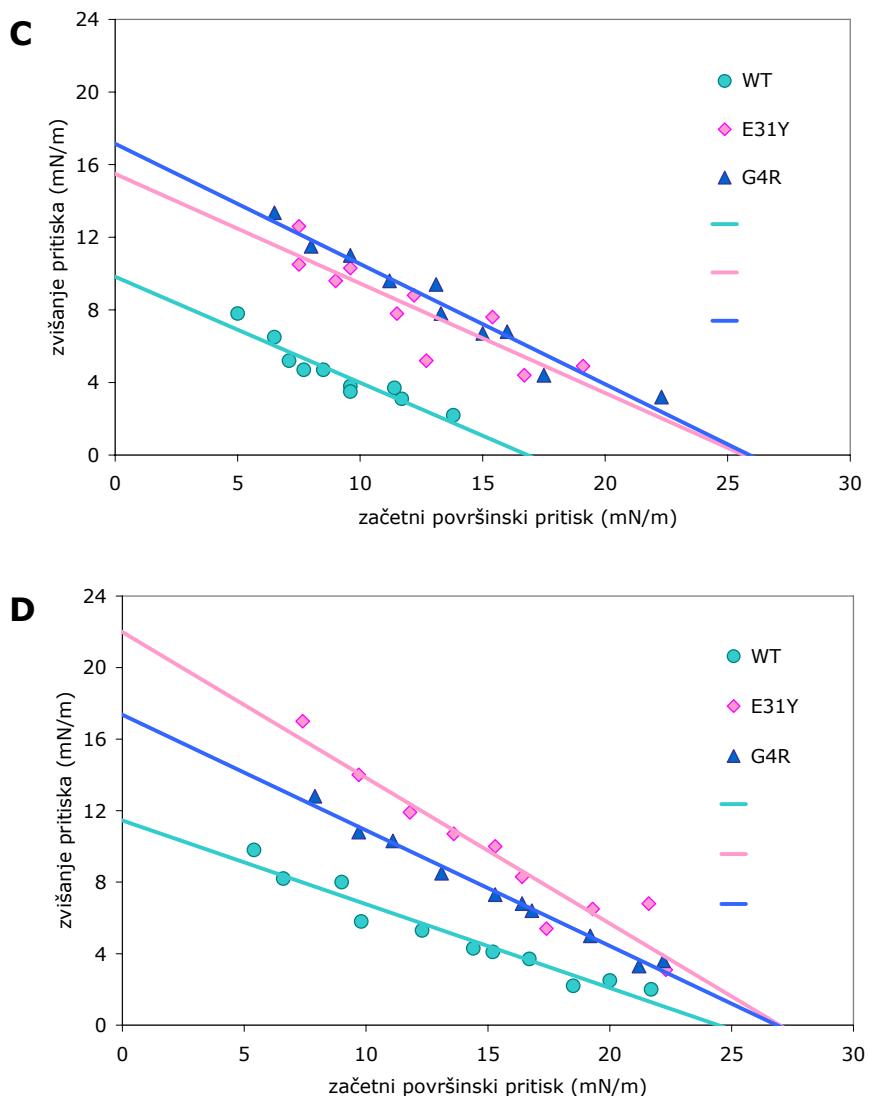


Slika 22: Kinetike insercij v lipidne monosloje pri začetnem površinskem pritisku 10 mN/m. A: monosloji DOPC; B: monosloji POPG.

Figure 22: Kinetic traces of insertions into lipid monolayers at initial surface pressure of 10 mN/m. A: DOPC monolayers; B: POPG monolayers.

Pri enotno izbrani vrednosti začetnega površinskega pritiska 10 mN/m lahko vidimo, da se kinetike insercij posameznih proteinov precej razlikujejo (slika 22). WT stefin B se v primerjavi z varianto E31Y in mutanto G4R slabo insertira (pri obeh pH), s počasno kinetiko, medtem ko se druga dva proteina vključujeta precej bolj enostavno (zlasti agregati pri pH 4,8). Za varianto E31Y in mutanto G4R lahko opazimo hitro kinetiko insercije in visoke končne pritiske. Pri obeh sestavah monoslojnih membran je obnašanje vseh treh proteinov podobno, z nekoliko višjimi vrednostmi za končne pritiske pri lipidih POPG. Zvišanje pritiska smo merili tudi pri različnih začetnih površinskih pritiskih lipidnega monosloja. Izvedli smo dve seriji meritev, obakrat s petimi poljubno izbranimi začetnimi pritiski za vsak protein. Z ekstrapolacijo na vrednost zvišanja pritiska = 0 (t.j., ko protein z membrano teoretično ne interagira več), smo dobili podatek o kritičnem pritisku, t.j. pritisk, pri katerem se protein ne more več insertirati v monosloj.





Slika 23: Grafični prikaz kritičnih pritiskov pri inserciji proteinov v lipidne monosloje. A: monosloji DOPC / proteini pri pH 7,3; B: monosloji DOPC / proteini pri pH 4,8; C: monosloji POPG / proteini pri pH 7,3 in D: monosloji POPG / proteini pri pH 4,8. (Ocenjene relativne napake so se gibale med 1 in 4 %)

Figure 23: Critical pressure plots for insertions of proteins into lipid monolayers. A: DOPC monolayers / proteins at pH 7,3; B: DOPC monolayers / proteins at pH 4,8; C: POPG monolayers / proteins at pH 7,3 in D: POPG monolayers / proteins at pH 4,8.

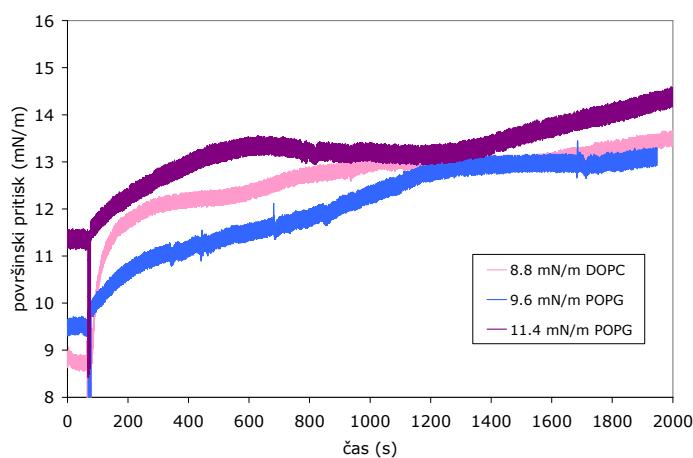
Kritični pritisk se bistveno razlikuje med proteini v nativnem stanju, kjer je za varianto E31Y in mutanto G4R pri obeh lipidnih sestavah opaziti izrazito večjo sposobnost insercije v monosloj kot za WT stefin B (sliki 23A,C). V prefibrilarnem stanju pri pH 4,8 pa so vrednosti kritičnega pritiska medsebojno zelo primerljive za vse tri proteine (sliki 23B,D). Številčni rezultati so zbrani v preglednici 2.

Preglednica 2: Kritični pritiski pri inserciji proteinov v lipidne monosloje. Proteini pri pH 4,8 so prefibrilarni, pri pH 7,3 pa nativni.

Table 2: Critical pressures for the insertion of proteins into lipid monolayers. Proteins at pH 4,8 are prefibrillar, at pH 7.3 are native.

Protein	DOPC (mN/m)	POPG (mN/m)
WT stefin B, pH 7,3	13,35	16,83
mutanta G4R, pH 7,3	20,93	25,90
varianta E31Y, pH 7,3	23,74	25,66
WT stefin B, pH 4,8	25,34	24,45
mutanta G4R, pH 4,8	26,74	26,86
varianta E31Y, pH 4,8	24,71	26,98

V nekaterih primerih izgleda, da pri inserciji v monosloje pride do precej kompleksne kinetike. To bi lahko raložili, kot da interakcija z monoslojem inducira preureditev konformacije proteina ali vpliva na njegovo nadaljnjo oligomerizacijo na površini monosloja (slika 24).



Slika 24: Kinetike insercij v lipidne monosloje za WT stefin B, pH 7,3.

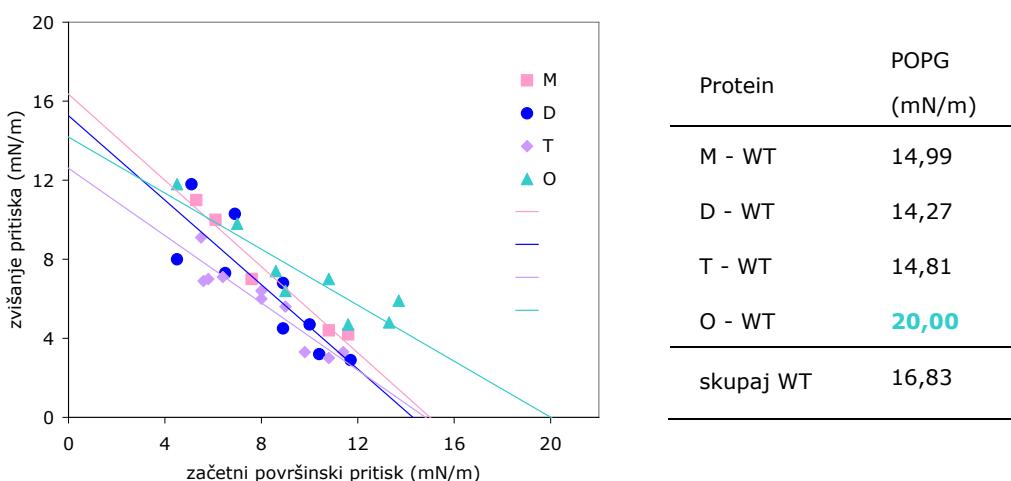
Figure 24: Kinetic traces of insertions into lipid monolayers for WT stefin B, pH 7.3.

Z merjenjem insercije v lipidni monosloj smo primerjali tudi obnašanje posameznih oligomer, ki so prisotne v raztopini WT stefina B pri pH 7,3. Da bi dobili večji delež višjih oligomer smo protein večkrat zamrzovali in odmrzovali. Tako se je delež višjih oligomer povečal za približno 20%. Z gelsko kromatografijo na koloni Superdex 75

smo nato izolirali posamezne frakcije monomer, dimer, tetramer in višjih oligomer (slika 21b). Za skupino višjih oligomer smo po nanosu na kolono Superdex 200 ugotovili, da vključujejo heksamere, oktamere, največ pa 12- in 16-mere. Z merjenjem zvišanja pritiska po injiciranju posameznih oligomer WT stefina B, smo ugotovili, da monomere, dimere in tetramere precej bolj šibko interagirajo z lipidi kot višje oligomere (slika 25, pregl.3). Ta rezultat lahko primerjamo z neločenimi oblikami pri pH 7,3 (slika 23c). Pri posameznih oligomerah mutante G4R pa je zanimivo to, da se monomere enako močno insertirajo v monosloj kot višje oligomere (slika 26).

Preglednica 3: Kritični pritiski pri insercijski posameznih oligomer WT stefina B pri pH 7,3 v monosloje POPG.

Table 3: Critical pressures for the insertion of separated oligomers of WT stefin B at pH 7.3 into POPG.

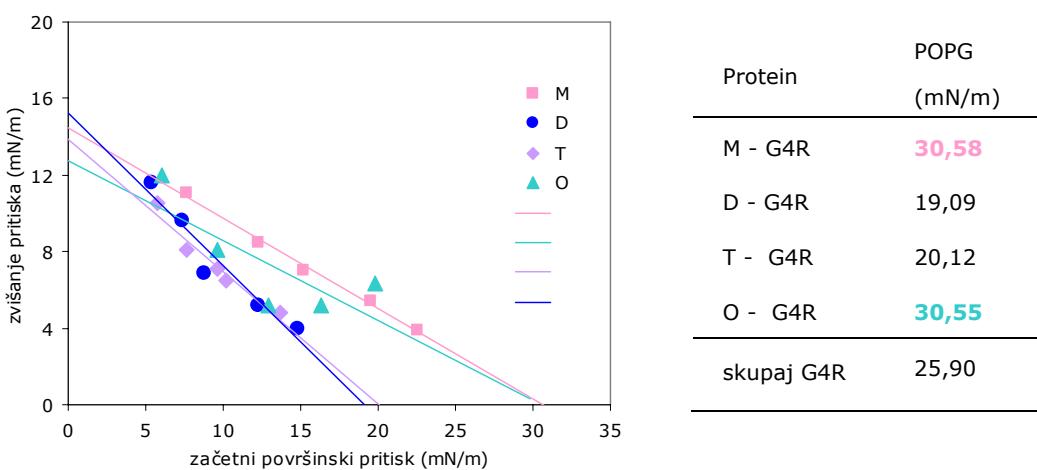


Slika 25: Insercija posameznih oligomer WT stefina B v lipidne monosloje POPG, pH 7.3.

Figure 25: Insertions of separated oligomers of WT stefin B into POPG lipid monolayers, pH 7.3.

Preglednica 4: Kritični pritiski pri insercijski posameznih oligomer mutante G4R pri pH 7,3 v monosloje POPG.

Table 4: Critical pressures for the insertion of separated oligomers of G4R mutant at pH 7.3 into POPG.



Slika 26: Insercija posameznih oligomer mutante G4R v lipidne monosloje POPG.

Figure 26: Insertions of separated oligomers of G4R mutant into POPG lipid monolayers.

4.5.3 Permeabilnost majhnih unilamelarnih veziklov

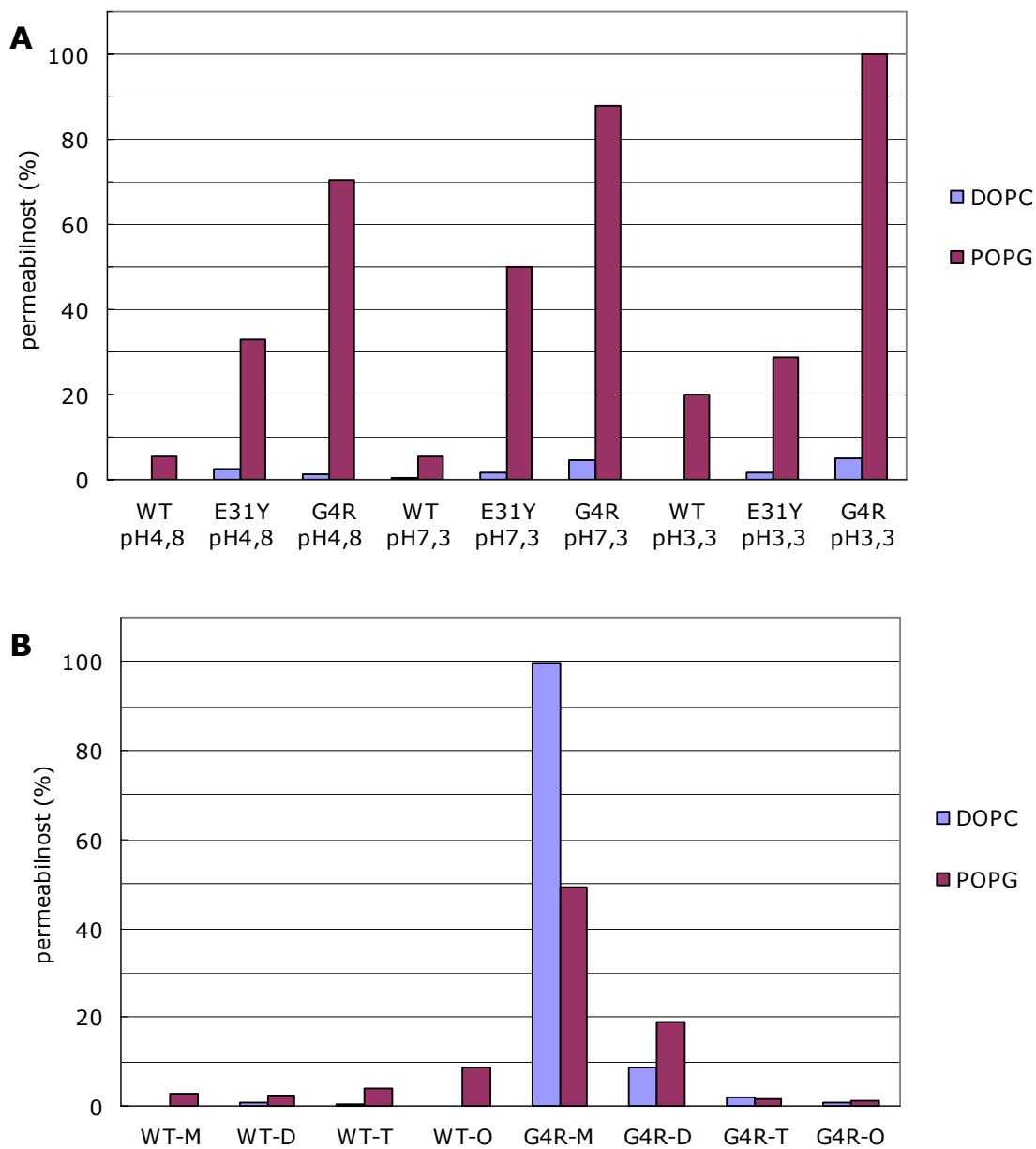
Permeabilizacijsko aktivnost prefibrilarnih agregatov v primerjavi z nativnimi stanji proteinov smo določali na majhnih unilamelarnih veziklih z uporabo metode sproščanja fluorescenčnega barvila kalceina. Liposome različne lipidne sestave smo preko noči pri sobni temperaturi inkubirali s posameznimi proteini. Prepuščanje kalceina iz veziklov je bilo večinoma koncentracijsko odvisno (pregl. 4).

Vezikli iz fosfolipidov DOPC z nevtralnim skupnim nabojem so bili precej odporni za testirane variante stefina B in po večini kalceina niso prepuščali. Velika posebnost je bila monomera mutante G4R, v prisotnosti katere je bila dosežena 100% permeabilnost (slika 27B). Liposomi, sestavljeni iz negativno nabitih fosfolipidov POPG, pa so bili za permeabilizacijo mnogo bolj dovezetni, še zlasti po inkubaciji z G4R mutanto, ki je pri vseh proučevanih pogojih povzročila visoko stopnjo permeabilnosti (nad 70 %) ter popolno prepuščanje membrane pri pH 3,3. WT stefin B je le v obliki prefibrilarnih agregatov pri pH 3,3 vplival nekoliko opaznejše na prepuščanje liposomov ($\approx 20\%$), medtem ko je varianta E31Y bolj invazivna in je pri pH 4,8 in pH 3,3 dosegla 33 %, pri pH 7,3 pa 50 % propustnost membrane (slika 27A).

Preglednica 4: Koncentracijsko odvisno prepuščanje kalceina iz veziklov POPG po 30 minutni inkubaciji s proteini pri pH 7,3.

Table 4: Concentration dependent calcein release from POPG vesicles after 30 minutes incubation with proteins at pH 7.3.

Protein	P (%)
WT stefin B: 7,5 µM	3,9
	3
	4,4
variantha E31Y: 7,5 µM	6
	11,8
	40,1
mutanta G4R: 7,5 µM	17,5
	26,5
	54,5



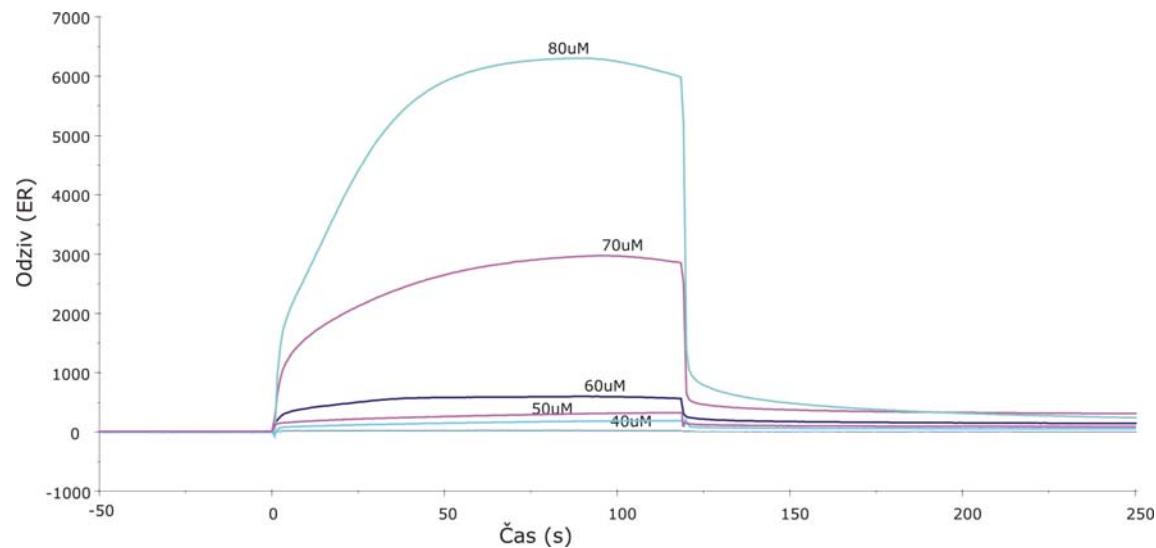
Slika 27: Permeabilnost majhnih unilamelarnih veziklov iz DOPC oz. POPG lipidov po prekonočni inkubaciji:
 (A) s proteini v prefibrilarnem (pH 3,3 in 4,8) in nativnem stanju (pH 7,3) in (B) z oligomernimi oblikami WT stefina B in mutante G4R. Koncentracije proteinov in lipidov so bile 30 μM . Vsak rezultat je povprečna vrednost dveh medsebojno neodvisnih meritev.

Figure 27: Permeabilization of small unilamellar vesicles composed of DOPC or POPG after overnight incubation: (A) with prefibrillar (pH 3.3 and 4.8) and native state (pH 7.3) proteins and (B) with oligomeric forms of WT stefin B and G4R mutant (B). Proteins and lipids were at 30 μM concentration. Each result is an average value of two reciprocal independent measurements.

4.5.4 Vezava na dvoslojne lipidne membrane

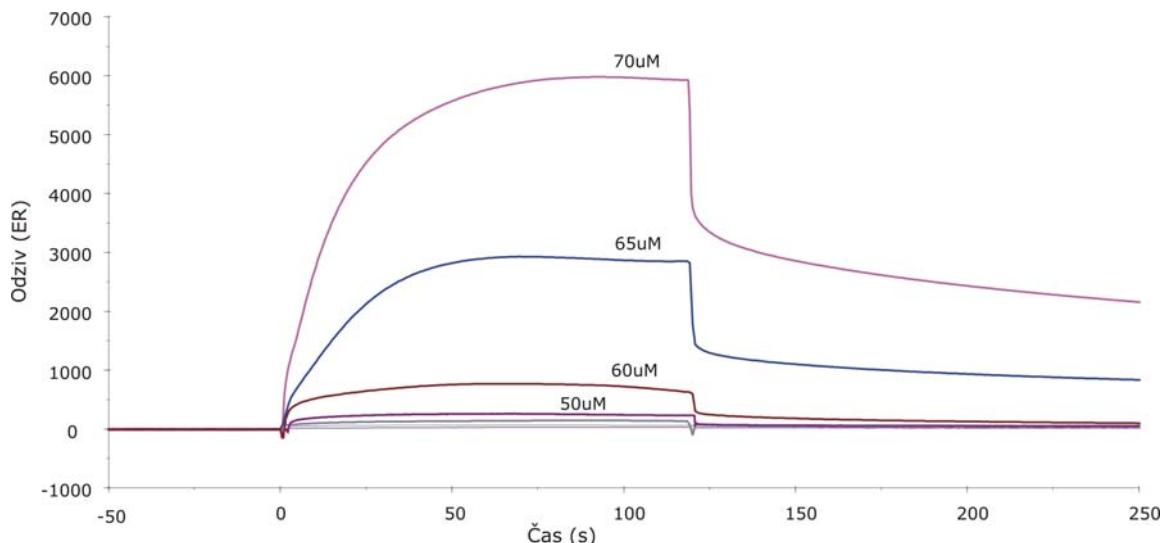
Vezavo na liposome smo merili s površinsko plazmonske resonanco z uporabo Biacore X in L1 čipa. Liposomi so se na površini čipa zadržali s pomočjo lipofilnih skupin, vključenih v matriks dekstrana in so služili kot ligand za proteine, ki so se nanje vezali. Ta tehnika omogoča direktno ocenitev konstant hitrosti asociacije in disociacije. V našem primeru kvaliteta podatkov sicer ni dovoljevala kvantitativne analize, smo pa kljub temu lahko naredili nekatere primerjave med posameznimi proteini in lipidnimi sestavami membran.

Proteine smo pri različnih koncentracijah (5 - 80 μM) 1 minuto injicirali preko pripravljene površine, čemur je sledila disociacija nadaljnih 5 minut. V nativnem stanju se testirani proteini niso prav dosti vezali na membrane DOPC in POPG, kar je razvidno iz signala, ki se med injiciranjem proteinov skoraj da ni spremenil in je bil v fazi disociacije popolnoma enak kot pred injiciranjem (slike 31, 32). Vezava proteinov v prefibrilarnem stanju pa je bila koncentracijsko odvisna, z večanjem koncentracije proteina je tudi signal naraščal (slike 28,29,30). Prefibrilarni agregati so se vezali predvsem na liposome POPG. Največ se je vezalo agregatov mutante G4R, potem variante E31Y in kot najmanj agregati WT stefina B (slika 31). Glede jakosti interakcij pa lahko rečemo, da so bile izrazito močne zlasti za aggregate variante E31Y pri višjih koncentracijah (nad 60 μM), na kar kaže le delno zmanjšanje signala v fazi disociacije (slika 29). To pomeni, da je velik del proteina še ostal vezan na membrano. Velika posebnost je tudi interakcija variante E31Y z DOPC membrano, na katero se kot edina veže, tako v nativnem kot v agregiranem stanju. Ta vezava se zgodi v trenutku (slika 32), jakost interakcij pa je pri 60 μM koncentraciji tako močna, da se na koncu le zelo majhen delež proteina odplavi z membrane. Vsako meritev smo naredili v dveh paralelkah (ali celo več) in med njimi ni bilo večjega odstopanja.



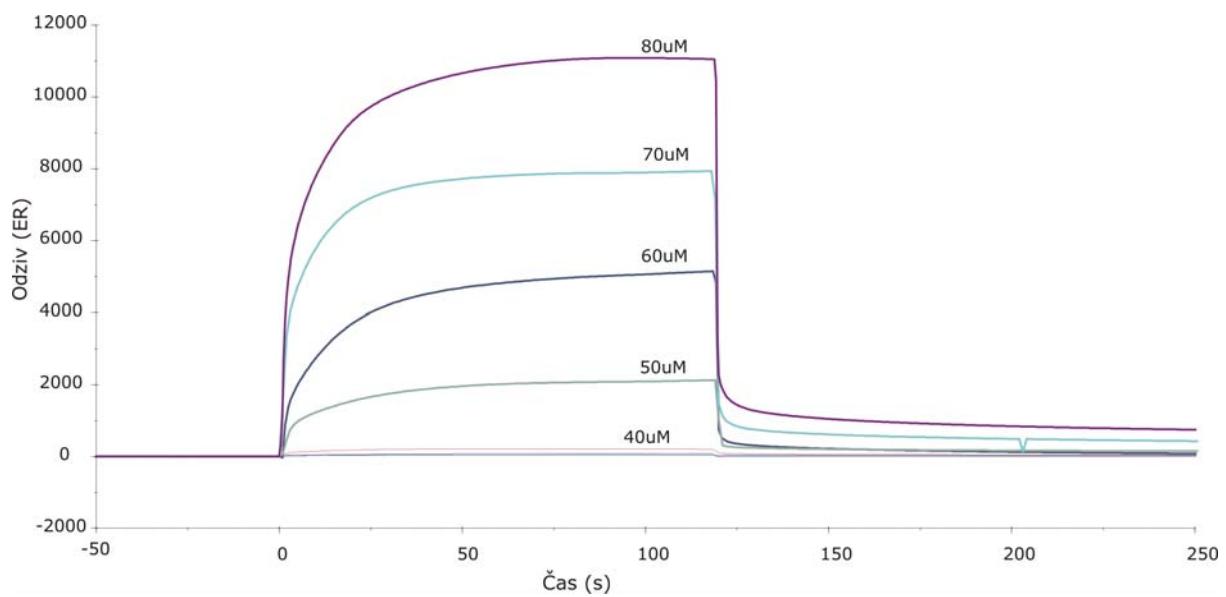
Slika 28: Koncentracijsko odvisna vezava prefibrilarnih agregatov WT stefina B, pripravljenih pri pH 4,8, na liposome POPG, merjeno s površinsko plazmonske resonanco.

Figure 28: Concentration dependent binding of prefibrillar aggregates of WT stefin B prepared at pH 4.8 to POPG liposomes measured by surface plasmon resonance.



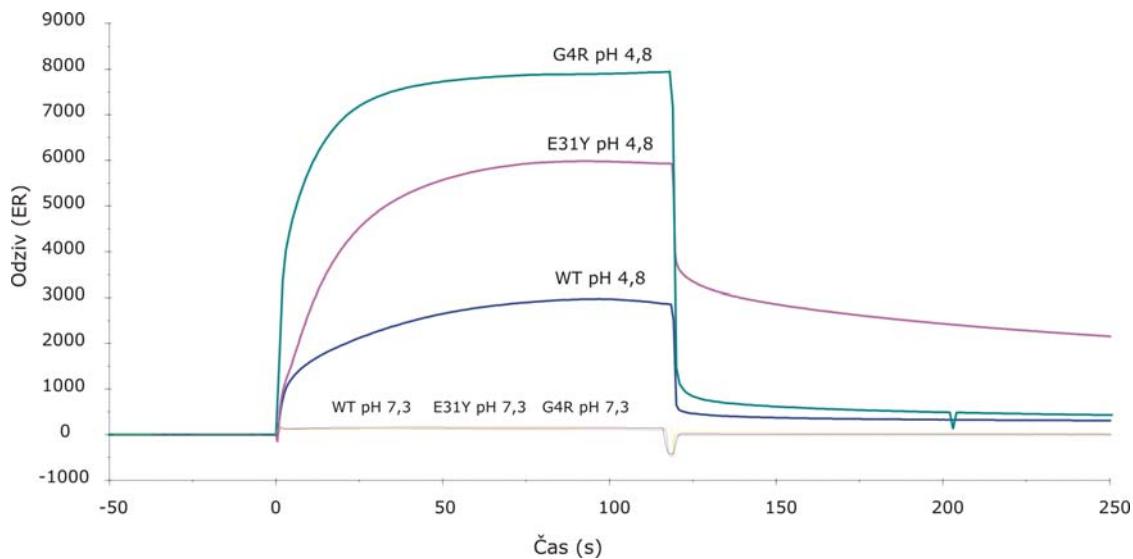
Slika 29: Koncentracijsko odvisna vezava prefibrilarnih agregatov variante E31Y, pripravljenih pri pH 4,8, na liposome POPG, merjeno s površinsko plazmonske resonanco.

Figure 29: Concentration dependent binding of prefibrillar aggregates of E31Y variant prepared at pH 4.8 to POPG liposomes measured by surface plasmon resonance.



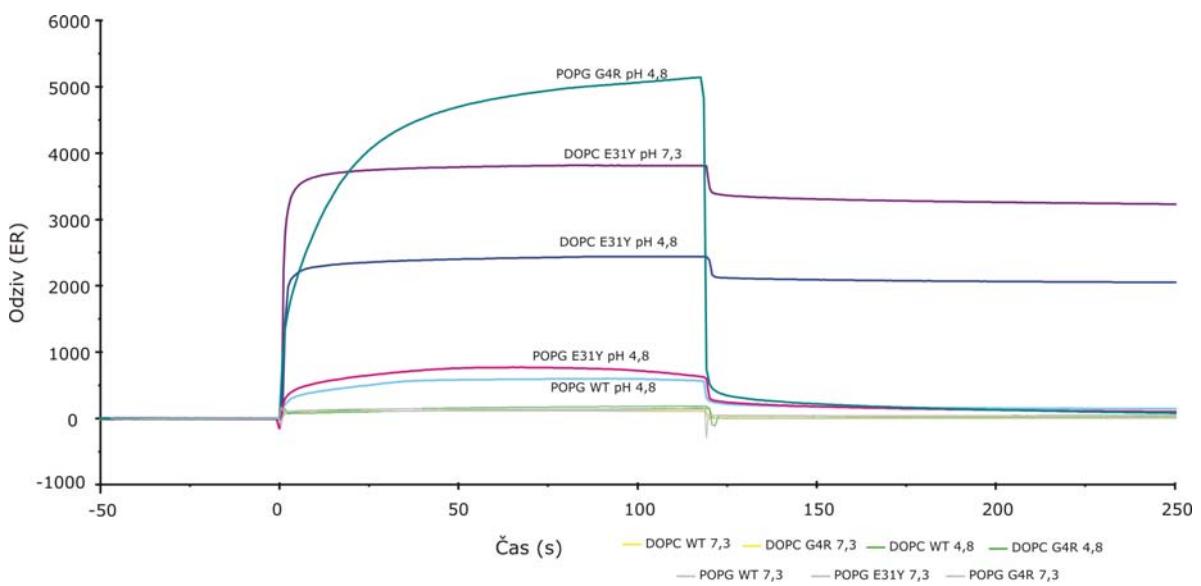
Slika 30: Koncentracijsko odvisna vezava prefibrilarnih agregatov mutante G4R, pripravljenih pri pH 4,8, na liposome POPG, merjeno s površinsko plazmonske resonanco.

Figure 30: Concentration dependent binding of prefibrillar aggregates of G4R mutant prepared at pH 4.8 to POPG liposomes measured by surface plasmon resonance.



Slika 31: Vezave WT stefina B, variante E31Y in mutante G4R v nativnem in prefibrilarnem stanju pri 70 μM koncentraciji na liposome POPG.

Figure 31: Binding of WT stefin B, E31Y variant and G4R mutant in native and prefibrillar state at concentration 70 μM to POPG liposomes.



Slika 32: Vezave WT stefina B, variante E31Y in mutante G4R v nativnem in prefibrilarnem stanju pri 60 μ M koncentraciji na liposome POPG in DOPC.

Figure 32: Binding of WT stefin B, E31Y variant and G4R mutant in native and prefibrillar state at concentration 60 μ M to POPG and DOPC liposomes.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Med t.i. konformacijske bolezni spadajo različne amilidoze, pa tudi vse nevrodegenerativne bolezni, med drugim Alzheimerjeva bolezen (najpogostejša oblika demence pri starejši populaciji), Parkinsonova bolezen, Huntingtonova bolezen, amiotropna lateralna skleroza. Delež teh bolezni je sorazmerno nizek, a predstavlja veliko obremenitev in skrb pri starajoči populaciji razvitega sveta, predvsem zahodne Evrope in Amerike. Bolezni, kot je Alzheimerjeva, danes veljajo za neozdravljive, lahko pa bi jih preprečevali oz. upočasnili potek. Raziskovalci, ki se ukvarjam s tem področjem, se nadejamo, da bi razumevanje osnovnih procesov, ki so temelj teh patologij, kot so agregacija proteinov in toksičnost amiloidnih (prefibrilarnih) agregatov, lahko bistveno izboljšalo perspektivo za obvladovanje tovrstnih bolezni. Formiranje celičnih vključkov bi morda lahko preprečili z uporabo inhibitorjev agregacije ali s protitelesi. Pri tem pa je bistvenega pomena, da razumemo proces, ki je v ozadju, da ne bi povzročili npr. akumulacije toksičnih oligomer.

5.1.1 Fragment stefina B do mesta 68 vodi v razvito konformacijo proteina

Mutacija stefina B *Arg68stop*, ki povzroči skrajšanje proteina za 31 aminokislin (od skupno 98) in je bila opažena pri nekaterih bolnikih s progresivno mioklonsko epilepsijo tipa 1 (EPM1), vodi v razvito stanje tega proteina. Na to sklepamo iz odsotnosti CD spektra v bližnjem UV območju (slika 13), prav tako pa tudi iz CD spektra v dalnjem UV območju (slika 14), ki ima minimum blizu 200 nm in nizko eliptičnost v območju od 210 do 230 nm, kar je značilno za razvite proteine. Proces renaturacije tega razvitega peptida, ki ga dosežemo z dodajanjem organskega topila TFE, je večfazen prehod (slika 15), podobno kot so opazili pri nativno razvitem α -sinukleinu (Munishkina in sod., 2003). S postopnim višanjem koncentracije TFE se fragment najprej delno zvije, pojavi se konformacija bogata z β -strukturo in kot je bilo ugotovljeno za nekatere druge proteine (Hamada in Goto, 1997), je tudi za peptid *Arg68stop* pri visokih koncentracijah TFE opaziti pretežno α -helično konformacijo.

5.1.2 Možni zapleti pri patologiji progresivne mioklonske epilepsije tipa 1

Pri redki dedni obliki epilepsije tipa Unverricht-Lundborg (EPM1) je najpogostejša sprememba ponavlajoča se sekvenca dodekamera CCCCCGCCCCGCG v promotorski regiji gena za stefin B, kar vodi v znižanje vsebnosti mRNA in s tem tudi vsebnosti proteina stefina B (Lalioti in sod., 1997a). V kodirajočem delu gena za stefin B pa so do sedaj ugotovljene štiri mutacije, od katerih smo v naše študije vključili mutanto *Gly4Arg* (G4R) in pa fragment do mesta 68 (*R68stop*). Pri mutanti G4R pride do zamenjave gvanina v citozin v prvem eksonu, fragment pa je posledica zamenjave kodona za *Arg68* v translacijski stop kodon, kar prekine translacijo proteina na tem mestu. V primerjavi z "wild-type" stefinom B (WT) se ti dve mutanti obnašata bistveno drugače v naših *in vitro* študijah agregacije in amiloidne fibrilacije, kar bi lahko imelo patološke posledice.

Pri običajnem pH, ki sproži fibrilacijo WT oblike (pH < 5), se peptid stefina B do mesta 68 zelo enostavno pretvori v amiloidne fibrile. Tako brez kot tudi v prisotnosti TFE začne takoj fibrilirati brez opazne lag faze (slika 18). Fibrile, ki so se tvorile brez vpliva TFE (slika 20A) so krajše od tistih, ki so rasle v njegovi prisotnosti (slike 20B,C1,C2), kot je razvidno iz opazovanja preparatov s transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). Ta fragmentiran protein ima zelo visoko nagnjenost k agregaciji in fibrilaciji, kar so potrdile tudi celične študije, kjer so proučevali asociacijo z lizosomi (Alakurtti in sod., 2004). Za fragment je bilo ugotovljeno, da v celici najverjetneje pride do hitre degradacije sintetiziranega proteina, kajti razpršeno celično porazdelitev, ne pa tudi asociacijo z lizosomi, so opazili le v primeru prisotnega proteasomskega inhibitorja laktacistina.

Prav tako so za mutanto G4R v isti študiji opazili le razpršeno porazdelitev po citoplazmi in jedru, ne pa asociacije z lizosomi, ki je bila značilna za WT protein. Posebnost te mutante je tudi, da ima močno podaljšano lag fazo fibrilacije in nižji izkoristek končnih fibril v stacionarni fazi rasti fibril v primerjavi z WT stefinom B (slika 10). V lag fazi fibrilacije se akumulirajo prefibrilarni agregati, ki se s časom pretvarjajo v fibrile. S TEM smo pri WT proteinu v stacionarni fazi opazili le dozorele fibrile (slika 19C), medtem ko je pri mutanti G4R še vedno prisotnih nekaj agregatov poleg nekoliko krajsih, ne tako gosto prepletenih fibril (slika 19D). Različen izkoristek končnih fibril (slika 17) pri teh dveh proteinih (večji za WT in manjši za mutanto) je

tako verjetno posledica različnega deleža med prisotnimi fibrilami in agregati v raztopini. V zadnjem času vse več študij kaže v smeri, da so prefibrilarni agregati tista toksična vrsta, ki je glavni povzročitelji poškodb celic in da so fibrile v primerjavi z njimi relativno benigne (Walsh in sod., 1999,2002; Caughey in Lansbury, 2003). Ker ima mutanta G4R bistveno daljšo lag fazo fibrilacije od WT proteina in agregati še vedno ostanejo v raztopini, ko fibrile prenehajo rasti, lahko sklepamo, da bi ta mutanta potencialno znala biti bolj citotoksična od WT stefina B.

Tudi za nekatere amiloidogene proteine, ki so vključeni v konformacijske bolezni, kot je npr. α -sinuklein pri Parkinsonovi bolezni, je bilo opaženo, da patogene mutacije vodijo v podaljšanje lag faze in v akumulacijo prefibrilarnih oligomer (Conway in sod., 2000). Te oligomerne strukture so znane po tem, da delajo pore v membrano, kar lahko povzroči njeno prepuščanje. Nekatere pore so podobne tistim, ki jih povzročajo bakterijski toksini. Povečana permeabilnost membran je lahko vzrok nefunkcionalnosti celice ali celo njene smrti (Lashuel in sod., 2002). Ta dejstva so nas vodila pri načrtovanju naših nadaljnih eksperimentov in sicer smo želeli primerjati nagnjenost k interakcijam z lipidnimi membranami mutante G4R z WT stefinom B. Mutanta se je v vse primerih pokazala kot precej bolj invazivna. Zanjo je bila opažena izredno hitra kinetika insercije v lipidni monosloj, tako v nativnem kot tudi v prefibrilarnem stanju (z višjimi končnimi površinskimi pritiski pri aggregatih), za razliko od WT proteina, ki se je v obeh primerih precej slabo insertiral (slika 22). Tudi kritični pritisk je bil pri mutanti mnogo višji kot za WT protein (preglednica 2). Ravno tako so bile velike razlike pri vezavi na lipidne dvosloje (slike 28,30,31,32), predvsem pri prefibrilarnih aggregatih, kjer smo opazili bistveno večjo in nekoliko močnejšo vezavo mutante G4R. Ogromne razlike pa so se pokazale tudi pri prepuščanju fluorescenčnega barvila kalceina iz liposomov, ki so po prekonočni inkubaciji z mutanto G4R močno prepuščali kalcein (slika 27), v nekaterih primerih celo popolnoma.

Glede na dobljene rezultate sklepamo, da bi do zmanjšanja aktivnosti oz. do izgube funkcije inhibitorja cisteinskih proteinaz stefina B v nekaterih primerih bolnikov z EPM1 lahko prišlo tudi zaradi intracelularne agregacije mutiranega stefina B, ki bi lahko dodatno pridobil toksično funkcijo (Čeru in sod., 2005). Na osnovi dosedanjih študij bi lahko akumulacijo toksičnih prefibrilarnih agregatov (če bi do agregacije prišlo) in posledično interakcije z membranami pričakovali pri mutanti G4R, medtem ko bi se fragment do mesta 68, ki hitro fibrilira, po vsej verjetnosti ujel v citoplazemske vključke ali pa bi prišlo do degradacije v proteasomu. To je tudi v skladu z rezultati

skupine Melli in sod. (še neobjavljeno), ki so opazili, da je fragment stefina B *Arg68stop* v citoplazmi agregiral, kar bi lahko bilo na račun precipitacije fibril v celici. Tudi preliminarni rezultati od Čeru in sod. so bili podobni (še neobjavljeno). Če dejansko pri EPM1 bolezni pride do kakšnega od teh dveh mehanizmov, bi bilo v nadaljevanju smiselno preveriti na vzorcih bolnikov ali vsaj na modelnih transgenih živalih. Lahko bi opazovali ali pride do formiranja celičnih vključkov, do znakov povečanega oksidativnega stresa (povečan nivo reaktivnih oksidacijskih delcev v celici) oz. do zmanjšanega delovanja mitohondrijev in ubikvitin-proteasomskega sistema (s protitelesi proti ubikvitinu), kar so vse pogosto opaženi pojavi pri nevrodegenerativnih boleznih.

5.1.3 Lipidne membrane kot primarne tarče toksične aktivnosti prefibrilarnih agregatov

V drugem delu doktorske teze smo namenili večjo pozornost proučevanju interakcij prefibrilarnih agregatov z lipidnimi membranami, ker je to glede na rezultate iz literature najbolj verjeten mehanizem preko katerega pride do toksičnega učinka amiloidov na celice. Glavna hipoteza patologije pri Alzheimerjevi in drugih nevrodegenerativnih boleznih, ki ponazarja možen mehanizem toksičnosti amiloidogenih proteinov, je t.i. dopolnjena amiloidna kaskadna hipoteza ("amyloid cascade" hypothesis). Ta hipoteza pojasnjuje, da so primarni sprožilec dogodkov, uničajočih za celice, prefibrilarne oligomere (Walsh in sod., 1999; Hartley in sod., 1999), ki sprožijo kaskado dogodkov na osnovi interakcij z biološkimi membranami. Izgleda, da oligomere z izpostavljenou hidrofobno površino, ki nastajajo zgodaj v procesu agregacije in pa tiste z obliko "prstana", po nekaterih izsledkih celo delajo pore v celične membrane (Monoi in sod., 2000; Kagan in sod., 2002; Lashuel in sod., 2002). Sledilo naj bi intracelularno povečanje vsebnosti kalcijevih ionov in prostih radikalov, kar bi v nadaljevanju vodilo do sprememb v signalizaciji in dodatnih modifikacij nekaterih celičnih komponent. Tudi ne smemo zanemariti, da so oksidativno poškodovani in preveč fosforilirani proteini posledično bolj nagnjeni k agregaciji (Arispe in sod., 1994).

Druga, kanalska hipoteza ("channel hypothesis") Alzheimerjeve bolezni pa ima že več kot desetletje dolgo zgodovino. Najprej so Arispe in sod., 1993 *in vitro* pokazali, da A- β (1-40) tvori kanale v lipidne dvosloje. Ti kanali so bili kationsko selektivni za kalcijeve ione, medtem ko so jih cinkovi ioni blokirali. Tako so sklepali, da bi lahko bil vdor

kalcijevih ionov v celico tisti primarni razlog, ki bi vodil v smrt nevronov pri Alzheimerjevi in drugih nevrodegenerativnih boleznih (Arispe in sod., 1994, 1996). Te ugotovitve so se z nadaljnimi študijami dopolnjevale. Dejstvo je, da že majhna sprememba v potencialu plazemske membrane lahko pomembno vpliva na električne lastnosti nevronov, ki pa so zelo občutljivi za ionske gradiente. Vdor kalcijevih ionov v celice bi tako lahko sprožil apoptozo. Če bi se amiloidni toksin usmeril na mitohondrijske membrane, bi to ravno tako lahko vodilo do apoptoze. Predpostavlja, da se perforacija membran bolj verjetno pojavi v celičnih razdelkih z nizkim pH, kot so lizosomi. Poleg A- β je bilo še vsaj za šest drugih proteinov ali peptidov ugotovljeno, da lahko tvorijo pore v celične membrane (Kawahara in sod., 2000).

Namen naše študije je bil prispevati k splošnemu modelu citotoksičnosti, inducirane s strani prefibrilarnih oligomer amiloidogenih proteinov. Kot je znano, toksična narava proteinskih agregatov ni omejena samo na proteine in peptide, ki so povezani s patološkimi stanji. Tudi prefibrilarni agregati nekaterih proteinov, ki niso povezani z nobeno do sedaj poznano boleznijo, imajo podoben toksičen učinek na celice kot npr. agregati amiloida- β (Bucciantini in sod., 2002). Za boljše razumevanje splošnega mehanizma smo proučevali interakcije z lipidnimi membranami nepatološkega proteina človeškega stefina B. V študij smo vključili že omenjeno mutanto EPM1 Gly4Arg (G4R) in pa varianto Glu31Tyr (E31Y), katere gen je bil sintetiziran (Jerala in sod., 1988) na osnovi aminokislinske sekvence stefina B, izoliranega iz človeških jeter (Ritonja in sod., 1985). Interakcije variante E31Y z nekaterimi membranami v povezavi s toksičnostjo smo prikazali že prej (Anderluh in sod., 2005).

5.1.3.1 Permeabilnost lipidnih veziklov

Prefibrilarni agregati testiranih proteinov so se akumulirali v lag fazi rasti fibril, ki smo jo inducirali z znižanjem pH na 4,8 ali 3,3. Ti agregati se medsebojno razlikujejo v morfološki: več protofibril nastane pri pH 3,3 (slika 5B), pri pH 4,8 pa je več rahlo povezanih oligomer, ki jih imenujejo tudi granularni agregati (slika 5A). Te manjše razlike v morfološki so bile najverjetneje vzrok za doseženo različno prepustnost membran (slika 27A). Pri WT stefinu B in mutanti G4R je permeabilnost v prisotnosti protofibril pri pH 3,3 precej višja (WT 20 % in G4R 100 %) kot pri agregatih, ki so se formirali pri pH 4,8 (WT 6 % in G4R 70 %). Za varianto E31Y ni opaženih bistvenih razlik pri obeh vrstah agregatov, obakrat je bila permeabilnost okoli 30%. Ti rezultati se nanašajo na POPG membrane, ker pri DOPC lipidih ni bilo opaziti večjih interakcij.

Velika izjema je le monomera mutante G4R (slika 27B), ki je v štirih ponovitvah popolnoma permeabilizirala DOPC liposome. Tudi v primeru POPG lipidov se je ta oblika pokazala kot najbolj interagirajoča, kar sovpada s poskusi na monoslojih (slika 26). Prepuščanje membran je bilo koncentracijsko odvisno (preglednica 4) in je bilo tudi pri pH 7,3 precejšnje v primeru variante E31Y (50%) in mutante G4R (88%). Pri nativni obliki WT stefina B pa je do nekoliko opaznejše permeabilnosti prišlo le v primeru višjih oligomer (slika 27B), skladno z vrednostmi za kritične pritiske, dobljenih pri insercijsi v monosloje (pregl. 3). Ti rezultati se prav tako ujemajo z eksperimenti toksičnosti posameznih oligomer, ki so pokazali, da so oligomere, višje od tetramere tiste, ki opazno zmanjšajo viabilnost celic (Čeru in sod., še neobjavljen).

5.1.3.2 Insercija v monoslojne in vezava na dvoslojne lipidne membrane

Z merjenjem insercije posameznih proteinov v lipidni monosloj, smo ugotovili, da imajo agregirani proteini večjo afiniteto do lipidnih membran kot nativni proteini. Prefibrilarne agregate pri pH 4,8 smo primerjali s proteini pri pH 7,3. Agregati so se bistveno hitreje vključevali v monosloj kot proteini v nativni obliki. Hitre kinetike insercije so bile opazne zlasti za varianto E31Y in mutanto G4R (slika 22), ki so dosegle tudi višje končne vrednosti površinskega pritiska kot WT protein. Kritični pritiski za agregirane oblike pri pH 4,8 (pregl. 2) so pri vseh treh proteinih dosegli vrednosti površinskega pritiska blizu 30 mN/m, ki je značilen za gostoto pakiranja lipidov v bioloških membranah (Brockman, 1999). S površinsko plazmonske resonanco smo potrdili vezavo teh agregiranih oblik na membrane POPG (slike 28-30), čeprav je bila ta vezava precej manjša v primerjavi s proteini, ki se specifično vežejo na membrane. Sem spadajo domene za vezavo na membrane, ki so vključene v celično signaliziranje (Cho, 2001; Yu in Lemmon, 2003) ali domene, s katerimi se toksini, ki perforirajo membrane, nanje pritrdirijo (Hong in sod., 2002; Ramachandran in sod., 2002).

Pri vseh naših eksperimentih so prefibrilarne oligomere pretežno interagirale s kislim fosfolipidom POPG. Pri nativnih proteinih smo za varianto E31Y in mutanto G4R opazili bistveno večjo interakcijo kot za WT protein (sliki 23 in 27A). Močnejšo vezavo za ti dve oblici stefina B bi lahko razložili na osnovi večjih elektrostatskih interakcij z negativno nabitimi lipidi, ker imata oba izoelektrično točko blizu 8, WT protein pa ~7.

5.2 SKLEPI

V prvem delu doktorske naloge smo želeli okarakterizirati dve mutanti stefina B, ki se pojavljata pri nekaterih bolnikih z EPM1. V obeh primerih pride do mutacije v kodirajočem delu gena za stefin B. Ugotovitve za fragment stefina B do mesta 68, ki ima v molekuli 31 aminokislin manj kot WT stefin B, so bile sledeče:

- mutacija, ki ima za posledico zamenjavo kodona za Arg68 v translacijski stop kodon, vodi v razvito stanje proteina
- renaturacija te mutante s postopnim dodajanjem organskega topila TFE je večfazen prehod [razvita polipeptidna veriga → delno zvita konformacija → konformacija bogata z β-strukturo → vse-α-helična oblika]
- zelo visoka nagnjenost k agregaciji
- hitra rast fibril
- fibrile, ki rastejo v odsotnosti TFE, so krajše od fibril, ki se formirajo v njegovi prisotnosti
- ta fragment bi se *in vivo* najverjetneje ujel v citoplazemske vključke ali pa bi prišlo do njegove degradacije v proteasomu.

Druga EPM1 mutanta *Gly4Arg* (G4R), ki smo jo vključili v *in vitro* študije, je posledica mutacije v prvem eksonu gena za stefin B. Zamenjava glicina v arginin močno vpliva na afiniteto vezave stefina B s cisteinskimi proteinazami, ker dolga in nabita stranska veriga arginina predstavlja sterično oviro za vezavo. Naše ugotovitve za to mutanto so bile naslednje:

- G4R mutanta ima v primerjavi z WT proteinom močno podaljšano lag fazo fibrilacije s prefibrilarnimi agregati in nižji izkoristek končnih fibril
- v stacionarni fazi rasti fibril je še vedno prisotnih nekaj aggregatov (pri WT stefinu B so samo fibrile)
- amiloidne fibrile so nekoliko krajše in ne tako gosto prepletene kot pri WT obliki
- različen izkoristek končnih fibril pri obeh proteinih je najverjetneje posledica različnega deleža med fibrilami in agregati v raztopini.

V drugem delu doktorskega dela pa smo želeli ovrednotiti interakcije prefibrilarnih agregatov z lipidnimi membranami, kar velja za najbolj verjeten mehanizem citotoksičnosti amiloidov. Ugotovili smo (velja za vse preučevane proteine):

- večjo in hitrejšo insercijo agregiranih proteinov v lipidni monosloj kot pri proteinih v nativnem stanju
- kritični pritiski prefibrilarnih agregatov so dosegli vrednosti blizu 30 mN/m, kar je značilno za gostoto lipidov v bioloških membranah
- od ločenih oligomer najbolj z lipidi interagirajo oligomere višje od tetramer
- s površinsko plazmonsko resonanco smo potrdili večjo nagnjenost in močnejše interakcije agregiranih oblik z lipidnimi dvosloji
- protofibrile v lag fazi rasti fibril, ki smo jo inducirali z znižanjem pH na 3,3, povzročajo večjo prepustnost POPG liposomov kot granularni agregati v lag fazi pri pH 4,8
- pri naših eksperimentih so prefibrilarne oligomere pretežno interagirale s kislim fosfolipidom POPG, mnogo manj pa z nevtralnim fosfolipidom DOPC.

Največje razlike glede interakcij z membranami smo opazili med WT proteinim in EPM1 mutanto G4R, za katero smo ugotovili:

- hitro kinetiko insercije v lipidni monosloj (tako v nativnem kot tudi v prefibrilarnem stanju)
- visok kritični pritisk pri inserciji v monosloj
- prefibrilarni agregati mutante se močneje in v večjem obsegu vežejo na lipidne dvosloje kot agregati WT stefina B
- v prisotnosti te mutante pride po prekonočni inkubaciji z lizosomi do velike prepustnosti, v nekaterih primerih celo popolne
- na osnovi vseh meritev sklepamo, da je mutanta G4R bolj invazivna oblika stefina B.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Eden od naših ciljev je bil pridobiti dodatne informacije o patologiji progresivne mioklonske epilepsije tipa 1, im. tudi Unverricht-Lundborgova bolezen. V to bolezen vodijo nekatere mutacije v genu za stefin B, ki vplivajo na zmanjšanje funkcije tega proteina. V ta namen smo želeli okarakterizirati lastnosti dveh mutant, ki se pojavita pri nekaterih bolnikih z EPM1. Ena mutanta je bila *Gly4Arg*, ki so jo opazili predvsem pri bolnikih iz Švice, Francije in severne Afrike, druga pa je bila krajša varianta stefina B - fragment *Arg68stop*. Ta fragment je posledica predčasne prekinitve sinteze proteina na mestu 68, pojavlja pa se zlasti pri Fincih. Ker do sedaj še ni znano, kateri molekularni mehanizmi so vzrok za patološke spremembe na ravni celice, se nam je zdel to pomemben predmet proučevanja. Predpostavili smo, da gre morda pri kateri od patogenih mutant (poleg manjše prisotnosti in/ali aktivnosti proteina) še dodatno za napačno zvitje in večjo nagnjenost k agregaciji, kot je to značilno za druge nevrodegenerativne bolezni.

Za karakterizacijo obeh mutant smo uporabili naslednje metode: merili smo daljne in bližje UV CD spektre, ugotavljalci spremembe v sekundarni strukturi ob dodajanju organskega topila TFE in spremljali kinetiko amiloidne fibrilacije z merjenjem ThT fluorescence. Izkazalo se je, da je struktura fragmenta *Arg68stop* razvita in da ima kot taka veliko nagnjenost k agregaciji in rasti fibril. Za mutanto *Gly4Arg* smo ugotovili, da ima močno podaljšano lag fazo fibrilacije (inducirana z znižanjem pH na 5) s prisotnimi prefibrilarnimi agregati. Ta mutanta ima tudi nižji končni izkoristek zrelih fibril v primerjavi z "wild-type" proteinom, ker je v stacionarni fazi fibrilacije še vedno prisotnih nekaj agregatov. Ti zadnji so po rezultatih iz literature vodilna toksična oblika amiloidov, znani predvsem po interakcijah s celičnimi membranami. Da bi prispevali k razumevanju mehanizma toksičnosti, smo se v drugem delu naših raziskav lotili študija interakcij prefibrilarnih agregatov/oligomer stefina B, kot dobrega modelnega sistema, z membranami. Želeli smo opredeliti razlike pri vezavi na lipidne membrane med nativnimi in agregiranimi proteini. Pričakovali smo, da bodo prefibrilarni agregati močneje interagirali in povzročali večjo permeabilnost membran.

V membranske študije smo vključili tri proteine: "wild-type" stefin B, varianto *Glu31Tyr* in mutanto *Gly4Arg*. Nagnjenost k vezavi na membrane smo proučevali z insercijo v lipidni monosloj, pri čemer smo merili zvišanje površinskega pritiska po vključevanju posameznih proteinov. V nadaljevanju smo ugotavljali prepustnost majhnih unilamelarnih veziklov po prekonočni inkubaciji s proteini na osnovi povečanja intenzitete fluorescence kalceina, ki je zaradi poškodb membrane (s strani toksičnosti proteinov) prehajal iz veziklov v okolico. V tretjem eksperimentu smo s površinsko plazmonske resonanco spremljali afiniteto proteinov do vezave na dvoslojne membrane. Ugotovili smo, da imajo prefibrilarni agregati vseh treh proteinov bistveno večjo tendenco do vezave na membrane in z njimi močneje interagirajo kot nativne konformacije, se bolje vključujejo v monosloje in dosežejo višje kritične pritiske. Razlike se pojavijo tudi med posameznimi vrstami teh agregatov: več prisotnih protofibril pri pH 3,3 bolj permeabilizira membrane kot granularne oligomere pri pH 4,8. Agregati so pretežno interagirali s kislim fosfolipidom POPG. Velike razlike pri vezavi na lipide pa smo opazili zlasti med nativnim stanjem "wild-type" stefina B in EPM1 mutante *Gly4Arg*. Kinetika insercije v lipidni monosloj je za mutanto bistveno hitrejša in doseže višje končne pritiske. V prisotnosti te mutante pride tudi do velike prepustnosti liposomov, ki je v nekaterih primerih celo 100 %.

Na osnovi zbranih rezultatov lahko povzamemo, da je mutanta *Gly4Arg* mnogo bolj invazivna v primerjavi z "wild-type" stefinom B, da ima fragment *Arg68stop* večjo nagnjenost k fibrilaciji zaradi razvite konformacije in da prefibrilarne oblike proteinov bistveno bolj interagirajo z lipidi kot proteini v nativnih stanjih.

6.2 SUMMARY

One of our goals was to gain some additional information about the pathology of progressive myoclonus epilepsy of type 1, also called Unverricht-Lundborg disease. This disease was shown to result from mutations in stefin B gene that lead to reduced function of this protein. For this purpose we characterized two of the mutants observed in some of the EPM1 patients. One of them was the *Gly4Arg* mutant, which is mainly found in some of the patients from Switzerland, France and North Africa. The second one was a shorter variant of stefin B – *Arg68stop* fragment, which results from a premature termination of synthesis of the protein at position 68 and appears mainly in the Finnish families. It is not clear yet until now, which molecular mechanisms are the causes of pathological changes on the cell level. This seemed to us an important issue for research. We hypothesized that some of the pathological mutants could undergo additional misfolding and aggregation, beside lower presence and/or activity of the protein, as this is usual for other neurodegenerative diseases.

For characterization of both EPM1 mutants the following methods were applied: measurement of far and near UV CD spectra, observing changes in secondary structure by adding organic solvent TFE and the kinetics of amyloid fibrillation by ThT fluorescence measurements. We showed that the structure of the *Arg68stop* fragment is unfolded one with a high propensity to aggregate and fibrillate. For the *Gly4Arg* mutant we found out that this mutant has a much prolonged lag phase of fibrillation with presence of prefibrillar aggregates that were induced by lowering pH to 5. This mutant has also lower final yield of mature fibrils in comparison to wild type protein and in the stationary phase of fibrils growth still some aggregates remain in solution. These aggregates, based on the results in the literature, are the main toxic amyloid species that interact with the cell membranes. That's why in the second part, we studied interactions of prefibrillar aggregates/oligomers of stefin B (as a good model) with lipid membranes. The purpose behind this was to contribute to the understanding of the general mechanisms of cytotoxicity. We wanted to measure the differences in lipid binding between the native and aggregated proteins. We expected that prefibrillar aggregates will interact stronger and will cause higher leakage of lipid membranes.

In our membrane studies three proteins were included: wild type stefin B, the *Glu31Tyr* variant and the *Gly4Arg* mutant. The tendency for membrane binding was first measured by the insertion potential into the monolayer. In this experiment we

measured the increment of surface pressure after the penetration of separated proteins in the monolayer. Next, after overnight incubation with the proteins we measured the permeability of small unilamellar vesicles based on the increment of calcein release fluorescence. In the third experiment we observed affinity for the binding to the supported lipid membranes by surface plasmon resonance. The results show that prefibrillar aggregates of all three proteins have much higher tendency for lipid binding, stronger insertions into monolayers and reach higher critical pressures. There are differences also between the aggregated species: presence of protofibrils at pH 3.3 permeabilizes vesicles more than the granular oligomers at pH 4.8. Both types of the aggregates predominantly interact with anionic phospholipid POPG. We observed big differences also between wild type stefin B and the EPM1 *Gly4Arg* mutant native states. EPM1 mutant inserts much readily into lipid monolayers and to a higher final pressures. Liposome permeability was in the presence of this mutant in some cases even 100 %.

Based on the collected results we can summarize that the *Gly4Arg* mutant is more reactive species in comparison to the wild type stefin B. The *Arg68stop* mutant has higher propensity to form fibrils because of its unfolded conformation. And the prefibrillar forms of proteins exert much stronger interactions with lipids than the proteins in the native states.

7 VIRI

Alakurtti K., Weber E., Rinne R., Theol G., Haan G., Lindhout D., Salmikangas P., Saukko P., Lahtinen U., Lehesjoki A. 2004. Loss of lysosomal association of cystatin b proteins representing progressive myoclonus epilepsy, EPM1, mutations. European Journal of Human Genetics, 13: 208-215

Anderluh G., Gutierrez-Aguirre I., Rabzelj S., Čeru S., Kopitar-Jerala N., Maček P., Turk V., Žerovnik E. 2005. Interaction of human stefin B in the prefibrillar oligomeric form with membranes – correlation with cellular toxicity. FEBS Journal, 272: 3042 – 3051

Anfinsen C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. Science, 181: 223-230

Arispe N., Pollard H.B., Rojas E. 1993. Giant multilevel. cation channels formed by Alzheimer's disease amyloid β -protein [A β P-(1-40)] in bilayer membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 10573-10577

Arispe N., Pollard H.B., Rojas E. 1994. β -Amyloid Ca $^{2+}$ -channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer disease. Molecular and Cellular Biochemistry, 140: 29 – 135

Arispe N., Pollard H.B., Rojas E. 1996. Zn $^{2+}$ interaction with Alzheimer amyloid β protein calcium channels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 1710–1715

Baumeister W., Walz J., Zuhl F., Seemuller E. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. Cell 92, 367-380

Bence N.F., Sampat R.M., Kopito R.R. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. Science, 292: 1552-1555

Bitan G., Kirkpatridge M.D., Lomakin A., Vollmers S.S., Benedek G.B., Teplow D.B. 2003. Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct

pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 330-335

Bouchard M., Zurdo J., Nettleton E.J., Dobson C.M., Robinson C.V. 2000. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Science*, 9: 1960-1967

Brockman H. 1999. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 438-443

Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F., Baroni F., Formigli L., Zurdo J., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M., Stefani M. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 416: 507-511

Bucciantini M., Calloni G., Chiti F., Formigli L., Nosi D., Dobson C.M., Stefani M. 2004. Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 31374-31382

Bukau B., Horwich A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92: 351-366

Bullock A.N., Fersht A.R. 2001. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Review Cancer*, 1: 68-76

Caughey B., Lansbury P.T. 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annual Review of Neuroscience*, 26: 267-298

Chamberlain A.K., MacPhee C.E., Zurdo J., Morozova-Roche L.A., Hill H.A., Dobson C.M., Davis J.J. 2000. Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 79: 3282-3293

Chiti F., Webster P., Taddei N., Clark A., Stefani M., Ramponi G., Dobson C.M. 1999. Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 3590-3594

Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M. 2003. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*, 424: 805-808

- Cho W. 2001. Membrane targeting by C1 and C2 domains. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 32407-32410
- 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 early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 571-576
- Csermely P. 2001. Chaperone overload is a possible contributor to 'civilization diseases'. *Trends in Genetics*, 17: 701-704
- Čeru S., Rabzelj S., Kopitar-Jerala N., Turk V., Žerovnik E. 2005. Protein aggregation as a possible cause for pathology in a subset of familial Unverricht-Lundborg disease. *Medical Hypotheses*, 64: 955-959.
- Di Giamo R., Riccio M., Santi S., Galeotti C., Ambrosetti D.C., Melli M. 2002. New insights into the molecular basis of progressive myoclonus epilepsy: a multiprotein complex with cystatin B. *Human Molecular Genetic*, 11: 2941 – 2950
- Dobson C.M. 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 24: 329-332
- Dobson C.M. 2001. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 356: 133-145
- Dobson C.M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*, 426: 884-890
- Dobson C.M. 2004. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15: 3-16
- Ellis R.J., Hartl F.U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, 9:102-10
- Ellis R.J. 2001. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends in Biochemical Sciences*, 26: 597-604
- Ellis R.J., Minton A.P. 2003. Join the crowd. *Nature*, 425: 27-28

Estrada S., Nylander M., Hill N.J., Craven C.J., Walther J.P., Björk I. 1998. The role of Gly-4 of human cystatin A (stefin A) in the binding of target proteinases. Characterization by kinetic and equilibrium methods of the interaction of cystatin A Gly-4 mutants with papain, cathepsin B, and cathepsin L. *Biochemistry*, 37:7551-7560

Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M. 2001. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, 410: 165-166

Fändrich M., Dobson C.M. 2002. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO Journal*, 21: 5682-5690

Gustafson L. 1992. Clinical classification of dementia conditions. *Acta Neurologica Scandinavica*, 139: 16-20

Hamada D., Goto Y. 1997. The equilibrium intermediate of β -lactoglobulin with non-native α -helical structure. *Journal of Molecular Biology*, 269: 479-487

Hammond C., Helenius A. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 7: 523-529

Hardesty B., Kramer G. 2001. Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 66: 41-66

Harper J.D., Lansbury P.T. 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 66:385-407

Hartl F.U., Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852 – 1858

Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P.M., Teplow D.B., Selkoe D.J. 1999. Protofibrillar Intermediates of Amyloid β -Protein Induce Acute Electrophysiological Changes and Progressive Neurotoxicity in Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience*, 19: 8876-8884

Hong Q., Gutierrez-Aguirre I., Barlič A., Malovrh P., Kristan K., Podlesek Z., Maček P., Turk D., Gonzalez-Manas J.M., Lakey J.H., Anderluh G. 2002. Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *Journal of biological chemistry*, 277: 41916–41924

Horwich A. 2002. Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *Journal of Clinical Investigation*, 110: 1221-1232

Hoshi M., Sato M., Matsumoto S., Noguchi A., Yasutake K., Yoshida N., Sato K. 2003. Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 6370-6375

Houseweart, M.K., Pennacchio, L.A., Vilaythong, A., Peters, C., Noebels J.L., and Myers, R.M. 2003. Cathepsin B but not cathepsins L or S contributes to the pathogenesis of Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Journal of Neurobiology*, 56: 315–327

Jenko S., Škarabot M., Kenig M., Gunčar G., Muševič I., Turk D., Žerovnik E. 2004. Different propensity to form amyloid fibrils by two homologous proteins-human stefins A and B: searching for an explanation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55: 417-425

Jenko Kokalj S., Stoka V., Kenig M., Gunčar M., Turk D., Žerovnik E. 2005. A central role for protein aggregation in neurodegenerative disease; Mechanistic and structural studies of human stefins. *Acta Chimica Slovenica*, 52: 27-33

Jensson O., Palsdottir A., Thorsteinsson L., Arnason A., Abrahamson M., Olafsson I., Grubb A. 1990. Cystatin C mutation causing amyloid angiopathy and brain hemorrhage. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 371: 229-232

Jerala R., Trstenjak M., Lenarčič B, Turk V. 1988. Cloning a synthetic gene for human stefin B and its expression in the *E. coli*. *FEBS Letters*, 239: 41-44

- Jimenez J.L., Guijarro J.I., Orlova E., Zurdo J., Dobson C.M., Sunde M., Saibil H.R. 1999. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *The EMBO Journal*, 18: 815-821
- Jimenez J.L., Nettleton E.J., Bouchard M., Robinson C.V., Dobson C.M., Saibil H.R. 2002. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 9196-9201
- Johansson J. 2003. Molecular determinants for amyloid fibril formation: lessons from lung surfactant protein C. *Swiss Medical Weekly*, 133: 275-282
- Kagan B.L., Hirakura Y., Azimov R., Azimova R., Lin M.C. 2002. The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides*, 23: 1311-1315
- Karplus M. 1997. The Levinthal paradox: yesterday and today. *Folding & design*, 2: S69-S75
- Kaufman R.J., Scheuner D., Schroder M., Shen X., Lee K., Liu C.Y., Arnold S.M. 2002. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3: 411-421
- Kawahara M., Kuroda Y., Arispe N., Rojas E. 2000. Alzheimer's β -amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 14077-14083
- Kawarabayashi T., Shoji M., Younkin L.H., Wen-Lang L., Dickson D.W., Murakami T., Matsubara E., Abe K., Ashe K.H., Younkin S.G. 2004. Dimeric amyloid β -protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 24: 3801-3809
- 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*, 301: 1847-1849
- Kelly J.W. 1996. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Current Opinion in Structural Biology*, 6: 11-17

Koo E.H., Lansbury P.T. Jr., Kelly J.W. 1999. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 9989-9990

Lashuel H.A., Hartley D., Petre B.M., Walz T., Lansbury P.T. Jr. 2002. Amyloid pores pathogenic mutations. Nature, 418: 291-291

Laliović M.D., Scott H.S., Buresi C., Rossier C., Bottani A., Morris M.A. Malafosse A., Antonarakis S.E. 1997a. Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. Nature, 386: 847-851

Laliović M.D., Mirotić M., Buresi C., Peitsch M.C., Rossier C., Ouazzani R., Baldy-Moulinier M., Bottani A., Malafosse A., Antonarakis S.E. 1997b. Identification of mutation in cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). American Journal of Human Genetics, 60: 342-351

Ii K., Ito H., Kominami E., Hirano A. 1993. Abnormal distribution of cathepsin proteinases and endogenous inhibitors (cystatins) in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease, parkinsonism-dementia complex on Guam, and senile dementia and in the aged. Virchows Archiv A-Pathological Anatomy and Histopathology, 423: 185-194

Lopez De La Paz M., Goldie K., Zurdo J., Lacroix E., Dobson C.M., Hoenger A., Serrano L. 2002. De novo designed peptide-based amyloid fibrils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 16052-16057

Macario A.J., Conway de Macario E. 2002. Sick chaperones and ageing: a perspective. Ageing Research Reviews, 1: 295-311

Maruyama K., Kametani F., Ikeda S., Ishihara T., Yanagisawa N. 1992. Characterization of amyloid fibril protein from a case of cerebral amyloid angiopathy showing immunohistochemical reactivity for both beta protein and cystatin C. Neuroscience Letters, 144: 38-42

Mendes Sousa M., Cardoso I., Fernandes R., Guimaraes A., Saraiva M. J. 2001. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy. Evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. American Journal of Pathology, 159: 1993-2000

Monoi H., Futaki S., Kugimiya S., Minakata H., Yoshihara K. 2000. Poly-L-glutamine forms cation channels: relevance to the pathogenesis of the polyglutamine diseases. *Biophysical Journal* 78: 2733-2734

Muchowski P.J., Schaffar G., Sittler A., Wanker E.E., Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U. 2000. Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 7841-7846

Munishkina L.A., Phelan C., Uversky V.N., Fink A.L. 2003. Conformational behavior and aggregation of α-synuclein in organic solvents: Modeling the effects of membranes. *Biochemistry*, 42: 2720-2730

[Nelson R.](#), [Sawaya M.R.](#), [Balbirnie M.](#), [Madsen A.O.](#), [Riek C.](#), [Grothe R.](#), [Eisenberg D.](#) 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 435: 773-778

Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condron M.M., Axelman K., Forsell C., Stenh C., Luthman J., Teplow D.B., Younkin S.G., Naslund J., Lannfelt L. 2001. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nature Neuroscience*, 4: 887-893

Pennacchio L.A., Lehesjoki A.E., Stone N.E., Willour V.L., Virtaneva K., Maio J., D'Amato E., Ramirez L., Faham M., Koskiemi M., Warrington J.A., Norio R., de la Chapelle A., Cox D.R., Myers R.M. 1996. Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science*, 271: 1731 – 1734

Pennacchio L.A., Bouley D.M., Higgins K.M., Scott M.P., Noebles J.L., Myers R.M. 1998. Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nature Genetics*, 20: 251 – 258

Pol E., Björk I. 2001. Role of single cysteine residue, Cys 3, of human and bovine cystatin B (stefin B) in the inhibition of cysteine proteinases. *Protein Science*, 10: 1729-1738

Polverino de Laureto P., Taddei N., Frare E., Capanni C., Costantini S., Zurdo J., Chiti F., Dobson C.M., Fontana A. 2003. Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis. *Journal of Molecular Biology*, 334: 129-141

Ptitsyn O.B. 1995. Molten globule and protein folding. *Advances in Protein Chemistry*, 47: 83-229

Rabzelj S. 2004. *In vitro* študij stabilnosti in amiloidne fibrilacije nekaterih mutant človeškega stefina B. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 67 str.

Rabzelj S., Turk V., Žerovnik E. 2005. In vitro study of stability and amyloid-fibril formation of two mutants of human stefin B (cystatin B) occurring in patients with EPM1. *Protein Science*, 14: 2713-2722

Radford S.E, Dobson C.M. 1999. From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding. *Cell*, 97: 291-298

Ramachandran R., Heuck A.P., Tweten R.K., Johnson A.E. 2002. Structural insights into the membrane anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nature Structural Biology*, 9: 823-827

Rinne R., Saukko P., Jarvinen M., Lehesjoki A.E. 2002. Reduced cystatin B activity correlates with enhanced cathepsin activity in progressive myoclonus epilepsy. *Annals of Medicine*, 34: 380-5

Riccio M., Di Giaimo R., Pianetti S., Palmieri P.P., Melli M., Santi S. 2001. Nuclear localization of cystatin B, the cathepsin inhibitor implicated in myoclonus epilepsy (EPM1). *Experimental Cell Research*, 262: 84-94

Ritonja A., Machleidt W., Barrett A.J. 1985. Amino acid sequence of the intracellular cysteine proteinase inhibitor cystatin B from human liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 131: 1187-1192

Sanchez-Magraner L., Cortajarena A.L., Goni F.M., Ostolaza H. 2006. Membrane insertion of *Escherichia coli* α -hemolysin is independent from membrane lysis. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 5461-5467

Schiene C., Fischer G. 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10: 40-45

- Schlunegger M.P., Bennett M.J., Eisenberg D. 1997. Oligomer formation by 3D domain swapping: a model for protein assembly and misassembly. *Advances in Protein Chemistry*, 50: 61-122
- Sherman M.Y., Goldberg A.L. 2001. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, 29: 15-32
- Shortle D. 1996. The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB Journal*, 10: 27-34
- Smith L.J., Fiebig K.M, Schwalbe H., Dobson C.M. 1996. The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins. *Folding & Design*, 1: R95-R106
- Stefani M., Dobson C.M. 2003. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine*, 81: 678-699
- Thomas P.J., Qu B.H., Pedersen P.L. 1995. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 20: 456-459
- Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J., Teplow D.B. 1999. Amyloid β -protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 25945-25952
- Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, 416: 535-539
- Walsh D.M., Selkoe D.J. 2004. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein and peptide letters*, 11: 213-28
- Wileman T. 2006. Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science*, 312:875-878

Wilson M.R., Easterbrook-Smith S.B. 2000. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends in Biochemical Sciences*, 25: 95-98

Yu J.W., Lemmon M.A. 2003 Genome-wide analysis of signaling domain function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7: 103-109

Žerovnik E., Jerala R., Kroon-Žitko L., Turk V., Lohner K. 1997. Characterization of the equilibrium intermediates in acid denaturation of human stefin B. *European Journal of Biochemistry*, 245: 364 – 372

Žerovnik E., Virden R., Jerala R., Turk V., Waltho J.P. 1998. On the mechanism of human stefin B folding: I. Comparison to homologous stefin A. Influence of pH and trifluoroethanol on the fast and slow folding phases. *Proteins*, 32: 296 – 303

Žerovnik E., Virden R., Jerala R., Kroon-Žitko L., Turk V., Waltho J.P. 1999. Differences in the effects of TFE on the folding pathways of human stefins A and B. *Proteins*, 36: 205 –216

Žerovnik E., Pompe-Novak M., Škarabot M., Ravnikar M., Muševič I., Turk V. 2002a. Human stefin B readily forms amyloid fibrils *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594: 1-5

Žerovnik E, Turk V, Walther J.P. 2002b. Amyloid fibril formation by human stefin B:
influence of the initial pH-induced intermediate state. Biochemical Society
Transactions, 30: 543-547

Žerovnik E., Zavašnik-Bergant V., Kopitar-Jerala N., Pompe-Novak M., Škarabot M.,
Goldie K., Ravnikar M., Muševic I., Turk V. 2002c. Amyloid fibril formation by
human stefin B *in vitro*: immunogold labelling and comparison to stefin A.
Biological Chemistry 383: 859-863

Žerovnik E. 2002d. Amyloid-fibril formation; Proposed mechanisms and relevance to
conformational disease. European Journal of Biochemistry, 269: 3362-3371

ZAHVALA

Te vrstice pišem vsem Vam. Hvala, ker ste! Zahvaljujem se vsem, ki ste na kakršenkoli način prispevali, vplivali ali kakorkoli drugače zaznamovali mojo življenjsko pot zadnjih dve leti. To je bil čas velikih sprememb v mojem življenju in čas, ko je nastajala moja doktorska disertacija. Lahko rečem to, da sem hvaležna za VSE: za pridobljena strokovna znanja in izkušnje, osebna doživetja, še zlasti pa za vse, kar sem sama ob tem postala...

Najprej bi se iskreno zahvalila Odseku za Biokemijo in molekularno biologijo Inštituta "Jožef Stefan", ki mi je na edinstven način omogočil, da je moja kreacija sploh lahko začela nastajati, pa seveda tudi Agenciji za raziskovalno dejavnost RS, to pa je še druga plat zgodbe.

Velika zahvala gre moji mentorici doc. dr. Evi Žerovnik, brez katere najbrž v tem trenutku ne bi pisala zadnjega dejanja disertacije, ker se doktorata najverjetneje sploh ne bi lotila. Zato, Eva, najprej iskrena hvala, da ste me vzpodbudili do te mere, da sem rekla DA priložnosti. Zahvalila bi se vam tudi za vso znanje, ki ste ga tako nesebično delili z mano, za usmerjenje in vodenje pri poskusih, pa tudi za vse nasvete in prípombe, predvsem pa, da ste kar ste! Zahvalila bi se vam tudi za zelo natančen pregled doktorske disertacije in za mnoge odlične komentarje.

Naslednje vrstice so namenjene prof. dr. Vitu Turku, ki mi je kot prvo omogočil, da sem se lahko priključila in raziskovala v okviru skupine "Proteoliza in njena regulacija". Hvala vam za vse nove izkušnje, ki sem jih pridobila v okviru naše raziskovalne skupine, tudi za vaš vedno veder osebni pristop in za vse strokovne napotke. Najlepše se vam zahvaljujem tudi za pregled doktorskega dela in za vaše nasvete.

Naslednja zahvala gre prof. dr. Petru Dovču za pregled dela, za vse odlične predloge in za vedno prijazen odziv.

Zahvaljujem se Katedri za Biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, kjer so nastali prav vsi poskusi na membranah in s tem precejšen del doktorskega dela. Velike radodarnosti in izredne pripravljenosti za kakršnokoli pomoč in pa vedno iskrene prijaznosti sigurno ne bom nikoli pozabila. Zahvaljujem se predstojniku katedre prof. dr. Petru Mačku za možnost izvajanja eksperimentov, Ireni Pavešič, Katji Rebolj, Mojci Beseničar, Andreju Bavdku in vsem ostalim za prijazno pomoč pri delu, še posebno pa doc. dr. Gregorju Anderluhu in dr. Ionu Gutierrez-Aguirreju, ki sta me vpeljela v svet lipidičnih membran. Hvala vama za vse, kar sta me novega naučila, za številne nasvete pri samem delu in pa za izredno prijaznost ter vedno dobro voljo.

Za TEM slike proteinskih preparatov se najlepše zahvaljujem mag. Magdi Tušek-Žnidarič z Nacionalnega inštituta za biologijo.

Iskrena hvala vodji Odseka za Biokemijo in molekularno biologijo prof. dr. Borisu Turku, da ste mi omogočili kakovostno delo in udeležbo na številnih znanstvenih srečanjih ter za vse iskrene misli. Hvala tajnici Katarini Zajc za vedno veliko prijaznost in vso pomoč, dr. Saši Janko Kokalj, Katji Škerget in Slavku Čeriju za sodelovanje in konstruktivne razprave, Jerici Sabotič in Alešu Berlecu za nadvse prijetno skupno sobivanje in pa vsem ostalim kolegom, za katere sicer tu že zmanjkuje prostora, a sem jim resnično hvaležna za marsikaj, predvsem pa vsem za prijetno druženje v času mojega dela na IJS.

In pa še iz srca hvala vsem mojim najbližjim, zlasti očetu Zdenku in mami Slavici ter sestri Saši z družino, pa vsem mojim dobrim prijateljem, še posebno Marku in Sergeji. Brez vseh Vas jaz ne bi bila jaz in to ne

moj doktorat. Tu mi preprosto zmanjka besed, s katerimi bi lahko izrazila svojo hvaležnost za vašo Ljubezen, podarjen Čas, Skrb in Podporo VEDNO IN POVSOD. Hvala ker ste z menoj na moji poti in se z mano veselite mojih zmag – ta je tudi za VAS!